

**Інститут проблем кріобіології та кріомедицини
Національна академія наук України
Інститут проблем кріобіології та кріомедицини
Національна академія наук України**

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

Прокопюк Володимир Юрійович

УДК:615.361.013.85.014.41:618.1.21+612.62

**ДИСЕРТАЦІЯ
КРІОКОНСЕРВУВАННЯ І НИЗЬКОТЕМПЕРАТУРНЕ ЗБЕРІГАННЯ
ПОХІДНИХ ПЛАЦЕНТИ ТА ЇХ ВПЛИВ НА ПЕРЕБІГ
ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ГІНЕКОЛОГІЧНОЇ ПАТОЛОГІЇ**

14.01.35 – кріомедицина

22 – охорона здоров'я

Подається на здобуття наукового ступеня доктора медичних наук
Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело
_____ (В.Ю. Прокопюк)

Науковий консультант: акад. НАН України, доктор медичних наук, професор
Анатолій Миколайович Гольцев

Харків – 2019

АНОТАЦІЯ

Прокопюк В.Ю. Кріоконсервування і низькотемпературне зберігання похідних плаценти та їх вплив на перебіг експериментальної гінекологічної патології. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття вченого ступеню доктора медичних наук за спеціальністю 14.01.35 – «кріомедицина». Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, 2019.

Перспективним джерелом клітин, тканин, та біологічно активних речовин для клінічного застосування є плацента. Це обумовлено різноманітням клітин та тканин, які можна отримати, великим проліферативним потенціалом, низькою імуногенністю, відсутністю етичних проблем, можливістю застосування аутоматеріалу. Для успішного застосування похідних плаценти необхідно створення технологій довгострокового зберігання та транспортування, що може бути забезпечене завдяки застосуванню низьких температур. Важливою особливістю похідних плаценти є їх тропність до органів жіночої статеві системи. Під час вагітності під дією плаценти змінюється функціонування ряду систем організму матері та перебіг багатьох захворювань, що створює підґрунтя до їх застосування насамперед при патології жіночої статеві системи. Гінекологічними захворюваннями, що вносять вагомий вклад в захворюваність та можуть бути успішно проліковані кріоконсервованими похідними плаценти є: інфекційна, аутоімунна, ендокринна патологія, ішемічні та післяопераційні порушення.

На початок 2018 року за даними U.S. National Library of Medicine та U.S. National Institutes of Health зареєстровано близько 16000 досліджень та 400 клінічних випробувань, присвячених похідним плаценти. Втім невіршеним залишається ряд питань.

Розроблені методи кріоконсервування експлантів плаценти, клітин,

тканинноінженерних структур потребують вдосконалення з ціллю підвищення збереженості матеріалу, для чого необхідно з'ясувати особливості впливу різних факторів кріоконсервування та компонентів середовища на біоб'єкти. Нез'ясованими є також характер впливу плаценти та її похідних на статеву систему, перебіг ряд захворювань, та можливість їх застосування лікуванні патологічних процесів. Невирішеними є практичні задачі кріоконсервування тканин, біоінженерних структур, довгострокового зберігання та транспортування біоматеріалу, вдосконалення існуючих методів кріоконсервування, оскільки вони не завжди забезпечують повне збереження матеріалу. Існуючі методи лікування гінекологічної патології не забезпечують достатньої ефективності, тому потребують вдосконалення та пошуку нових шляхів подолання проблеми.

Метою дослідження було визначити закономірності впливу факторів кріоконсервування та низькотемпературного зберігання на морфофункціональні характеристики похідних плаценти, що можуть бути застосовані у медичній практиці та вивчити їх вплив на перебіг експериментальної гінекологічної патології на моделях найбільш розповсюджених та соціально значущих захворювань.

Робота має три розділи. На першому визначали можливості отримання, вплив факторів кріоконсервування, гіпотермічного, субнормотермічного зберігання на похідні плаценти (клітини, експланти, сфероїди, альгінатні носії). На другому виявляли вплив кріоконсервованих похідних плаценти на окремі культури клітин та тканин в системі *in vitro* (фібробласти, нейроклітини, спленоцити, матки, яєчники). На третьому вивчали вплив кріоконсервованих похідних плаценти на функції жіночої статевої системи в нормі та при моделюванні типових патологічних станів (інфекційний процес, антифосфоліпідний синдром, полікістоз яєчників, травма та ішемія яєчників, операційна травма, постхіміотерапевтичне передчасне виснаження яєчників). Для отримання та характеристики похідних плаценти застосовувались методи культивування клітин, тканин, світлової, конфокальної лазерної

скануючи мікроскопію, проточну цитометрію, біохімічні методи. Для оцінки впливу факторів кріоконсервування застосовували програмне заморожування, кріомікроскопію, методи повільного та швидкого заморожування. Для оцінки впливу похідних плаценти на жіночу репродуктивну систему застосовували моделювання патологічних станів на лабораторних тваринах, гістологічні, морфометричні біохімічні методи. Використовували комп'ютерну обробку зображень, даних конфокальної мікроскопії, проточної цитометрії, статистичну обробку даних.

У дисертаційній роботі вперше проведено комплексне теоретичне обґрунтування, вирішення проблеми кріоконсервування, гіпотермічного зберігання похідних плаценти (експлантів, клітин в суспензії, в сфероїдах та інкапсульованих в альгінатних сферах) та їх застосування при найбільш розповсюдженій та соціально значущій гінекологічній патології в експерименті.

Встановлено, що експланти, клітини плаценти в суспензії та в альгінатних мікросферах зберігають структуру, життєздатність та метаболічні характеристики (за даними вітального забарвлення, тестів МТТ та відновлення резазурину) при культивуванні. Сфероїди, отримані з клітин плаценти є нестійкими, мають тенденцію до руйнування та адгезії. Клітини, виділені з ворсин плаценти, плідних оболонок мають характеристики МСК (імунофенотип CD90+, CD73+, CD105+, CD34-, здатні до індукованого диференціювання в адипогенному, хондрогенному та остеогенному напрямку).

Вперше виявлено, що при субнормотермічних умовах (+20°C) експланти, клітини плаценти в суспензії та в альгінатних мікросферах зберігають структуру, життєздатність та метаболічні характеристики 48 годин, сфероїди - 24 години. При зниженні температури до гіпотермічних умов (+4°C) термін збереження знижується до 24 годин для всіх похідних плаценти. Кріоконсервування під захистом 10% диметилсульфоксиду та охолодженням зі швидкістю 1°C/хв до -80°C з наступним зануренням у

рідкий азот дозволяє отримати збереженість клітин та експлантів плаценти більш 90% за показниками структурної цілісності та життєздатності, клітин в альгінатних сферах – близько 70%, сфероїдів – близько 50% зі значним руйнуванням.

Вперше встановлено, що типовими кріоушкодженнями для експлантів плаценти є розриви сполучної тканини та десквамація трофобласту внаслідок росту кристалів. Для сфероїдів з клітин плаценти характерне пошкодження кристалами міжклітинних зв'язків та загибель клітин по периферії сфероїдів. В альгінатних гранулах з клітинами плаценти при кріоконсервуванні утворюються зони з великими кристалами (до 150 мкм), та зони з невеликими кристалами (до 3 мкм), що є результатом взаємодії кріопротектору з альгінатом. Максимальна збереженість клітин плаценти на рівні більше 80% спостерігається при застосуванні у якості кріопротекторів диметилсульфоксиду, пропандіолу, етиленгліколю. При застосуванні сахарози, гліцерину життєздатність клітин не перевищує 70%. Заміна середовища DMEM сольовими розчинами NaCl, Рінгера чи Хенксу зменшує кількість життєздатних клітин після кріоконсервування. Наявність сироватки не впливає на кріозахисні властивості середовищ.

Вперше доведено, що для ефективного кріоконсервування клітин плаценти необхідно проводити охолодження зі швидкістю 1°C/хв до -40°C, або нижче, з наступним зануренням у рідкий азот. Повторне заморожування клітин плаценти без рекультивування призводить до втрати близько 50% клітин. При коливанні температур в кріосховищі в межах -196°C - -100°C до 20 разів збереженість клітин плаценти залишається незмінною. При більшій кількості коливань, або коливаннях температури до -80°C кількість клітин, їх життєздатність, метаболічні характеристики знижуються, водночас збільшується кількість апоптотично змінених клітин.

Вперше в системі *in vitro* середовища, кондиційовані клітинами та експлантами плаценти підвищують метаболічну активність нейроклітин, органотипових культур матки, пригнічують її в культурах яєчників,

спленоцитів та не впливають на метаболічну активність фібробластів. Встановлено, що середовища, кондиційовані кріоконсервованими похідними плаценти вірогідно більше пригнічують метаболічну активність спленоцитів, ніж свіжовиділеними та чинять однаковий вплив на метаболічну активність та морфологічні характеристики нейроклітин, фібробластів, органотипових культур матки та яєчників.

Вперше проведено комплексний аналіз впливу кріоконсервованих похідних плаценти на перебіг експериментальної гінекологічної патології. Імплантація кріоконсервованих експлантів плаценти здоровим експериментальним тваринам призводить до гіпертрофії яєчників, матки, затримки овуляції та часу настання вагітності, не впливає на репродуктивні показники. Показано, що імплантація кріоконсервованих експлантів плаценти при несанованому інфекційному процесі, знижує кількість тварин, що завагітніли з 80 до 40% та середню кількість плодів через підвищене спайкоутворення та активацію гострого запального процесу. Виявлено, що імплантація кріоконсервованих експлантів плаценти при експериментальному антифосфоліпідному синдромі дозволяє знизити активність лімфоцитів та швидкість згортання крові, підвищити кількість плодів. В моделі синдрому полікістозних яєчників застосування кріоконсервованих експлантів плаценти дозволяє відновити естральний цикл у 90% тварин, підвищити відсоток вагітних тварин з 0 до 40%. В моделі передчасного виснаження яєчників після хіміотерапії застосування кріоконсервованих експлантів плаценти відновлює естральний цикл, статеву функцію, структуру матки, але не фертильність. В моделі ішемічного ураження яєчників після застосування кріоконсервованих експлантів плаценти вірогідно відновлюється кількість жовтих тіл та підвищується кількість плодів.

Розроблено методи кріоконсервування та гіпотермічного зберігання тканин та тканинно-інженерних структур. Для короточасного зберігання похідних плаценти протягом 24-48 годин, яке частіше необхідне для

транспортування доцільно застосовувати субнормотермічні умови – близько 20°C та середовище культивування у концентрації 1×10^5 клітин/мл, чи 10 мл на 1 г експлантів. Виявлено, що найбільш прийнятними формами похідних плаценти для застосування є кріоконсервовані клітини та експланти.

Запропоновано методи кріоконсервування та короткочасного гіпотермічного зберігання похідних плаценти, що базуються на основі дозволених до застосування в клінічній практиці речовин (пропандіол, розчин Рінгеру, 0,9% NaCl) та обладнання, які є на устаткуванні більшості лікарень (холодильне обладнання).

Запропоновані методи швидкої оцінки вихідного стану та збереженості після кріоконсервування, гіпотермічного зберігання експлантів, сфероїдів з плаценти, які можуть бути застосовані для інших тканин, багатоклітинних комплексів. Ці методи є перспективними для використання у практиці низькотемпературних банків клітин, тканин та органів.

Визначені особливості кріоушкодження різних багатоклітинних структур дають змогу вдосконалювати методи кріоконсервування тканин, багатоклітинних конструкцій та створювати нові тканинноінженерні конструкції більш резистентні до кріовпливу.

Визначені перспективні напрямки дослідження, доцільність, можливі протипоказання побічні дії до застосування похідних плаценти при патології жіночої репродуктивної системи. Показанням до застосування похідних плаценти при патології жіночої статеві системи можуть бути функційні ендокринні розлади (яєчникова недостатність, синдром полікістозних яєчників), аутоімунна патологія (антифосфоліпідний синдром), ішемічні явища (перекрут). Протипоказанням до призначення похідних плаценти при патології жіночої статеві системи є наявність несанованої інфекційної патології. При застосуванні похідних плаценти інтраопераційно доцільним є проведення протиспайкової профілактики у вигляді бар'єрних гелів.

Ключові слова: плацента, МСК, сфероїди, експланти, кріоконсервування, гіпотермія, субнормотермія, культури, гінекологія, недостатність яєчників, полікістоз, інфекція, АФС.

ANNOTATION

Prokopiuk V.Yu. Cryopreservation and low-temperature storage of placental derivatives and their influence on the course of experimental gynecological pathology. - The qualifying scientific paper as a manuscript.

Dissertation for the doctor of medical science degree in specialty 14.01.35 – Cryomedicine. Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv – 2019.

Placenta is a perspective source of cells, tissues, and biologically active substances for clinical application. This is stipulated by the variety of the cells and tissues that can be obtained, high proliferative potential, low immunogenicity, lack of ethical issues, and the possibility of autobanking. For the successful application of placental derivatives, it is necessary to create the long-term storage and transport technologies that can be achieved using low temperatures. An important feature of the placental derivatives is their tropism to the female reproductive system. During pregnancy under the placental influence, the functioning of a number of systems of the mother's body and the course of many diseases change, that creates the basis for their application when treating the female reproductive system pathology. Gynecological pathologies such as infectious, autoimmune, endocrine ones, ischemic and post-surgery disorders, contributing greatly in morbidity, can be successfully treated with the cryopreserved placental derivatives.

By the beginning of 2018, according to the data of U.S. National Library of Medicine and U.S. The National Institutes of Health there were documented around 16,000 studies and 400 clinical trials with using the placental derivatives. However, a number of issues has remained unsolved.

The cryopreservation methods of placental explants, cells, tissue engineered structures need to be improved to improve the material preservation, wherefore it is

necessary to reveal the mechanisms of an influence of various cryopreservation factors and media components on biological objects. The mechanism of placenta and its derivatives influence on woman`s body, changes in the course of a number of diseases during pregnancy, and the possibility of their application to treat the pathological processes have been also uncovered. Problems of cryopreservation of tissues, bioengineered structures, long-term storage and transport of biomaterials, as well as the improvement of existing cryopreservation methods have not been solved since they do not always provide a complete preservation of the material. Existing methods of gynecological and obstetric pathology treatment do not provide 100% effectiveness; therefore, they need to be improved and the new ways to overcome the problem have to be found.

The aim of the study was to determine the influence of cryopreservation and low-temperature storage factors on morphofunctional characteristics of placental derivatives that can be applied in medical practice, as well as to investigate their influence on the course of experimental gynecological pathology in the models of the most widespread and socially significant diseases.

The work consists of three parts. In the first, the possibilities of obtaining, influence of cryopreservation, hypothermic subnormothermic storage factors on placental derivatives (cells, explants, spheroids, alginate carriers) were determined. In the second part the effects of cryopreserved placental derivative on female reproductive system component (fibroblasts, neurocells, splenocytes, uterus, ovaries) were studied *in vitro*. In the third, the effect of cryopreserved placental derivatives on the reproductive system function in the normal and in simulation of typical pathological process (infection, antiphospholipid syndrome, ovarian polycystic syndrome, ovarian dysfunction, trauma, post-chemotherapy premature ovarian failure) was studied. Methods of cell and tissue culturing, light, confocal laser scanning microscopy, flow cytometry, and biochemical methods were used for the placental derivatives` obtaining and characterization. To evaluate the influence of cryopreservation factors, the programmable freezing, cryomicroscopy, slow and rapid freezing methods were used. To evaluate the effect of placental

derivatives on the female reproductive system, modeling of pathological conditions in laboratory animals, the histological, morphometric, biochemical methods were used. Computer image processing, confocal microscopy, flow cytometry and statistical data processing were applied as well.

It has been found that the explants, placental cells in suspension and in alginate microspheres preserve their structure, viability and metabolic characteristics (according to the vital staining, MTT and resazurin assays) during culturing. The spheroids, formed from the placental cells were unstable, tended to disintegration and adhesion. The cells isolated from placental villi, fetal membranes have the MSCs features (immunophenotype CD90 +, CD73 +, CD105 +, CD34- capable of induced differentiation in the adipogenic, chondrogenic, and osteogenic directions).

For the first time it has been demonstrated, that the placental cells in suspension and in alginate microspheres preserved a stable structure, viability and metabolic characteristics for 48 hours, the spheroids did for 24 hours, under the subnormothermic conditions (+20°C). When the temperature decreases down to hypothermic conditions (+ 4°C), the preservation rate decreased to 24 hours for all the placental derivatives. Cryopreservation under 10% dimethylsulfoxide protection and with the cooling rate of 1 °C/min down to -80°C, followed by an immersion into liquid nitrogen allowed the obtaining of the preservation rate for the placental cells and explants higher than 90% on indices of structural integrity and viability, for the cells in alginate spheres this value was about 70 %, for the spheroids that made about 50% with the signs of a significant destruction.

For the first time it has been established that typical cryoinjuries of placental explants is the connective tissue ruptures and trophoblast desquamation, resulted from the crystals growing. Typical damage of the spheroids are injuries of cell-to-cell relationship by crystals as well as the cell death along the periphery of spheroids. In alginate granules with placental cells in cryopreservation, the zones with large crystals (up to 150 microns) and the ones with small crystals (up to 3 microns), resulting from the interaction of the cryoprotectant with alginate, have

been formed. The maximum preservation of placental cells at a level higher than 80% was observed with the use of dimethylsulfoxide, propandiol, ethylene glycol cryoprotectants. When using sucrose, glycerol, the cell viability did not exceed 70%. Replacing DMEM to NaCl, Ringer or Hanks solutions reduced the number of viable cells after cryopreservation. The presence of serum did not change the cryoprotective properties of the media.

For the first time it has been shown that for effective cryopreservation of placental cells the cooling mode should be performed at a rate of 1°C/min down to -40°C or lower, followed by an immersion into liquid nitrogen. Repeated placental freeze-thawing of the cells without re-culturing led to a loss of about 50% of cells. Temperature fluctuations within -196°C - 100°C up to 20 times, did not result in the damage of placental cells. With more fluctuation or the temperature fluctuations down to -80°C, the number of cells, their viability, metabolic characteristics were reduced, while the number of apoptotic cells was increased.

For the first time it has been demonstrated *in vitro*, that the media, conditioned by placental cells and explants increase the metabolic activity of neurocells, organotypic cultures of the uterus, suppress it in ovarian cultures, splenocytes and do not change the metabolic activity of fibroblasts. It has been demonstrated that the media conditioned with cryopreserved placental derivatives suppress the metabolic activity of splenocytes bigger than those, conditioned with freshly isolated and have the same effect on metabolic activity and morphological characteristics of neurocells, fibroblasts, organotypic cultures of the uterus and ovaries.

For the first time the placental cryopreserved derivatives` influence on the course of experimental gynecological pathology was comprehensively analyzed. Implantation of cryopreserved placenta explants to healthy experimental animals led to hypertrophy of the ovaries, uterus, ovulation and pregnancy delay, it does not affect reproductive indices. It has been shown that the implantation of cryopreserved placental explants in a non-sanitated infectious process reduces the number of pregnant animals from 80 down to 40% and the average number of

fetuses due to an increased adhesion formation and activation of inflammatory process. It has been found that the implantation of cryopreserved placental explants in experimental antiphospholipid syndrome can reduce the activity of lymphocytes, the rate of blood coagulation, increase the number of fetuses. In the model of polycystic ovary syndrome, the application of cryopreserved placental explants can recover the estral cycle in 90% of animals; increase the percentage of pregnant animals from 0 up to 40%. In the model of premature ovarian failure after chemotherapy, the application of cryopreserved placental explants restores the estral cycle, sexual function, uterine structure, but not fertility. In the model of ischemic ovarian damage, after the use of cryopreserved placental explants, the number of yellow bodies was restored and the number of fetuses was increased.

The methods of cryopreservation and hypothermic storage of tissues and tissue-engineered structures have been developed. For placental derivatives a short-term storage for 24-48 hours, which is most often needed for transportation, it is expediently to use the subnormothermic conditions, i.e. about 20°C and culture medium with concentration 1×10^5 cells/ml or 10 ml per 1g of explants.

The methods of cryopreservation and short-term hypothermic storage of placental derivatives, based on the substances permitted for usage in clinical practice (propanediol, Ringer solution, 0.9% NaCl) and the equipment available in most hospitals (refrigeration equipment) have been proposed.

The methods of rapid evaluation of state and preservation after cryopreservation, hypothermic storage of explants, spheroids from the placenta, which can be used for other tissues, multicellular complexes have been developed. These methods are promising to be used in the practice of low-temperature banks of cells, tissues and organs.

The peculiarities of cryopreservation of various multicellular structures have been identified. They allow to improve the methods of cryopreservation of tissues, multicellular structures and to create new tissue-engineered constructs more resistant to cryopreservation.

The prospective research directions, possible indications, contraindications for application of placental derivatives in the female reproductive system pathology have been found. Functional endocrine disorders (ovarian insufficiency, polycystic ovary syndrome), autoimmune pathology (antiphospholipid syndrome), ischemic events (torsion) may be the indications for the placental derivatives application. The presence of infectious pathology is the contraindication to the application of placental derivatives. When placental derivatives intra-operatively are used, the anti-adhesion preventive measures in the form of the barrier gels are recommended.

Key words: placenta, MSCs, spheroids, explants, cryopreservation, hypothermia, subnormothermia, culture, gynecology, polycystic ovarian, insufficiency, infection, adhesions, APS.

Список публікацій за темою дисертації

Статті у наукових фахових виданнях.

1. Трифонов ВЮ, Прокопюк ВЮ, Прокопюк ОС, Липина ОВ, Волина ВВ, Зуб ЛИ, Фалько ОВ, Прокопюк АВ. Экспериментальное обоснование возможности прегравидарной профилактики антифосфолипидного синдрома. Таврический медико-биологический вестник. 2010; 13 (4,52): 188-192.
2. Трифонов ВЮ, Прокопюк ВЮ Современные представления об акушерском антифосфолипидном синдроме. Експериментальна і клінічна медицина. 2010; 2: 50-5.
3. Прокопюк ОС, Чижевський ВВ, Прокопюк ВЮ. Вплив імплантації кріоконсервованої хоріальної тканини на морфофункціональний стан міокарда старих щурів. Медицина сьогодні і завтра. 2011; 50-51(1-2): 242-245.
4. Prokopyuk VYu Cryopreserved chorionic tissue in maternal and fetal infection therapy (clinical and experimental research). Problems of cryobiology. 2011; 21(3): 338-249.
5. Прокопюк ВЮ Экспериментальная оценка эффективности прегравидарной подготовки и лечения антифосфолипидного синдрома. Клінічна та експериментальна патологія. 2011; X (2,36,1):79-82.
6. Мусатова ИБ, Прокопюк ОС, Волина ВВ, Прокопюк ВЮ Создание многокомпонентных сред для криоконсервирования ткани плаценты. Биофизика живой клетки 2014; 10: 126-128.
7. Прокопюк ВЮ, Фалько ОВ, Прокопюк ОС, Волина ВВ, Трифонов ВЮ. Аналіз методологічних підходів при моделюванні гестаційного антифосфоліпідного синдрому. Патологія. 2015; 32(2): 4-10.
8. Prokopyuk VYu, Falko OV, Musatova IB, Prokopyuk OS, Royenko OO, Terekhova OO, Chub OV. Low temperature preservation and storage of placental biological derivatives. Probl Cryobiol Cryomed. 2015; 25(4): 291-310. doi:10.15407/cryo25.04.291.

9. Прокопюк ОС, Шевченко НО, Прокопюк ВЮ, Чуб ОВ, Терехова ОО. Вплив кріоконсервованих біоб'єктів плацентарного походження на культуру клітин. Вісник проблем біології і медицини. 2015; 1(122,3): 160-4.
10. Pogozhykh D, Prokopyuk V, Pogozhykh O, Mueller T, Prokopyuk O Influence of factors of cryopreservation and hypothermic storage on survival and functional parameters of multipotent stromal cells of placental origin. PLoS One. 2015; 10 (10): e0139834. doi: 10.1371/journal.pone.0139834.
11. Prokopyuk VYu, Prokopyuk OS, Musatova IB, Shevchenko NA, Roenko AA, Terehova EA, Volina VV. Safety of placental, umbilical cord and fetal membrane explants after cryopreservation. Cell and organ transplantology. 2015; 3(1): 34-8. doi:10.22494/cot.v3i1.18
12. Schevchenko NO, Somova KV, Volina VV, Prokopiuk VYu, Prokopiuk OS. Dynamics of activity and duration of functioning of cryopreserved cryoextract, placental cells and fragments in the organism of experimental animals. Morphologia. 2016;10(2):93-8.
13. Пасієшвілі НМ, Карпенко ВГ, Прокопюк ВЮ, Фалько ОВ. Вплив імуномодуляторів на перебіг вагітності при експериментальних інфекційно-запальних ураженнях матері та плоду. Sciences of Europe. 2016; 1(3): 15-23.
14. Прокопюк ВЮ Внеплацентарные трофобластические структуры: изучение, структура, функции, свойства, диагностическое и терапевтическое значение. Акушерство и гинекология. 2016; 2: 49-54.
15. Роєнко ОО, Прокопюк ВЮ, Фалько ОВ, Шевченко НО, Прокопюк ОС Використання кріоконсервованих оболонок плода в терапії трофічних виразок в експерименті. Клінічна хірургія. 2016; 5: 69-72.
16. Козуб ММ, Прокопюк ВЮ, Козуб МІ, Прокопюк ВЮ, Скібіна КП Порівняльна характеристика різних різних методик оперативного лікування, профілактики спайкоутворення та післяопераційної реабілітації

- у щурів з моделлю трубної вагітності в експерименті. Збірник наукових праць співробітників НМАПО ім. П.Л. Шупіка. 2016; 27(2): 224-31.
- 17.Falko OV, Shevchenko NA, Prokopyuk VY, Roenko AA, Prokopyuk OS. Comparative analysis of limbs' trophic ulcers modeling methods in mice. *Novosti Khirurgii*. 2017; 25(6): 561-6.
 - 18.Kozub MM, Prokopyuk VYu, Skibina KP, Prokopyuk OV, Kozub NI Comparison of various of tissue and cell therapy approaches when restoring ovarian, hepatic and kidney's function after chemotherapy-induced ovarian failure. *Exp Oncol*. 2017; 39(3): 181-5.
 - 19.Musatova IB, Volina VV, Chub OV, Prokopyuk VYu, Prokopyuk OS Effects of implantation of cryopreserved placental explants on the behavioral indices and morphological characteristics of the cerebral structures in senescent mice. *Neurophysiology*. 2017; 49(5): 363-371.
 - 20.Pogozhykh D, Pogozhykh O, Prokopyuk V, Kuleshova L, Goltsev A, Blasczyk R, Mueller T. Influence of temperature fluctuations during cryopreservation on vital parameters, differentiation potential, and transgene expression of placental multipotent stromal cells. *Stem Cell Research & Therapy*. 2017; 8:66. doi: 10.1186/s13287-017-0512-7
 - 21.Prokopyuk OS, Prokopyuk VYu, Pasieshvili NM, Chyzhevskiy VV, Trifonov VYu, Karpenko VG, Loginova OO Implantation of cryopreserved human placental fragments restores prooxidant-antioxidant balance in experimental animals of late ontogeny. *Cryobiol. Cryomed*. 2017; 27(1): 61-70. doi: 10.15407/cryo27.01.061
 - 22.Prokopyuk VYu , Chub OV, Shevchenko NA, Falko OV, Musatova IB, Lazurenko VV , Tischenko AN, Prokopyuk OS Cryopreserved placental explants increase lifespan of male mice and change survival features of female mice. *Probl Cryobiol Cryomed* 2017; 27(2): 143–150.
 - 23.Prokopyuk VYu, Grischenko OV, Prokopyuk OV, Shevchenko NO , Falko OV, Storchak AV, Schedrov AO. Effect of cryopreserved placental explants on female reproductive system under normal and pathological conditions

- (experimental study). *Probl Cryobiol Cryomed*. 2017; 28(3): 250-65.
DOI: <https://doi.org/10.15407%2Fcryo27.03.250>
24. Prokopyuk VYu, Chub OV, Shevchenko MV, Prokopyuk OS. Placental stem cells, organotypic culture and human placenta extract have neuroprotective activity. *Cell and Organ Transplantology*. 2017; 5(1): 39-42.
doi:10.22494/cot.v5i1.67
 25. Pogozhykh O, Prokopyuk V, Figueiredo C, Pogozhykh D. Placenta and placental derivatives in regenerative therapies: experimental studies, history, and prospects. *Stem Cells International*. 2018; 2018: 14.
doi:10.1155/2018/4837930
 26. Prokopiuk VYu Influence of media conditioned by cryopreserved and fresh placental explants and cells on murine uterine and ovarian organotypic cultures. *Probl Cryobiol Cryomed*. 2018; 28(2): 139-150.
 27. Прокопюк ВЮ, Гольцев АМ, Прокопюк ОС, Сомова КВ, Логінова ОО. Вплив кріоконсервованих експлантів плаценти на перебіг експериментального синдрому полікістозних яєчників. *Вісник проблем біології і медицини*. 2018; 142(1): 167-171.
 28. Прокопюк ВЮ, Логінова ОО, Прокопюк ОВ, Сомова ЄВ. Вплив кріоконсервованих експлантів плаценти на відновлення яєчників після лікування перекруту. *Світ біології та медицини*. 2018; 63 (1): 150-153.
 29. Прокопюк ВЮ, Прокопюк ОС, Мусатова ІБ, Сорокіна ІВ, Логінова ОО, Сомова КВ Корекція інволютивних змін репродуктивної системи самиць старих щурів імплантацією кріоконсервованих фрагментів плаценти. *Фізіол. журн*. 2018; 64(4): 74-81.
 30. Prokopiuk VYu, Falko OV, Karpenko VG, Chub OV, Loginova OO Influence of native and cryopreserved placental derivatives on the splenocyte functional characteristics in vitro. *Bulletin of problems in biology and medicine*. 2018. V.144 (2); 221-223.
 31. Pogozhykh O, Prokopyuk V, Prokopyuk O, Kuleshova L, Goltsev A, Figueiredo C, Pogozhykh D Towards biobanking technologies for natural and

bioengineered multicellular placental constructs. *Biomaterials*. 2018; 185; 39-50.

32. Прокопюк ВЮ, Шевченко МВ, Прокопюк ОС, Мусатова ІБ, Смоляник К.Ю. Оцінка можливості короткочасного зберігання експлантів плаценти для регенеративної медицини. *Вісник наукових досліджень*. 2019; 2: 53-57. DOI 10.11603/2415-8798.2019.2.10271
33. Прокопюк ВЮ, Пасієшвілі НМ, Прокопюк ОВ, Карпенко ВГ, Логінова ОО Вплив кріоконсервованих експлантів плаценти на прояви ускладнень після операцій на матці в експерименті. *Вісник проблем біології і медицини*. 2019; 2 (151): 151-155.

Тези конференцій.

34. Prokopyuk OS, Prokopyuk VYu, Volina VV, Chizevsky VV Cryopreservation effect on morfofunctional integrity of human placental tissue. In: Speaker Abstract 47th Annual Meeting of Cryobiology "Cryo-2010"; 2010 July 17-20, Bristol. Bristol: Society for Cryobiology: 2010. p. 77.
35. Прокопюк ВЮ, Грищенко ВИ, Прокопюк ОС, Чижевский ВВ Опыт работы низкотемпературного банка аутологичных и донорских препаратов кордовой крови и плаценты в регенеративной медицине. В: Ткачук ВА, редактор. Сборник тезисов Всероссийской научной школы-конференции «Стволовые клетки и регенеративная медицина»; 2010 октябрь 25-26, Москва. Москва: "МГУ"; 2010, с. 58-59.
36. Прокопюк ОС, Прокопюк ВЮ Кріоконсервовані плацентарні біооб'єкти в тканинному аутобанку. В: акад. РАН і РАМН Міронов СП редактор. Сборник тезисов IV Всероссийского симпозиума с международным участием «Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии»; 2010 апрель 21-22; Санкт-Петербург. Санкт-Петербург: «Человек и его здоровье»; 2010, с. 24.
37. Прокопюк ВЮ, Прокопюк ОС. Механізми впливу кріоконсервованих препаратів плаценти на репродуктивну

- функцию в периоде позднего онтогенеза. В: Гольцев АН, редактор. Тезисы докладов 36-й ежегодной конференции молодых учёных «Холод в биологии и медицине»; 2012 май 22-24; Харьков. Харьков: ИПКиК НАНУ; 2010, с. 31.
38. Прокопюк ВЮ, Гольцев АН, Прокопюк ОС, Трифонов ВЮ. Экспериментальное обоснование прегравидарной подготовки криоконсервированными плацентарными препаратами. В: Сборник тезисов и программа V Всероссийский симпозиум с международным участием „Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии”; 2012 май 17-18; Уфа. Уфа: «Башкортостан», 2012, с. 184-5.
39. Прокопюк ОС, Прокопюк ВЮ, Карпенко ВГ. Плацентарная терапия гериатрических изменений репродуктивной функции В: Сборник тезисов и программа V Всероссийский симпозиум с международным участием „Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии”; 2012 май 17-18; Уфа. Уфа: «Башкортостан», 2012, с. 185-6.
40. Prokopyuk OS, Prokopyuk VYu. Morphofunctional integrity of placental fragments after using different cryopreservation protocols. Problems of cryobiology. 2012; 22(3): 264.
41. Прокопюк ОС, Прокопюк ВЮ. Использование криоконсервированных препаратов плаценты для коррекции возрастных изменений. В: Матеріали конференції „Актуальні питання геронтології та геріатрії”, присвяченій пам’яті В.В. Фролькіса; 2013 січень 25; Київ. Київ: "Інститут геронтології ім.Д.Ф.Чеботарьова НАМН України", с. 48.
42. Прокопюк ВЮ. Етико-правові проблеми отримання, дослідження і застосування плацентарних препаратів. В: Тези п’ятого конгресу з біоетики; 2013 вересень 23-25; Київ, с.146-147.
43. Прокопюк ОС, Ронко АА, Прокопюк ВЮ, Чижевський ВВ. Низкотемпературный банк плацентарных биообъектов: научные перспективы развития в сфере медицинских биотехнологий. В: Материалы III международной научно-практической конференции

- „Академическая наука – проблемы и достижения”; 2014 февраль 20-2; Москва, с. 43-6.
- 44.Prokopyuk VYu, Prokopyuk OS, Musatova IB, Roenko AN, Terekhova EA Preservation assay for placental, umbilical and membrain tissues in low temperature bank. In: Abstracts and program "Freezing biological time" Society for Low Temperature Biology 50th Anniversary Celebration, Annual Scientific Conference & AGM; 2014 October 8 - 10; London, p.74.
 - 45.Pogozhykh O, Pogozhykh D, Prokopiuk V, Muller T. Parametrs for accurate estimation of survival rates of multipotent stromal cells after long-term criopreservation simulation. In: Abstracts and program "Freezing biological time" Society for Low Temperature Biology 50th Anniversary Celebration, Annual Scientific Conference & AGM; 2014 October 8 - 10; London, p.74.
 - 46.Pogozhykh D, Pogozhykh O, Prokopiuk V, Mueller T. Mimicked long term cryopreservation of transgenic multipotent stromal cells affects viability but not transgene expression. In: Abstracts and program "8th International Meeting Stem Cell Network North Rhine-Westphalia". 2015 April 21-22; Bonn, Germany, p. 95.
 - 47.Prokopuk VY, Kozub NI, Skybina KP, Kozub MN Placental cryoextract rescue ovarian function of mice with premature ovarian falure induced by chemoterapy. *Prezeglad lekarski*. 2016; 73, Suppl. 1: 5.
 - 48.Skybina KP, Chub OV, Prokopyuk VYu, Shevchenko MV. Placental factors protects neural cells from glutamate-induced toxicity. In: Chernykh VP, Kotvitska AA, Krutskyh TV, Danylchenko SYu, editors. *Topical issues of new drugs development: Abstracts of XXIII International Scientific And Practical Conference Of Young Scientists And Student in 2 vol*. 2016 April 21 Kharkiv. Kharkiv: Publishing Office NUPh, 2016, vol. 2, p. 106.
 - 49.Прокопюк ВЮ, Скибина КП, Прокопюк АВ, Козуб МН Экстракт плаценты ускоряет восстановление половой и репродуктивной функции после химиотерапии в эксперименте (пилотное исследование). *Український радіологічний журнал*. 2016; XXIV(1, 1): 159.

- 50.Чуб ОВ, Шевченко МА., Прокопюк ВЮ. Нейропротекторный эффект факторов плацентарного происхождения в модели глутамат-индуцированной токсичности клеток головного мозга новорожденных крыс. В: Тези доповідей 40 щорічної конференції молодих учених "Холод в біології та медицині". 2016 травень 23-24, Харків. Харків: ІПКіКНАНУ, с. 26.
- 51.Pogozhykh D, Pogozhykh O, Prokopyuk V, Goltsev A, Figueiredo C, Müller T. Mimicking long-term biobanking of placental multipotent stromal cells by temperature fluctuations during cryopreservation. In: Society for Low Temperature Biology Annual Meeting 2016. 2016 september 7, Dresden, p.7.
- 52.Prokopyuk VYu, Pogozhykh D, Pogozhykh O, Musatova IB, Kuleshova LG, Prokopyuk OS Influence of cryopreservation on survival of placental, umbilical cord, and fetal membrane explants, as well as placental cells within spheroids and alginate microspheres. In: Society for Low Temperature Biology Annual Meeting 2016. 2016 september 7, Dresden, p.27.
- 53.Прокопюк ВЮ, Чуб ОВ, Шевченко М.А. Глутаматна ексайтотоксичність як метод вибору оцінки нейропротекторної дії лікарських препаратів *in vitro*. В: Черних ВП, редактор. Патолофізіологія і фармація: шляхи інтеграції: тези доповідей VII Національного конгресу патолофізіологів України з міжнародною участю. 2016 жовтень 5-7, Харків. Харків: НФаУ, с. 187.
- 54.Чуб ОВ, Прокопюк ВЮ, Прокопюк ОС, Мусатова ІБ, Шевченко МВ Кріоконсервовані плацентарні біопрепарати в профілактиці і корекції дисфункцій ЦНС в пізньому онтогенезі (експериментальне дослідження). Проблемы старения и долголетия. 2016; 25: 44.
- 55.Чуб ОВ, Прокопюк ВЮ, Мусатова ІБ, Прокопюк ОС. Кріоконсервовані експланти плаценти підвищують тривалість життя самців і знижують імовірність смерті самиць в репродуктивний період. В: Тези доповідей XIV Міжнародної наукової конференції студентів, аспірантів, докторантів,

- молодих вчених та фахівців "Актуальні питання сучасної медицини". 2017 березень 30-31, Харків. Харків: ХНУ, с. 88-9.
- 56.Prokopiuk VYu, Musatova IB, Shevchenko MV, Chub OV, Shevchenko NO, Prokopiuk OS Placental MSCs, explants, extract protect neural cells against glutamate-induced toxicity. In: Gálik J, Slovinská L, Lukáčová N, editors. Program and Abstract Book 8 th International Symposium on Experimental and Clinical Neurobiology. 2017 June 18 – 21 Kosice, Slovakia. Kosice: Mgr. Viliam Oravec - GAIA, p. 72.
- 57.Pogozhykh O, Pogozhykh D, Prokopyuk V, Figueiredo C. Characterisation of cells derived from cryopreserved placental tissues. In: Abstract book. SLTB Science meeting Cambridge. 2017 September 19 – 20, Cambridge (Uk).
- 58.Prokopiuk VYu, Kozub MM, Skibina KP, Prokopyuk OV. Experimental study of cell and tissue therapy protocols in rehabilitation after chemotherapy-induced ovarian failure. *Exp Oncol*. 2017; 39(3): 250-1.
- 59.Прокопюк ВЮ, Гольцев АМ, Прокопюк ОВ, Фалько ОВ, Шевченко МВ Вплив кріоконсервованих мезенхімально стромальних клітин та експлантів плаценти на ізолювані тканини та *in vitro* клітини жіночої репродуктивної системи. Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю: «Досягнення та перспективи експериментальної та клінічної ендокринології» (Сімнадцяті Данілевські читання). 2018 березень, 1 – 2 Харків. Харків. С.115.

Глави монографій.

- 60.Ткачук ВА, редактор. Стволовые клетки и регенеративная медицина: Сб статей. Москва: МАКС Пресс, 2011. Прокопюк ОС, Грищенко ВИ, Бабийчук ЛА, Прокопюк ВЮ, Зубов ПМ. Глава 16. Кріоконсервирование плацентарных биообъектов, содержащих стволовые клетки; с. 289-303.
- 61.Грищенко ВИ, Юрченко ТН, редактор. Прокопюк ОС, Чижевский ВВ, Прокопюк ВЮ, Волина ВВ. Плацента: кріоконсервирование, структура, свойства, перспективы клинического применения. Харьков: СПД ФЛ Бровин А.В., 2011. Глава 5. Верификация биобезопасности и сохранности

криоконсервированных плацентарных биообъектов; с. 207-245.

62. Чижевский ВВ, Прокопюк ОС, Грошевой МИ, Липина ОВ, Прокопюк ВЮ. Низкотемпературный банк биологических объектов: научно-методические основы и перспективы развития. В: Гольцев АН, редактор. Актуальные проблемы криобиологии и криомедицины. Харьков: издательский дом „Райдер”, 2012, с. 469-486.

Патенти.

63. Прокопюк ВЮ, Прокопюк ОС, Трифонов ВЮ, Зайченко ГВ. Спосіб моделювання акушерського антифосфоліпідного синдрому. Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України. Патент України № 62029. 2011 серпень 10.
64. Прокопюк ВЮ, Прокопюк ОС, Карпенко ВГ, Пасієшвілі НМ, Фалько ОВ. Спосіб корекції вікових порушень репродуктивної функції. Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України. Патент України № 72117. 2012 серпень 10.
65. Прокопюк ВЮ, Прокопюк ОС, Чижевський ВВ Спосіб криоконсервування тканини плаценти. Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України. Патент України № 79009. 2013 квітень 10.
66. Прокопюк ВЮ, Пасієшвілі НМ, Прокопюк ОВ, Карпенко ВГ, Прокопюк ОС. Спосіб профілактики первинної плацентарної недостатності. Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України. Патент України № 91122. 2014 червень 25.
67. Прокопюк ВЮ, Скібіна КП, Козуб ММ, Прокопюк ОВ, Пасієшвілі НМ. Спосіб лікування передчасної недостатності яєчників. Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України. Патент України № 107968. 2016 червень 24.

ЗМІСТ

СПИСОК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	28
ВСТУП.....	30
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	40
1.1. Сучасні уявлення про плаценту, екстраплацентарні трофобластичні структури та похідні плаценти.....	40
1.2. Кріоконсервування плацентарного матеріалу.....	54
1.3. Дослідження та застосування похідних плаценти в клінічній практиці	60
1.4. Сучасні проблеми збереження жіночого репродуктивного здоров'я та шляхи їх подолання.....	80
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	84
2.1. Дизайн дослідження.....	84
2.2. Методи отримання похідних плаценти.....	85
2.3. Методи оцінки похідних плаценти.....	91
2.4. Методи кріоконсервування та гіпотермічного зберігання похідних плаценти.....	94
2.5. Методи оцінки властивостей похідних плаценти на моделях <i>in vitro</i>	96
2.6. Методи моделювання патології репродуктивної системи на лабораторних тваринах.....	99
2.7. Методи обробки даних.....	107
2.8. Біоетичні протоколи.....	107
РОЗДІЛ 3. ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ФАКТОРІВ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ, СУБНОРМОТЕРМІЧНОГО ТА ГІПОТЕРМІЧНОГО ЗБЕРІГАННЯ НА ПОХІДНІ ПЛАЦЕНТИ.....	108

3.1.	Дослідження впливу факторів кріоконсервування, субнормотермічного та гіпотермічного зберігання на клітини плаценти.....	109
3.2.	Дослідження впливу факторів кріоконсервування, субнормотермічного та гіпотермічного зберігання на експланти плаценти.....	143
3.3.	Дослідження впливу факторів кріоконсервування, субнормотермічного та гіпотермічного зберігання на сфероїди з клітин плаценти.....	160
3.4.	Дослідження впливу факторів кріоконсервування, субнормотермічного та гіпотермічного зберігання на клітини плаценти в альгінатих сферах.....	168
	Висновки до розділу.....	175
РОЗДІЛ 4.	ДОСЛІДЖЕННЯ ВЛАСТИВОСТЕЙ НАТИВНИХ ТА КРІОКОНСЕРВОВАНИХ ПОХІДНИХ ПЛАЦЕНТИ В СИСТЕМІ <i>IN VITRO</i>	179
4.1.	Дослідження впливу нативних та кріоконсервованих похідних плаценти на культуру фібробластів.....	180
4.2.	Дослідження впливу нативних та кріоконсервованих похідних плаценти на культуру спленоцитів.....	184
4.3.	Дослідження впливу нативних та кріоконсервованих похідних плаценти на культуру нейральних клітин.....	188
4.4.	Дослідження впливу нативних та кріоконсервованих похідних плаценти на органотипову культуру матки.....	196
4.5.	Дослідження впливу нативних та кріоконсервованих похідних плаценти на органотипову культуру яєчників.....	202
	Висновки до розділу.....	207

РОЗДІЛ 5.	ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ КРІОКОНСЕРВОВАНИХ ПОХІДНИХ ПЛАЦЕНТИ НА ПЕРЕБІГ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ГІНЕКОЛОГІЧНОЇ ПАТОЛОГІЇ..	209
5.1.	Дослідження впливу кріоконсервованих похідних плаценти на репродуктивну систему інтактних тварин	209
5.1.1.	Дослідження впливу кріоконсервованих похідних плаценти на естральний цикл та морфологію репродуктивних органів.	209
5.1.2.	Дослідження впливу кріоконсервованих похідних плаценти на фертильність.....	212
5.2.	Дослідження впливу кріоконсервованих похідних плаценти на перебіг експериментальної гінекологічної патології	213
5.2.1.	Дослідження впливу кріоконсервованих похідних плаценти на перебіг запальних процесів	213
5.2.2.	Дослідження впливу кріоконсервованих похідних плаценти на перебіг аутоімунної патології (антифосфоліпідний синдром).....	218
5.2.3.	Дослідження впливу кріоконсервованих похідних плаценти на перебіг ендокринної патології (синдром полікістозних яєчників).....	224
5.2.4.	Дослідження впливу кріоконсервованих похідних плаценти на перебіг травми та ішемії (перекрут яєчників).....	229
5.2.5.	Дослідження впливу кріоконсервованих похідних плаценти при синдромі передчасного виснаження яєчників після хіміотерапії.....	232
5.2.6.	Дослідження впливу кріоконсервованих похідних плаценти на прояви ускладнень після операцій на жіночих статевих органах.....	242
	Висновки до розділу.....	248
	АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ.....	250

ВИСНОВКИ.....	265
ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ.....	268
ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	270
ДОДАТОК А. Список публікацій за темою дисертації.....	308

СПИСОК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

7 AAD - 7-Aminoactinomycin D

CD –cluster differentiation (кластер диференціювання)

DMEM – Dulbecco's modified eagle medium

EB – ethidium bromide

FBS – fetal bovine serum (фетальна бичача сироватка)

FDA – fluorescein diacetate

GMP – good medical practice

MTT – 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

PBS – Phosphate buffer saline (фосфатно-сольовий буфер)

PCR –polymerase chain reaction (полімеразна ланцюгова реакція)

АФС - антифосфоліпідний синдром

ГЕК - гідроксиетилкрахмал

ДМСО – диметилсульфоксид

ЕП – експланти плаценти

ІЛ – інтерлейкін

ІФА – імуноферментний аналіз

КЕП – криоконсервовані експланти плаценти

ККП – криоконсервовані клітини плаценти

КП – клітини плаценти

КП – клітини плаценти

ЛДГ – лактатдегідрогеназа

ЛФ – лужна фосфатаза

МКА – моноклональні антитіла

МСК – мезенхімальні стромальні клітини

MTT - 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

НТБ –низькотемпературний банк

Од ОЩ – одиниці оптичної щільності

ПВП – полівінілпіролідон

ПВЯ – передчасні виснаження яєчників

ПЕГ – поліетиленгліколь

ПЕО – поліетіленоксид

ПЯ – перекрут яєчників

РБТЛ – реакція бласттрансформації лімфоцитів

СПКЯ – синдром полікістозних яєчників

УО – умовні одиниці

ХГЛ – хор іонічний гонадотропін людини

ХТ – хіміотерапія

ЭКЗ – екстракорпоральное запліднення

ВСТУП

Актуальність теми. Розвиток клітинної, тканинної терапії та експериментальної медицини неможливий без методів кріоконсервування та низькотемпературного зберігання клітин, тканин та біоінженерних конструкцій [142, 292]. Саме вони можуть забезпечити наявність необхідної кількості та різноманітності зразків матеріалу в біобанку, можливість транспортування, біобезпеки за рахунок належного тестування на відсутність збудників інфекційних хвороб [7, 9]. Ці потреби обумовлені необхідністю мати безпечний, гістосумісний, ефективний матеріал для лікування будь якого пацієнта.

Перспективним джерелом клітин, тканин, та біологічно активних речовин для клінічного застосування є плацента [228, 280]. По перше це обумовлено можливістю отримання великої кількості біоматеріалу без шкоди для донорів [319]. По-друге тканини та клітини плацентарних структур, які регулюють та забезпечують взаємоіснування матері та плоду мають великий проліферативний потенціал, здатність до синтезу багатьох регуляторних факторів та містять достатню кількість стовбурових клітин [224]. По-третє клітини та тканини плаценти по суті є природним трансплантатом як в на половину генетично чужорідному організмі матері, так і в повністю чужорідному, що доводить факт успішності програм екстракорпорального запліднення з донацією яйцеклітин [274]. Окрім існування плаценти в матці під відомий факт депортації трофобласту та довгострокового існування екстраплацентарного трофобласту в організмі при фізіологічному перебігу вагітності [90]. Ці процеси забезпечуються зниженою експресією клітинами плаценти ряду антигенів, синтезом регуляторів, що призводить до зміни місцевої і загальної імунної відповіді [302]. На даний час за даними U.S. National Library of Medicine [299] та U.S. National Institutes of Health [298] зареєстровано близько 16000 досліджень та 400 клінічних випробувань, присвячених похідним плаценти. Більшість з них присвячено клітинам кордової крові та ізольованим клітинам плаценти, оболонки, пуповини,

менше – плідним оболонкам, екстрактам, сироватці кордової крові та амніотичній рідині [280]. Найчастіше похідні плаценти застосовувались при патології ендокринної, нервової системи, органів зору, кровотворення, при аутоімунних станах, ішемічних, дистрофічних та дегенеративних порушеннях [195, 228, 327].

Важливою особливістю плацентарних структур є їх тропність до органів жіночої статеві системи, що обумовлено синтезом ряду гормонів та цитокінів [273]. Продemonстровано, що під час вагітності та після неї змінюється функціонування організму жінки, та перебіг ряду хвороб [17, 82]. Похідні плаценти неодноразово застосовувалися при лікуванні акушерської та гінекологічної патології. Доведено доцільність використання похідних плаценти при передчасному виснаженні яєчників, в тому числі після хіміотерапії, безплідді [74, 314], наслідках запального процесу, спайковій хворобі в малому тазі [14, 35], патологічному клімаксі [192], патології гестаційного періоду [15, 22]. Продemonстрована ефективність терапії препаратами плаценти при імунологічному конфлікті при вагітності, невиношуванні вагітності [1]. При цьому механізми дії кріоконсервованих препаратів плаценти не завжди з'ясовані, отримані на різних об'єктах данні не є стандартизованими [10, 129, 223]. Поглиблення цих досліджень дозволить визначити механізми впливу похідних плаценти на жіночий організм в нормі, при патологічних станах, чіткі показання та протипоказання до їх в клініці, виявити ефективність при різних захворюваннях.

Необхідність пошуку нових методів лікування хвороб жіночої статеві сфери та підвищення фертильності обумовлено демографічною ситуацією як в Україні, так і в світі [312]. За матеріалами ВООЗ близько 8-12% подружніх пар неплідні [323, 73], запальні хвороби мають хоч раз у житті мали більшість жінок [65, 120], частота тяжких гормональних порушень за останні роки значно зросла [16], 15% вагітностей завершуються абортами [135]. У рамках 70-ї сесії Генеральної Асамблеї ООН у Нью-Йорку серед цілей сталого розвитку на 2016-2030 в медичній сфері на першому місці стоять

зниження материнської та дитячої смертності до 1 року [297]. В Україні, незважаючи на реальні успіхи програми «Репродуктивне здоров'я нації» показники жіночого здоров'я ще відстають від європейських [6].

Існуючи методи лікування гінекологічної та акушерської патології не забезпечують 100% ефективності, тому потребують вдосконалення та пошуку нових шляхів подолання проблеми [175, 255]. Проблеми низькотемпературного зберігання клітин є досить вирішеними, але за відсутності методів зберігання багатоклітинних структур, тканин та органів до половини донорського матеріалу не може бути трансплантовано [142]. Низькотемпературне зберігання похідних плаценти розробляється з цілями збереження діагностичного матеріалу, ауто- та аллобанкінгу, для подальшого виділення стовбурових клітин [157, 269, 262].

Таким чином актуальними та невирішеними є проблеми кріоконсервування і низькотемпературного зберігання різних похідних плаценти, на основі розуміння пошкоджуючої дії факторів та з'ясування механізмів впливу кріоконсервованих похідних плаценти на статеву систему, перебіг експериментальних гінекологічних захворювань для створення нових методів лікування.

Зв'язок з науковими програмами, планами, темами. Робота виконана в Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України в рамках науково-дослідних робіт «Вивчення механізмів кріостійкості тканин та екстрактів плаценти до дії низьких температур» (ДР №0109U00277), «Проведення наукових досліджень, розробка та втілення інформаційних, організаційних та технічних заходів, необхідних для збереження і використання наукового об'єкта – низькотемпературного банку біологічних об'єктів» (ДР № 0104U006441), «Дослідження геропротекторної та геротерапевтичної дії плацентарних біооб'єктів» (ДР № 0114U00131), «Генетична модифікація та довгострокове зберігання клітин плаценти для клінічного застосування» (ДР № 0113U002955, Україно-Німецький проект),

«Нейропротекторний потенціал плацентарних кріоконсервованих мезенхімальних стовбурових клітин, екстракту, сироватки кордової крові при ураженнях спинного мозку» (Україно-Словацький проект).

Мета дослідження.

Визначити закономірності впливу факторів кріоконсервування та низькотемпературного зберігання на морфофункціональні характеристики похідних плаценти, що можуть бути застосовані у медичній практиці та вивчити їх вплив на перебіг експериментальної гінекологічної патології на моделях найбільш розповсюджених та соціально значущих захворювань.

Задачі дослідження:

1. Визначити стабільність структурних та функціональних характеристик похідних плаценти, що можуть бути застосовані в медичній практиці (експлантів, клітин в суспензії, в сфероїдах та інкапсульованих в альгінатних сферах) після їх отримання.
2. Провести оцінку впливу субнормотермічного (20°C) та гіпотермічного (4°C) зберігання на структуру, життєздатність, метаболічну активність, культуральні характеристики похідних плаценти при їх короткочасному зберіганні та транспортуванні.
3. Дослідити збереженість морфофункціональних характеристик та особливості ушкодження різних похідних плаценти при кріоконсервуванні в залежності від їх структури.
4. З'ясувати вплив кріозахисних середовищ з різним складом на збереженість клітин плаценти при кріоконсервуванні.
5. Встановити вплив різних режимів кріоконсервування та коливання температур при низькотемпературному зберіганні на морфофункціональний стан клітин плаценти.
6. Оцінити вплив клітин та експлантів плаценти на ізольовані компоненти жіночої статеві системи та систем її регуляції (органотипові культури яєчників, маток, фібробласти, нервові клітини, спленоцити) *in vitro*.
7. Порівняти властивості свіжовиділених та кріоконсервованих клітин та

експлантів плаценти у системі *in vitro*.

8. З'ясувати вплив кріоконсервованих експлантів плаценти на естральний цикл, структуру яєчників, маток та фертильність здорових експериментальних тварин.
9. Встановити в експерименті вплив кріоконсервованих експлантів плаценти на перебіг розповсюдженої та соціально значущої гінекологічної патології (інфекційний процес, передчасне виснаження яєчників, ішемічне ураження яєчників, синдром полікістозних яєчників, атифосфоліпідний синдром, операційна травма).

Об'єкт дослідження: вплив кріоконсервованих похідних плаценти на перебіг гінекологічної патології.

Предмет дослідження: структурні та функційні характеристики експлантів плаценти, клітин, сфероїдів, альгінатних сфер, що містять клітини плаценти при кріоконсервуванні та низькотемпературному зберіганні та їх вплив на перебіг експериментальної гінекологічної патології на моделях найбільш розповсюджених та соціально значущих захворювань.

Методи дослідження. В дисертаційній роботі застосовано ряд сучасних методів дослідження. Для отримання та характеристики похідних плаценти застосовувались методи культивування клітин, тканин, світлову, конфокальну лазерну скануючу мікроскопію, проточну цитометрію, біохімічні методи. Для оцінки впливу факторів кріоконсервування застосовували програмне заморожування, кріомікроскопію, методи повільного та швидкого заморожування. Для оцінки впливу похідних плаценти на жіночу репродуктивну систему застосовували моделювання патологічних станів на лабораторних тваринах, гістологічні, морфометричні, біохімічні методи. Використовували комп'ютерну обробку зображень, даних конфокальної мікроскопії, проточної цитометрії, статистичну обробку даних.

Наукова новизна одержаних результатів. У дисертаційній роботі вперше проведено комплексне теоретичне обґрунтування, вирішення проблеми кріоконсервування, гіпотермічного зберігання похідних плаценти

(експлантів, клітин в суспензії, в сфероїдах та інкапсульованих в альгінатних сферах) та їх застосування при найбільш розповсюдженій та соціально значущій гінекологічній патології в експерименті.

Вперше проведена оцінка перспективності застосування різних похідних плаценти в медичній практиці на основі їх морфофункціональних характеристик: встановлено, що експланти, клітини плаценти в суспензії та в альгінатних мікросферах є більш стійкими при культивуванні та низькотемпературному зберіганні, ніж сфероїди, отримані з клітин плаценти, які легко втрачають свою структуру.

Встановлено, що при 20°C експланти, клітини плаценти в суспензії та в альгінатних мікросферах зберігають структуру, життєздатність та метаболічні характеристики 48 годин, сфероїди - 24 години, а при температурі 4°C всі похідні плаценти залишаються збереженими 24 години.

Вперше виявлені особливості механізмів кріоушкодження похідних плаценти в залежності від їх структури: для експлантів характерні розриви мезенхіми та десквамація трофобласту внаслідок росту кристалів льоду, для сфероїдів – відокремлення клітин при взаємодії з кріопротектором та при льодоутворенні, а при інкапсуляції клітин в альгінатні носії кріопротектор може взаємодіяти з альгінатом, змінюючи льодоутворення.

Доведено, що для кріоконсервування клітин плаценти найкращими кріопротекторами є диметилсульфоксид, пропандіол та етиленгліколь. Проведена оцінка можливості кріоконсервування клітин плаценти з кріозахісними середовищами на основі дозволених до клінічного використання препаратів (розчин Рінгера, 0,9% NaCl, Стабізол, Неогемодез, Поліглюкін, Реосорбілакт).

Вперше показано, в системі *in vitro* що середовища, кондиційовані нативними та кріоконсервованими клітинами та експлантами плаценти підвищують метаболічну активність нейроклітин, органотипових культур матки, пригнічують її в культурах яєчників, спленоцитів та не впливають на метаболічну активність фібробластів.

Вперше науково обґрунтовано і сформульовано особливості, показання та протипоказання застосування похідних плаценти при гінекологічній патології. Показано, що імплантація кріоконсервованих експлантів плаценти при несанованому інфекційному процесі, знижує фертильність через підвищене спайкоутворення та активацію гострого запального процесу. Доведено, що імплантація кріоконсервованих експлантів плаценти покращує перебіг експериментальних антифосфоліпідного синдрому, синдрому полікістозних яєчників та передчасного виснаження яєчників після хіміотерапії.

Практичне значення одержаних результатів. У дисертаційній роботі розроблено методи кріоконсервування та гіпотермічного зберігання тканин та тканинно-інженерних структур (патент України № 79009).

Запропоновано методи кріоконсервування та короткочасного гіпотермічного зберігання похідних плаценти, що базуються на основі дозволених до застосування в клінічній практиці речовин (пропандіол, розчин Рінґеру, 0,9% NaCl) та обладнання, які є на устаткуванні більшості лікарень (холодильне обладнання).

Запропоновані методи швидкої оцінки вихідного стану та збереженості після кріоконсервування, гіпотермічного зберігання експлантів, сфероїдів з плаценти, які можуть бути застосовані для інших тканин, багатоклітинних комплексів. Ці методи є перспективними для використання у практиці низькотемпературних банків клітин, тканин та органів.

Визначені особливості кріоушкодження різних багатоклітинних структур дають змогу вдосконалювати методи кріоконсервування тканин, багатоклітинних конструкцій та створювати нові тканинноінженерні конструкції більш резистентні до кріовпливу.

Визначені перспективні напрямки дослідження, доцільність, можливі протипоказання побічні дії до застосування похідних плаценти при патології жіночої репродуктивної системи (патенти України №№ 91122, 107968).

Особистий внесок здобувача. Дисертантом самостійно обрано тему дисертації, об'єкт та предмет дослідження, сформульовані задачі, обрані матеріали та методи дослідження. Проведено патентний пошук, огляд літератури. Самостійно проведені культуральні дослідження, моделювання експериментальної патології на лабораторних тваринах. Самостійно проаналізовані данні проточної цитометрії, лазерної конфокальної мікроскопії, світлової мікроскопії. Проведено статистичну обробку даних. Самостійно автором написано розділи роботи, зроблені висновки та практичні рекомендації.

Автор висловлює подяку акад. НАН України, д.мед.н., професору А.М. Гольцеву, д.мед.н., професору О.В. Грищенко за допомогу у плануванні та побудові роботи, к.б.н. П.М. Зубову, д.б.н. Л.Г. Кулешовій, к.б.н. І. Ф. Коваленко за допомогу в роботі зі спецефічним обладнанням.

В опублікованих зі співавторами наукових роботах особистий внесок здобувача полягає в наступному: в роботах [6, 8, 10, 11, 14, 20, 31, 32, 34-36, 40, 42, 43-46, 51, 52 57, 60-63, 66] в дослідженні морфофункціональних властивостей та кріочутливості похідних плаценти, в роботах [9, 24, 26, 30, 33, 53, 56, 59] в вивченні впливу нативних та кріоконсервованих похідних плаценти на ізольовані компоненти жіночої статеві системи, в роботах [1-5, 7, 12, 13, 15-19, 21, 23, 25, 27-29, 37-39, 41, 47-49, 54, 55, 58, 64-68] в вивченні впливу нативних та кріоконсервованих похідних плаценти на перебіг експериментальної гінекологічної патології.

Апробація результатів дисертації. Загальні положення дисертації доповідались і обговорювались на засіданнях секцій вченої ради, двох семінарах ІПКіК НАН України (2017, 2019), науковому семінарі в медичному університеті м. Ганновера (Німеччина) у 2013 році по матеріалам сумісного проекту «Генетична модифікація та довгострокове зберігання клітин плаценти для клінічного застосування», 47th Annual meeting of cryobiology «Cryo-2010», 17-20 July 2010 (Bristol, United Kingdom), Всероссийской научной школе-конференции «Стволовые клетки и регенеративная

медицина» - 25-26 октября 2010 (Москва), IV Всероссийском симпозиуме с международным участием «Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии» – 21-22 апреля 2010 (Санкт-Петербург), 36-й ежегодной конференции молодых учёных «Холод в биологии и медицине», 22-24 мая 2012 (Харьков), V Всероссийском симпозиуме с международным участием „Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии”, 17-18 мая 2012 (Уфа), конференції «Актуальні питання геронтології та гериатрії», присвяченій пам'яті В.В. Фролькіса (Київ), 25 січня 2013, п'ятому конгресі з біоетики, 23-25 вересня 2013, Київ, III международной научно-практической конференции «Академическая наука – проблемы и достижения», 20-21 февраля, 2014 (Москва), Annual scientific conference «Freezing biological time» Society for Low Temperature Biology 50th Anniversary Celebration, & AGM 2014 8-10 October 2014 (London), 8th international meeting Stem cell network North Rhine-Westphalia 21-22 april 2015 (Bonn, Germany), 24th International medical student`s conferense, 14-16 April 2016 (Krakow, Poland), «Topical issues of new drugs development: XXIII international scientific and practical conference of young scientists and student», 21 april 2016 (Kharkiv), XIII З'їзді онкологів та радіологів України 26–28 травня 2016 (Київ), 40 щорічній конференції молодих учених «Холод в біології та медицині» 23-24 травня 2016 (Харків), Society for Low Temperature Biology 2016, 7 september 2016, (Dresden, Germany), VII Національному конгресі патофізіологів України з міжнародною участю «Патофізіологія і фармація: шляхи інтеграції» 5-7 жовтня 2016 (Харків), VI Національному конгресі геронтологів і гериатрів України, 19-21 жовтня 2016 (Київ), XIV Міжнародній науковій конференції студентів, аспірантів, докторантів, молодих вчених та фахівців «Актуальні питання сучасної медицини» 30–31 березня 2017 (Харків), 8 th International Symposium on Experimental and Clinical Neurobiology June 18-21, 2017 (Kosice, Slovakia), SLTB Science meeting Cambridge 19 - 20 September 2017 (Cambridge, United Kingdom), International scientific conference «Normal and cancer stem cells: discovery, diagnosis and therapy», 5-6 October 2017 (Kyiv),

щорічній науково-практичній конференції з міжнародною участю «Досягнення та перспективи експериментальної і клінічної ендокринології» (сімнадцяті Данилевські читання), 1-2 березня 2018 (Харків), 46th European society for artificial organs congress 3-7 september 2019 Hannover, Germany.

Публікація матеріалів. Загальні положення дисертації викладені у 68 наукових публікаціях. З них 33 статті у наукових фахових виданнях, 4 написано одноосібно, 27 тез матеріалів конференцій, симпозіумів, з'їздів, що засвідчують апробацію дисертації, 5 патентів на корисні моделі, 3 глави монографій, 12 включено до наукометричних баз даних, 4 мають імпакт фактор (8,8; 4,2; 3,5; 3,0), Q1-2 статті, Q2-1, Q3-6, Q4-4.

Об'єм і структура дисертації. Дисертація викладена на 318 сторінках комп'ютерного тексту і містить вступ, анотацію, огляд літератури, розділ «Матеріали і методи дослідження», три розділи власних досліджень, узагальнення, висновки, практичні рекомендації, список посилань, який включає 327 джерел, з них 245 – іноземн, 1 додаток. Робота ілюстрована 31 таблицею і 98 рисунками.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

Плацента людини завжди привертала до себе увагу дослідників експериментаторів та медиків своєю унікальністю та поліфункціональністю. По-перше – це провізорний орган, що забезпечує ріст та розвиток плоду, його формування та адаптацію. По-друге, вона змінює багато процесів в організмі матері, як фізіологічних так і перебіг патологічних процесів – обтяжуючи одні та полегшуючи інші. Трофобласт змінює функції двох організмів з першого місяця вагітності, коли його вага становить менше граму та до 2-3 місяців після пологів, коли всі біологічно активні речовини остаточно виводяться та організм жінки повертається до того стану, який був до вагітності. По-третє, оскільки послід, що виділяється після пологів залишається життєздатним, його розглядають як джерело для отримання активних речовин, клітин та пластичного матеріалу для медичного застосування. З розвитком клітинних, тканинних технологій, теорії та практики стовбурових клітин інтерес до плаценти, як до джерела клітин та тканин підвищився. Це пов'язано не тільки з можливістю отримання великої кількості матеріалу без ускладнень для донорів, а й з особливостями клітин та тканин плаценти.

Враховуючи вищезгадане в огляді літератури розглянуті питання формування, структури та функції плаценти, які дозволяють прогнозувати можливість її застосування, дослідження можливості кріоконсервування похідних плаценти та її застосування при патології жіночої репродуктивної системи, враховуючи особливості плаценти та світовий досвід. Окрема увага приділена термінології та уніфікації уявлень про плаценту та її похідні.

1.1. Сучасні уявлення про плаценту, екстраплацентарні трофобластичні структури та похідні плаценти

Плацента є провізорним органом, що забезпечує обмін між матір'ю та плодом, ріст та розвиток плоду, перебудову материнського організму,

пов'язану з вагітністю. Проліферативна, гормональна активність, можливість отримання великої кількості матеріалу, в тому числі аутологічного завжди привертала до плаценти дослідників тканинної та клітинної терапії [8, 75, 200, 223].

Формування плаценти під час вагітності дає ключ до розуміння її структурних і функціональних особливостей. На стадії 8 бластомерів бластоциста ділиться на ембріобласт і трофобласт. Трофобласт з ембріонаною мезенхімою та судинами формують ворсинки. У той же час відбувається поділ трофобласту на синцитій та цитотрофобласт. Кількість останнього зменшується під час вагітності, що сприяє підвищенню проникності плацентарного бар'єру та полегшенню обміну через нього на вимогу плоду, що зростає. Імплантація та інвазія трофобласту відбуваються завдяки ферментативній деструкції ендометрію і децидуальної оболонки матки. В результаті формуються лакуни, в які відкриваються спіральні артерії. Лакуни, та оболонки спіральних артерій вистилаються трофобластом, що робить їх нечутливими до вазопресорних агентів та перешкоджає формуванню тромбів. Через 6-8 тижнів вагітності ворсинки залишаються лише на плацентарній площадці, інші ворсини атрофуються, формуючи гладкий хоріон, в якому однак залишається велика кількість трофобластичних клітин. Таким чином, плацента формується в основному з ембріональних трофобласту та мезодерми[156, 228, 256].

Структура плаценти. Діаметр плаценти близько 22 см, товщина в центральній частині – 2,5 см, вага близько 470 грамів. Плодова поверхня (хоріальна пластинка) представлена одношаровим амніотичним епітелієм, що вкриває тонкий шар амніотичної мезенхіми, під яким лежить хоріон з більш щільною та васкуляризованою сполучною тканиною, яка переходить в ворсини. Материнська поверхня (базальна пластинка) видна після відокремлення плаценти на рівні якірних ворсин.

Васкуляризація ворсин здійснюється судинами пуповини (одна вена та дві артерії). Ворсини в свою чергу поділяють на третинні (стволові), що

містять судини, сполучну тканину (ембріональну мезенхіму) під шаром трофобласту, та відходять від хоріальної пластини, вторинні, що містять ембріональну мезенхіму, та первинні (термінальні), що складаються лише з трофобласту. Ворсини, що кріпляться до стінки матки називають якірними. Всі ворсини, окрім якірних вільно флотують в міжворсинчастому просторі, омиті материнською кров'ю (рис. 1.1.). Міжворсинчастий простір поділено септами, що вкриті позаворсинчастим трофобластом та фібриноїдом. Плацента людини є гемохоріальною – трофобласт контактує з кров'ю матері. Кров матері відокремлюється від крові матері сінцитіокапілярною мембраною, що формується з трофобласту та стінок судин [147].

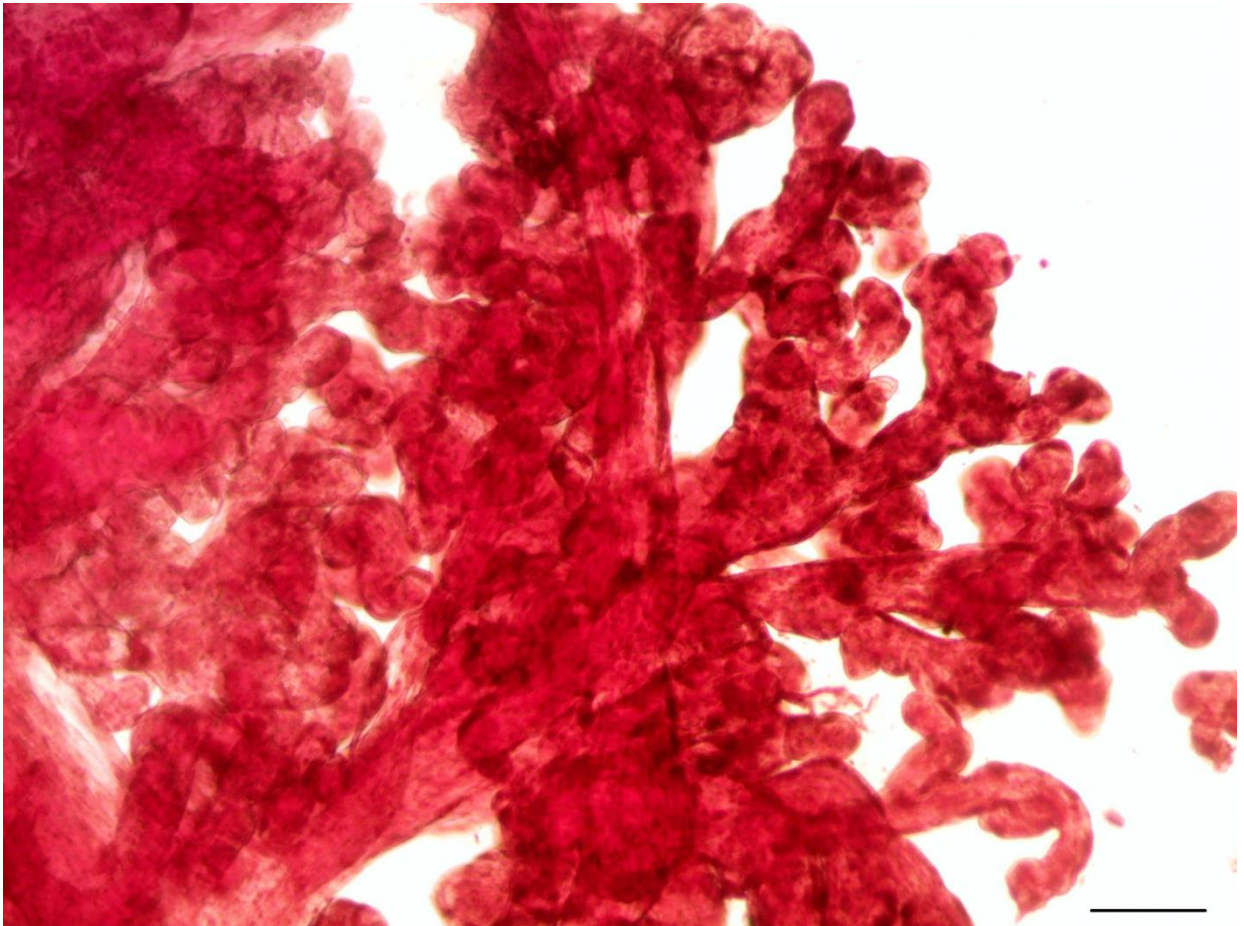


Рис. 1.1. Ворсини плаценти. Нативний препарат, забарвлення нейтральним червоним, масштабна лінійка 100 мкм.

Всього в зрілій плаценті сформовано 60-70 ворсинчастих «дерев»

(дольок, котиледонів) та 10-40 долей. До кожного котилейдону кров подіється спіральними артеріями, та відводиться венами. Важливим є повнота пророщення м'язової оболонки спіральних артерій трофобластом, яке здійснюється під час плацентації (2 хвили інвазії трофобласту). Коли цього не відбувається та спіральні артерії реагують на вазопресорні сигнали та відбувається розвиток страждання плоду та явищ дезадаптації матері до вагітності (пreekлампсія, плацентарна дисфункція та інші) [9, 156].

Основними ворсинчастими структурними елементами плаценти, що визначає її унікальність є трофобласт та ембріональна мезенхіма (рис. 1.2.).

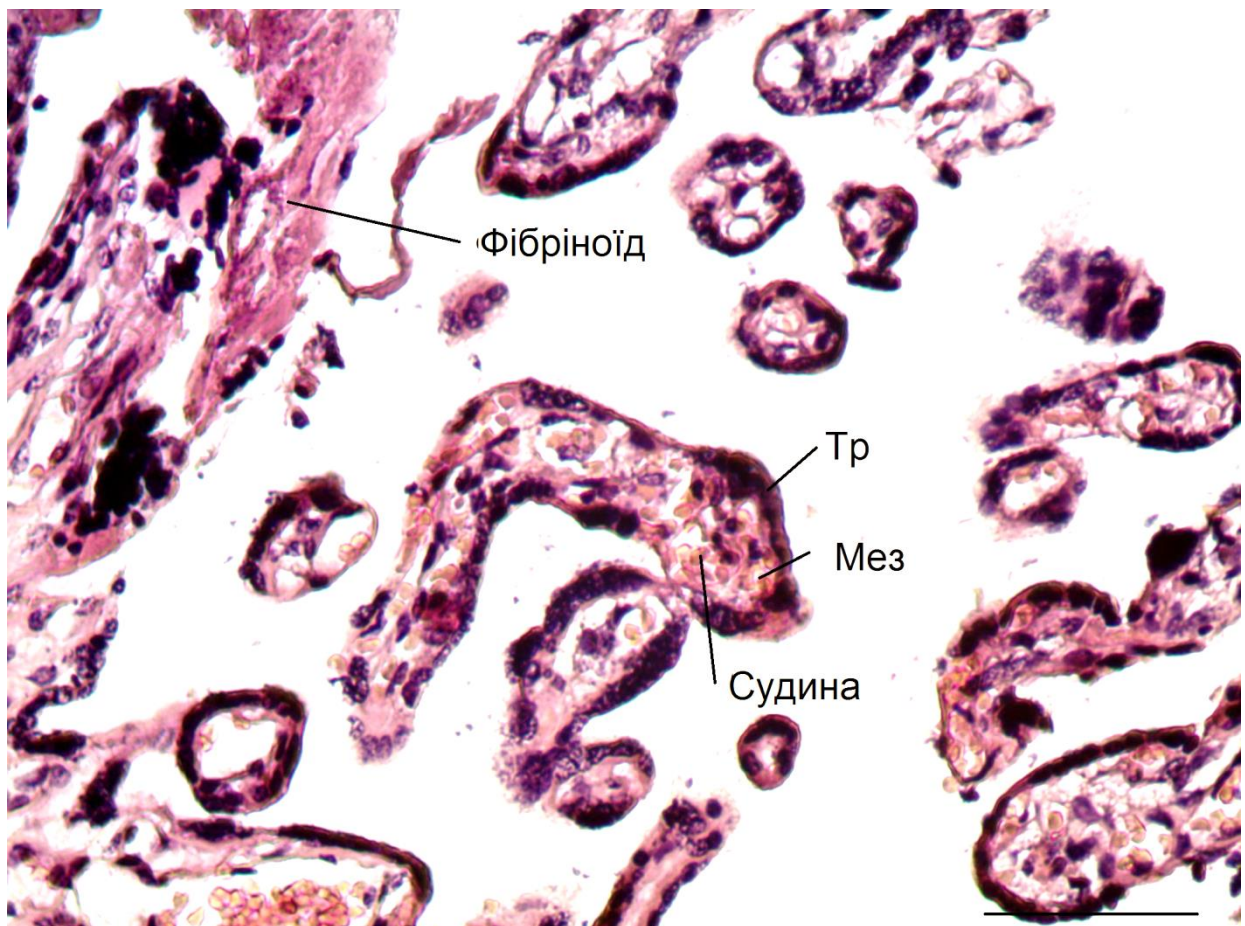


Рис. 1.2. Структура ворсин плаценти: (Тр – трофобласт, Судина – судини, Мез – мезенхіма), забарвлення гематоксилін-еозин, масштабна лінійка – 100 мкм.

Трофобласт, це структура, що безпосередньо контактує з кров'ю та іншими тканинами матері, забезпечує інвазію, секреторні функції, яку поділяють на цитотрофобласт та сінцитіотрофобласт. Клітини цитотрофобласту мають кубічну форму та пов'язані з базальною мембраною. На ранніх термінах вагітності він вкриває всю базальну мембрану, ближче до пологів цитотрофобласт зустрічається окремими скопичуваннями клітин. Виділяють недиференційований цитотрофобласт з невеличкою кількістю органел, та диференційований, метаболічно активний.

Сінцитіотрофобласт є багатоядерним шаром, що з одного боку контактує з базальною мембраною та (або) цитотрофобластом, з іншого - омивається кров'ю матері. В одній плаценті сінцитіотрофобласт являє собою одну структуру.

„Ядро” ворсини становить ембріональна мезенхіма, яка складається з фіксованих та блукаючих клітин (ембріональних макрофагів). Елементи сполучної тканини на ранніх етапах розвитку плаценти можуть диференціюватись в різні клітини (епітелій, макрофаги, осередки кровотворення, міоцити, фібробласти та інші).

Плідні оболонки, що відокремлюють плід з навколоплідною рідиною від матки поділяються на амніотичну та хоріальну. Амніотична оболонка має товщину 20-50 мкм та складається з шару амніотичного епітелію, який вистилає амніотичну порожнину та сполучнотканного шару. Хоріальна оболонка, що контактує з тканинами матки має товщину 100-150 мкм та має декілька сполучнотканних шарів та центральний шар трофобластичних клітин (що походять з ворсин первинного хоріону) (рис. 1.3.).

Пуповина має довжину 40-60 см, товщину 0,7-1,5 см, містить дві артерії та одну вену (рис. 1.4.), в Ватонієвому студні – сполучній тканині з високим вмістом гілауронової кислоти, що не дозволяє судинам пережиматися при рухах плоду чи пологах, вкрита амніотичним епітелієм (рис. 1.5.).

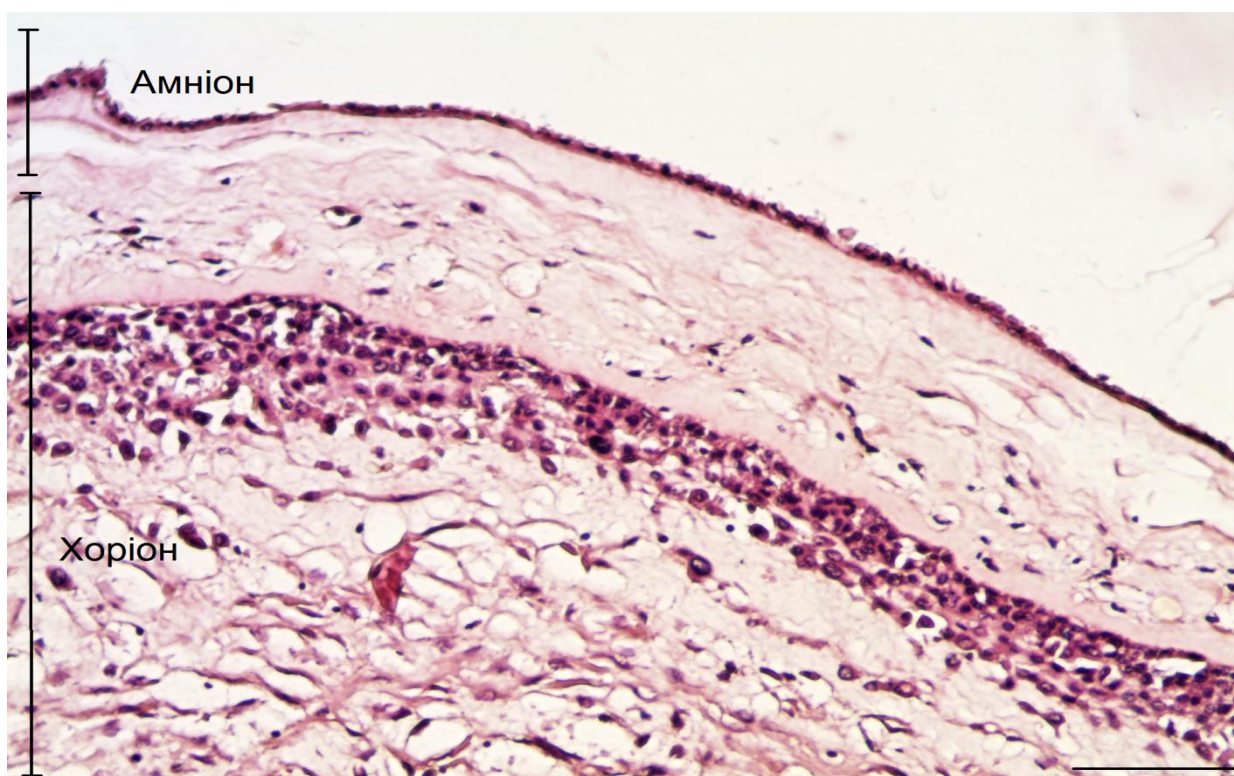


Рис. 1.3. Структура плідних оболонок. Позначені амніотична та хоральна оболонки. Зabarвлення гематоксилін-еозин, масштабна лінійка – 100 мкм.



Рис. 1.4. Структура пуповини. Зabarвлення гематоксилін-еозин, масштабна лінійка – 1 мм.

Імунологічні особливості. Структура плаценти має ряд особливостей, які визначають його функції, а також можливість ефективного застосування в біотехнології. Клітини трофобласту захищені від материнської імунної системи, зменшенням експресії головного комплексу гістосумісності (МНС), здатністю індукувати апоптоз та синтезувати гормони та фактори, що впливають на клітини імунної системи. За даними більшості авторів та баз даних (наприклад, biogps.org), трофобласт та інші клітини плаценти практично не експресують молекули МНС (HLA-A, HLA-B, і HLA-C), які визначаються на всіх ядерних клітинах і беруть участь в презентації антигену, цитотоксичних реакціях. Крім того, трофобласт експресує характерні для вагітності HLA-E, HLA-F і HLA-G. Зокрема, HLA-G, на думку деяких авторів, взаємодіючи з рецептором NKR2B4 пригнічує міграцію клітин NK (природних кілерів), проліферацію Т-лімфоцитів; sHLA-G зменшує кількість абортів. Аналогічні властивості описані для HLA-E, що експресується трофобластом [90, 108, 210, 256, 259, 302].

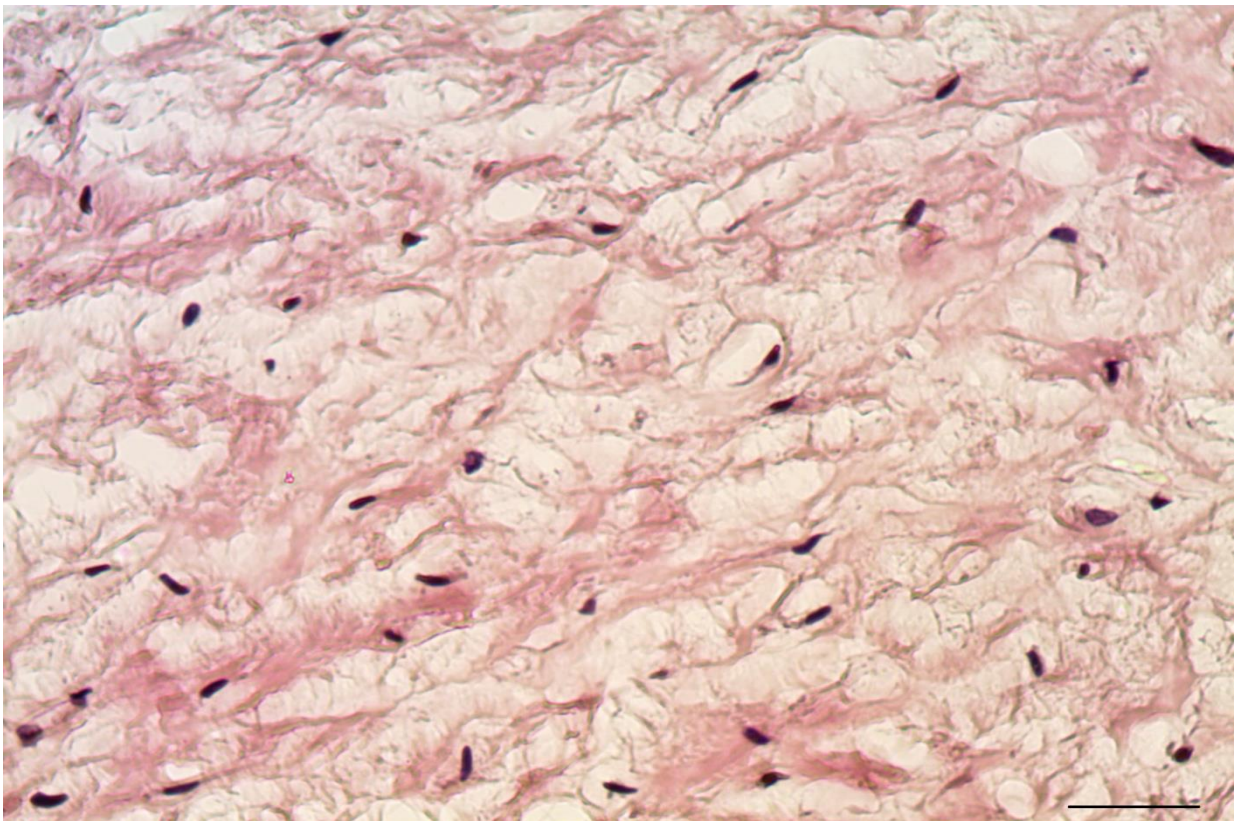


Рис. 1.5. Структура Вартонієвого студню пуповини. Забарвлення гематоксилін-еозин, масштабна лінійка – 100 мкм.

Інший механізми захисту трофобласту від материнської імунної агресії здійснюються через апоптозіндукуючі ліганди FasL і TRAIL, які впливають на імунокомпетентні клітини. Під час вагітності відбувається збільшення кількості Th2-лімфоцитів, що секретують протизапальні інтерлейкіни IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 і IL-13, які стимулюють розвиток вагітності, і зменшення Th1-лімфоцитів які секретують протизапальний гамма-інтерферон, поряд зі зменшенням IL-2 та фактору некрозу пухлин. Це явище обумовлене дією прогестерону, а також здатності плацентарних клітин секретувати ряд цитокінів. Спостерігається також зниження кількості NK клітин, хоча воно компенсується за рахунок активації неспецифічного імунітету. В цілому, вагітність часто супроводжується ремісією ряду аутоімунних захворювань [167, 203, 302].

Ендокринна функція. Трофобластичні клітини синтезують ряд гормонів, таких як естрадіол, прогестерон і хоріонічний гонадотропін, які регулюють ріст і розвиток плода, а також зміни в організмі матері під час вагітності [273]. Ці гормони впливають в першу чергу на репродуктивну та імунну системи, що пояснює терапевтичну ефективність компонентів плаценти при лікуванні відповідних патологій. Естрадіол викликає проліферацію ендометрію та молочних залоз, затримку кальцію, володіє фемінізації антисклеротичну дію, а також впливає на сексуальну поведінку. Основна функція прогестерону в забезпеченні виникнення і збереження вагітності. Він має антипроліферативну дію, щодо ендометрію а також полегшує передменструальний синдром. Хоріонічний гонадотропін є аналогом гонадотропін гормонів, з властивостями лютеїнізуючого і фолікулостимулюючого гормонів. Він має кортикотропні властивості, підтримує розвиток вагітності, а також підвищує стійкість до стресу. Екзогенне введення хоріонічного гонадотропіну людини стимулює овуляцію, синтез естрогенів яєчниками у жінок і синтез андрогенів і сперматогенез у чоловіків [113, 147, 273].

Екстраплацентарні трофобластичні структури.

Вперше здатність трофобласту існувати за межами плаценти описано Schmorl в 1893 році, який знайшов фрагменти трофобласту - «plazentarzellen» в легенях, міометрії та периферійної крові 14 з 17 жінок, що померли від еклампсії, при цьому автор вважав це одним з проявів прееклампсії. Згодом подібні результати були отримані іншими дослідниками. В подальшому було з'ясовано, що явище депортації трофобласту спостерігається при нормальній вагітності. При цьому підвищення депортації при прееклампсії визнається більшістю, не всіма дослідниками [90].

З'ясовано, що в кількість трофобластичних елементів в маткових венах після 6 тижнів вагітності коливається від 0,15 до 51,5 на мл, за добу в кровоток матері потрапляє близько 100000 трофобластів. В периферичній крові, взятої з ліктьової вени трофобласти знаходили не всі дослідники, максимальна кількість – 8 на 1000 клітин крові. Також знайдено трофобласти в кордовій крові у більшості випадків. Такі розбіжності пояснюються різними методами пошуку трофобластів: гістологічний, імунорадіометричний, ізоляція в градієнті перколу чи декстрану, цитофлуориметричний та молекулярно-генетичний методи. Найбільш ефективним був цитофлуориметричний з застосуванням моноклональних антитіл anti-JMB2, anti-H315. На сьогодні методи діагностики, пов'язані виділенням клітин плоду з крові матері вже пройшли клінічні випробування та є доступними для пацієнтів [90, 219].

Розміри та характер часток трофобласту, що потрапляють в материнський кровоток досить різні. Їх поділяють на фрагменти клітинного розміру (cell-sized) та фрагменти розміру нуклеїнових кислот (nucleid acid-sized). До перших відносять синцитіальні агрегати, розміром 20-200 мкм, які містять 2-50 ядер, можуть бути як симпластом, так і окремими клітинами, часто осідають в судинах легень та найчастіше знаходяться в матковій вені; мононуклеарні цитотрофобласти, розміром близько 25 мкм; без'ядерні цитоплазматичні елементи, розміром 2-10 мкм. До другої групи відносять

мікрочасточки трофобласту, розміром близько 100 нм, екзосоми, розміром менше 100 нм, фрагменти цитокератину та вільні фрагменти нуклеїнових кислот. Термін перебування похідних трофобласту в організмі поза вагітності встановлений окремо різними групами дослідників та становить близько 49-65 діб для людини, кроля, щура та миші. Елімінація трофобласту з організму, в першу чергу з легень здійснюється за рахунок фагоцитів, «літичного агенту» та механізмів апоптозу [90, 219].

Функція депортованого трофобласту під час вагітності остаточно не визначена. Вважається, що депортований трофобласт грає роль в формуванні фізіологічної імуносупресії під час вагітності та толерантності по відношенню до плоду [103]. Позаплацентарний трофобласт має спільні риси з плацентарним, який не експресує на своїй поверхні антигени HLA I та II класу, але він іноді здатен експресувати HLA - C та HLA - G, що може вказувати на його функції. Взаємодія багатоклітинних фрагментів з макрофагами призводить до посилення виділення протизапального IL-10 та пригнічення виділення прозапального IL-1 β . Трофобластичні екзосоми в свою чергу призводять до пригнічення активації Т-клітин. Описаний зв'язок апоптотичного плацентарного детриту з ендотеліальною дисфункцією при еклампсії, який пов'язаний з продукцією CAM-1, IL-1 β , 12, 16, TGF-1 β та формуванням «нейтрофільних позаклітинних пасток», але він не є загальновизнаним [84, 90, 219].

Явище депортації елементів фетоплацентарного комплексу, що містить ДНК плоду ефективно застосовується для пренатальної діагностики вад розвитку плоду [97, 149, 307].

Штучні трофобластичні структури неодноразово створювались різними групами дослідників. Метою їх відтворення були експерименти по дослідженню явищ депортації трофобласту, імплантації, міжклітинних взаємодій в плаценті, створення моделі для тестування лікарських засобів.

Одним із перших методів отримання та культивування трофобласту, що застосовується до сьогодні, є метод Н. J. Kliman, 1986 що полягає в

виділенні трофобластів ферментативним способом, культивуванні в середовищі, де вони формують сінцитіальні структури на 3 добу [177].

Розроблені методи отримання експлантів плаценти щура як ручним, так і напівавтоматизованим методами з застосування приборів для подрібнення тканини, умови культивування та критерії життєздатності. Виявлено, що напівавтоматичний метод є більш шкідливим для тканини [141].

Сфероїди з трофобласту людини є більш близькими до природних, навіть до бластоцист, що дозволяє з їх допомогою вивчати процеси імплантації. При цьому способи отримання сфероїдів досить різні: культивування на неадгезивному пластиці, при постійному перемішування, отримання з експлантатів [150].

Найбільш близькою до природних явищ є культивування експлантів плаценти в лунках з сіткою, що відокремлює нижню камеру та має розмір отворів близько 400 мкм [84]. При цьому вдалося отримати структури розміром до 366 мкм, але з апоптичними змінами.

Мікрочастинки трофобласту, розміром від 200 до 600 нм були отримані трьома різними методами: подрібнюванням, перфузією культури експлантатів та плаценти [149]. При цьому частинки, отримані подрібненням індукували апоптоз в шарі ендотеліальних клітин, а мікрочастини, отримані іншими методами – ні.

Найбільш частий метод виділення наночасток трофобласту та екзосом — серія ультрацентрифугування субстрату (наприклад сироватки) в градієнті щільності, або імуномагнітна сепарація. Отримані в градієнті цукрози 1,134-1,173 г/мл та характеризовані екзосоми розміром близько 165 нм. Отримані наночасточки трофобласту, розміром близько 50 нм шляхом перфузії материнської поверхні плаценти, та ізоляцією ультрацентрифугуванням, але для їх виділення з плазми знадобилися імунні методи [124]

Термінологія та визначення трофобластичних структур.

Для похідних природних і штучних похідних трофобласту застосовувалося більше 20 термінів, які не завжди можна адекватно

перекласти: клітини плаценти (plazentarzellen), синцитіальних теги, біти синцитію, синцитіальні бурульки, синцитіальні кластери, синцитіальні згустки, клітинні елементи синцитіотрофобласту, фрагменти трофобласту, синцитіальні фрагменти, синцитіальна капуста (паростки) (syncytial sprouts), синцитіально-подібні маси та агрегати синцитіотрофобластичних ядер, вільні симпласти, трофобласти, експланти, екзосоми, сфероїди, позаплацентарний трофобласт. Враховуючи основні їх властивості, на наш погляд найбільш відповідним в рамках цієї роботи є термін «похідні плаценти», що відображає основні властивості багатьох похідних, відокремлених від плаценти.

Важливими є також розбіжності в загальновизнаних англomовних та вітчизняних термінах. Так, в вітчизняній літературі плацентою називається структура після 20 тижнів, до цього — хоріон, в зарубіжній застосовується термін “рання плацента”, де також не є прийнятний термін “плацентація” (перехід хоріону в плаценту) що викликає непорозуміння. В цей же час поняття «хвилі інвазії трофобласту», яке відображає суть плацентації прийнятне в обох випадках. Окремі клітини цитотрофобласту в англomовній літературі називають «трофобластами», що не зустрічається в вітчизняній, але є зручним для застосування.

Фізіологічні адаптаційні зміни в організмі жінки при вагітності стасуються всіх органів та систем, підвищують адаптаційні можливості, забезпечується взіємоіснування двох організмів, розвиток плоду, змінюється перебіг хвороб [17, 82, 282]. Саме ці явища дозволяють прогнозувати спрямованість та ефективність похідних плаценти при їх клінічному застосуванні.

Маса тіла жінки протягом вагітності зростає в середньому на 10-12 кг, з яких 4-5 кг — маса плода, оболонки, плаценти, 1 кг - грудні залози, 1,5 кг — кров (збільшення об'єму циркулюючої крові), 1 кг — тканинова рідина, 4 кг — жирова тканина [310].

Загальний обмін за споживанням кисню підвищується на 15-20%, білковий обмін, визначений за затримкою азоту підвищується з 1,84 г/добу

до 4,0-5,0 г/добу, вуглеводний обмін інтенсифікується як за рахунок посилення секреції гіпоглікемічних, так і гіперглікемічних гормонів. Підвищується синтез та накопичення ліпідів, активується спонтанний ліполіз. Проходить накопичення мікроелементів, які йдуть як на потреби організму матері, так і плоду. Потреба в деяких вітамінах підвищується в 2-3 рази. Спостерігається тенденція до накопичення води в організмі [205].

В центральній нервовій системі знижується активність кори, підвищується активність парасимпатичної нервової системи.

В ендокринній системі значно збільшується маса та активність гіпофізу, щитоподібної залози, гіпертрофується пучкова зона кори наднирників, посилюється синтез відповідних гормонів та видів обміну. Спостерігається гіпофункція паращитоподібних залоз.

В імунній системі зміни направлені на співіснування з генетично чужорідним плодом та виражаються в пригніченні Т- та В-клітинної ланки. При цьому протиінфекційний захист компенсується за рахунок посилення неспецифічного захисту (макрофагальна відповідь, продукція активних форм кисню та інш.) [108].

В дихальній системі спостерігається розслаблення бронхів та збільшення об'єму вентиляції на 30-40%, що значно перевищує потреби в кисні (які збільшені на 20-30 %) [282].

В серцево-судинній системі спостерігається збільшення об'єму циркулюючої крові на 30-40%, що компенсується збільшенням ударного об'єму серця на 30%, та зниженням судинного опору на 25% [134].

Зміни крові пов'язані зі зменшенням в'язкості та зниженням гематокриту з 42 до 37, остільки кількість еритроцитів збільшується лише на 18-25%, а плазми — до 30%, збільшується й кількість лейкоцитів [112].

Ниркова фільтрація збільшується до 50%, в тому ж числі за рахунок релаксуючої дії гормонів вагітності, підвищується маса нирок. В шлунково-кишковому тракті моторика знижується, сфінктри дещо релаксуються, секреція знижується.

В кістковій системі спостерігається деяка декальцифікація та посилення еластичності, що важливо при пологах та підвищенні маси тіла. Спостерігається розм'якшення сполучної тканини та підвищення еластичності суглобів.

Найбільші зміни стосуються статеві системи. Маса матки змінюється в десятки разів (з 50 до 1200 грамів), гіпертрофується міометрій, ендометрій, збільшується кількість залоз, кровообіг збільшується з 2% об'єму циркулюючої крові до 20%. Спостерігається гіпертрофія яєчників. Овуляція на період вагітності пригнічується, але відновлюється після пологів та лактації. [17, 82]

Крім фізіологічних змін змінюється перебіг патологічних процесів. Полегшується перебіг аутоімунних, ендокринних хвороб, що пов'язується з функцією плаценти та ендокринних залоз плоду, але в подальшому відсутність терапії може превести до загострення або захворюваності матері та новонародженого [158, 176]. Підвищену кількість інфекційних захворювань пов'язують зі зміною кислотності піхви та розслабленню сечовивідних шляхів під дією гормонів плаценти [182], втім кількість запальних захворювань яєчників знижується. Підвищене навантаження на серцево-судинну систему та печінку може призводити до токсикозів вагітності та подальшій захворюваності [131, 134]. Змінюється також фармакокінетика окремих препаратів [199].

Вплив вагітності на подальше життя жінки. Окрім змін, що відбуваються в жіночому організмі під час вагітності та лактації, ці процеси змінюють подальше функціонування жіночого організму [101]. Так, доведено, що жінки, які народжували кілька разів, чи народжували після 40 років мають більше шансів дожити до 90 років. Вагітність, пологи та лактація зменшують вірогідність виникнення раку молочної залози, ендометрію та яєчників, в той же час багато вагітностей (більше трьох) є фактором ризику раку шийки матки. Як правило у жінок з первинним непліддям, яке закінчилося вагітністю наступні вагітності настають легше, тому практично

всі класифікації непліддя ділять його на первинне та вторинне. У жінок, що малу гінекологічні проблеми та народжували після вагітності частіше проходять сексуальні розлади, порушення оваріально-менструального циклу, рідше зустрічається передменструальний синдром, пізніше настає менопауза [137, 175, 270].

Все це свідчить про багатофакторний вплив плаценти та вагітності на організм жінки та відкриває перспективи її застосування в медичних цілях.

1.2. Кріоконсервування плацентарного матеріалу

На сьогодні до половини донорського матеріалу не може бути трансплантовано, чи застосовано іншим шляхом через недосконалість методів зберігання. Більшість стратегій збереження біоматеріалу пов'язані з застосуванням низьких температур: субнормотермічних (20°C), гіпотермічних ($4-8^{\circ}\text{C}$), колонульових, температурах холодильного обладнання ($-10 - -140^{\circ}\text{C}$), температурі рідкого азоту (-196°) [115, 142].

Необхідність низькотемпературного зберігання плацентарного матеріалу пов'язана з рядом потреб. Перед усім довгострокове зберігання похідних плаценти необхідно для безпечного та раціонального клінічного, лабораторного та експериментального застосування. Життєздатний нативний матеріал може бути застосований лише впродовж кількох годин після отримання, в той же час для мікробіологічного тестування потрібно не менше тижня. Для підбору препаратів за системою HLA та зручності пацієнтів необхідно мати низькотемпературний банк з великою кількістю матеріалу [9]. При використанні плацентарного матеріалу для дослідницьких цілях, чи при тестуванні лікарських засобів доцільно також мати доступну велику кількість різного матеріалу. Для діагностичних цілей біопсійного матеріалу при транспортування в віддалену лабораторію чи одночасній постановці тестів з декількома зразками для економії працезатрат персоналу також доцільне застосування низькотемпературного зберігання.

Важливим аспектом є необхідність застосування при консервуванні технологій та матеріалів, дозволених для використання в клінічній практиці, в той час як сироватки тварин, живильні середовища та ряд кріопротекторів не дозволені для клінічного використання [142, 179, 275, 292, 308].

На даний період часу накопичено деякий досвід низькотемпературного зберігання окремих компонентів кордової крові, екстракту плаценти, окремих клітин плаценти, експлантів плаценти та фрагментів плаценти різного розміру.

Кріоконсервування безклітинного плацентарного матеріалу.

При кріоконсервуванні сироватки кордової крові продемонстровано, що заморожування при швидкостях охолодження $-1-2^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ до кінцевих температур -20°C та -80°C призводить до агрегації білкових компонентів та зв'язування білками більшої кількості води, в той же час, як швидке охолодження зі швидкостями $300-400^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ дозволяє наблизити вміст білків сироватки до нативного, при цьому мінімальна швидкість охолодження, яка дозволяє зберегти вміст білків, це $-100^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ [28]. При двохетапній програмі кріоконсервування вміст та біологічна активність деяких речовин (пролактин, хоріонічний, гонадотропін) знижується при охолодженні до $-20^{\circ}\text{C}/\text{хв}$, та ще більше при охолодженні потім до $-196^{\circ}\text{C}/\text{хв}$, короткострокове зберігання можливе при обох температурах. Зберігання сироватки кордової крові протягом року при $-20^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ призводить до прогресування змін, що виникли при охолодженні, а при $-196^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ забезпечує стабільність вмісту [127].

При вивченні кріоконсервування сироватки кордової крові та екстракту плаценти доведено, що найбільш несприятливими режимами для них є низькі швидкості охолодження ($1-7^{\circ}\text{C}/\text{хв}$), при яких макромолекули до 12 кДа формують агрегати від 120 до 300 кДа, тому автори пояснюють цей процес порушенням міжмолекулярних зв'язків. Оптимальним методом заморожування автори визнають $-100^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ з додаванням кріопротекторів

(гліцерол, або 1,2 пропандіол), які зміцнюють міжмолекулярні зв'язки, утворюючи “шубу” та попереджують як агрегацію білків, так і зменшення активності ферментів та гормонів [28].

Продemonстровано, що при низькотемпературному консервуванні кріоекстракту плаценти білки та статеві гормони можуть бути збережені в концентраціях подібних до нативних не більше 10 діб при -20°C , а при -196°C - більше року [Перчик О.А. 2004]. Властивості екстрактів, отриманих з тканини, що зберігалася при -196°C , не залежать від строку зберігання (як мінімум протягом 1 року). Зберігання екстрактів при -196°C , -80°C і -20°C приводить до збільшення відносного вмісту високомолекулярних білків для всіх типів плацент, причому після зберігання при -20°C ці зміни найбільш виражені. Встановлено, що вже після 7 доби зберігання екстрактів плаценти при температурі -20°C із подовженням строку зберігання відбувається збільшення вмісту в них продуктів ПОЛ і окисленого гемового заліза. Дослідження кінцевих температур і строків зберігання екстрактів плаценти на їх гемолітичну активність показало, що така активність знижується в межах вивченого строку зберігання (1 рік) при -196°C і в межах до 30 днів зберігання при -20°C . Більш тривале зберігання екстрактів при -20°C викликає збільшення гемолітичної активності з ростом строку зберігання, що корелює зі збільшенням вмісту продуктів перекісного окислювання. При зберіганні екстрактів плаценти при температурах -196°C та -80°C їхня здатність до підвищення осмотичної та кислотної стійкості еритроцитів залишається [36].

При дослідженні впливу довгострокового низькотемпературного зберігання плацентарного фактору росту його активність та концентрація не знижується протягом 36 місяців [188]. Розроблено методи кріоконсервування амніотичної рідини [284].

Кріоконсервування суспензій клітин плаценти.

При кріоконсервуванні культури цитотрофобласту продемонстровано зниження рівня секреції хоріонічного гонадотропіну людини, який автори

пояснюють морфологічними пошкодженнями та затримкою диференціювання [215, 305].

Запропоновано метод кріоконсервування суспензії клітин плаценти шляхом еквілібрації з розчином “Пропандісахароль” охолодженням до -40°C зі швидкістю $1-2^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ з наступним зануренням у рідкий азот. При цьому вдавалося досягти великої життєздатності макрофагальних елементів (до 90%) та клітин плаценти [145].

Рядом авторів проведено масштабні дослідження щодо кріоконсервування та довгострокового зберігання суспензій плацентарних клітин в технологіях отримання стовбурових клітин. У якості кріопротекторів найбільш доцільним визнано застосування диметилсульфоксиду, при цьому оптимальними концентраціями визнано від 2 до 10%, коли спостерігається максимальна збереженість та мінімальний токсичний ефект. При концентраціях менш 2% збереженість та вітальні характеристики клітин різко знижуються, а при більше 10% різко зростає токсичний ефект, крім того підвищена концентрація диметилсульфоксиду призводить до стимуляції диференціювання ряду клітин у напрямку кардіоміоцитів. Для підвищення ефективності можливе застосування диметилсульфоксиду сумісно з гідроксиетилкрахмалем [209].

Оптимальною концентрацією клітин перед заморожуванням визнається $0,5 \times 10^6/\text{мл}$. Важливим є також правильний вибір контейнеру для кріоконсервації, який би був герметичним, що досягається сплавленням матеріалу чи мав вторинну упаковку, та кріостійким, так за даними до 9,6 % контейнерів мають ушкодження при довгостроковому зберіганні та до 42% препаратів мають бактеріальну забрудненість. При порівнянні швидкостей охолодження пріоритет віддається повільному охолодженню зі швидкістю $1^{\circ}\text{C}/\text{хв}$, при застосуванні більших швидкостей життєздатність різко зменшується (апробовані $5^{\circ}\text{C}/\text{хв}$, $10^{\circ}\text{C}/\text{хв}$, $40^{\circ}\text{C}/\text{хв}$, $100^{\circ}\text{C}/\text{хв}$), програмне заморожування має перевагу перед неконтрольованим охолодженням. Для розморожування найбільш доцільно застосовувати максимальні швидкості з

застосуванням водяної бані. В ряді випадків доцільно кріоконсервувати фрагменти тканин з наступним виділенням клітин. [209]. Маються окремі данні про успішність вітрифікації клітин плаценти [213].

Кріоконсервування фрагментів плаценти.

Досліджено можливість кріоконсервування та трофобластичних елементів корови з кріозахисними середовищами, які містили гліцерол, сахарозу, 1,2 пропандіол, вивчалися можливості застосування вітрифікації, ультрашвидкого заморожування та короточасного гіпотермічного зберігання при температурі 4°C. Продemonстровано низьку кріочутливість трофобластичних структур та можливість застосування різних способів низькотемпературного зберігання з незмінно великою збереженістю трофобласту [114, 136, 160].

При вивченні впливу гіпотермічного зберігання при температурі 4°C на морфофункціональний стан фрагментів плаценти виявлена можливість зберігання нативних фрагментів протягом 24 годин, а деконсервованих — протягом 12 годин з мінімальними ушкодженнями. При низькотемпературному кріоконсервуванні оптимальним кріопротектором дослідники вважають 8% ДМСО [9].

При кріоконсервуванні тканини плаценти за двохетапною програмою під захистом диметилсульфоксиду продемонстровано досить високу збереженість фрагментів плаценти за ознаками вітального забарвлення, вмісту гормонів та морфологічними ознаками [9]. Пізніше у 2000 році Грищенко В.І. та співавторами, запропоновано спосіб кріоконсервування тканин фетоплацентарного комплексу, в тому числі плаценти, за яким тканину плаценти промивали середовищем, фрагментували до 2x3 см, інкубували в розчині 10% диметилсульфоксиду та 10% поліетиленоксиду, заморожували від кімнатної температури до 0°C, потім до - 10°C зі швидкістю 5-6°C/хв, після 1-2 годинної витримки — занурення у рідкий азот. При цьому життєздатність клітин була 86,4%, показники лактатдегідрогенази та глюкозо-6-фосфат-дегідрогенази збережені. На основі цих розробок було

запропоновано медикоімунбіологічний препарат «Платекс-плацентарний», який дозволений до клінічного використання в Україні [7, 8, 9, 13].

С ціллю зменшення токсичності кріозахисних середовищ та підвищення збереженості фрагментів плаценти та можливості застосування препаратів в клінічній практиці, що передбачає застосування препаратів дозволених в медичній практиці [292] було запропоновано застосовувати в плазмозамінні розчини, що мають кріозахисні властивості [9]. При цьому найбільша морфофункційна збереженість тканини плаценти та окремих її клітин була досягнута при застосуванні кріозахистного середовища, що містило 5% ДМСО, 5% гідроксиетилкрохмалю та застосуванні трьохетапної програми заморожування (повільне охолодження, ініціація кристалоутворення - сідінг та швидке охолодження, шляхом занурення у рідкий азот). Можливим визнано кріоконсервування за даною програмою з застосуванням лише гідрокриетилкрохмалю, чи комбінації 5% ДМСО з 6,8% сахарозою. Розчини полівінілпіролідну, сорбітолу та декстрану не дозволяли зберегти цілісність тканини плаценти.

Запропоновано метод кріоконсервування хоріальної тканини [11], для якого застосовується 5% диметилсульфоксид та 5% поліетиленоксид, після 20 хвилинної експозиції тканини при -20°C її занурюють у рідкий азот. При цьому зберігається 85% життєздатних клітин та кількість пікнотичних ядер не перевищує 25%.

В. Huppertz et al., 2011 запропоновано метод кріоконсервування експлантів плаценти для фармакологічних досліджень з застосуванням 3 молярного диметилсульфоксиду. Автори стверджують недоцільність програмного заморожування, яке на їх думку ускладнює процес. Оцінювали життєздатність, морфофункціональну цілісність за гістологічними дослідженнями, синтезом лактатдегідрогенази, виділення патологічного протеїну P13. Вдалося зберегти функціональну цілісність клітин, але не тканини. Найбільш частими ушкодженнями були розриви сполучної тканини та відшарування трофобласту [157].

Зберігання тканини плаценти при -196°C приводить до збільшення відносного вмісту високомолекулярних білків в екстрактах із всіх типів. У процесі зберігання тканини плаценти при -20°C зростає відносний вміст білків з молекулярною масою менш 80 кДа [36]. Максимальне насичення тканини плаценти кріопротекторами відбувається за 20 хвилин при температурі близько 4°C [5]. Доведено, що після тижневого низкотемпературного зберігання плаценти її механічні характеристики не порушуються [178].

Окремим напрямком кріоконсервування плацентарних об'єктів є виділення клітин з кріоконсервованого матеріалу [183, 320]. продемонстровано збереження фенотипу клітин, але зменшення їх кількості [262, 269].

1.3. Дослідження та застосування препаратів плаценти в клінічній практиці

Багатокомпонентний клітинний та біохімічний состав плаценти, її можливість виконувати різні функції, здатність контролювати численні процеси в організмі матері та плоду, змінюючи їх, компенсуючи та перестроюючи завжди надихав дослідників на застосування препаратів плаценти в клінічній практиці [8, 63, 223].

Перевагами плацентарних структур, які дозволяють їх застосовувати в клінічній практиці завжди були: поліфункціональність структур плаценти, генетична спорідненість з організмом людини та низька імуногенність, наявність великої кількості біологічно активних речовин та біостимуляторів, функціональні та механічні властивості, доступність великої кількості матеріалу, відсутність етичних проблем при отриманні матеріалу. Дослідники застосовували в своїх роботах різні структури: тканини плаценти, амніотичну та хоріальну мембрани, пупочний канатик, амніотичну рідину, екстракти, ліофілізати плаценти, сироватку кордової крові, різні типи диференційованих та стовбурових клітин [7, 223, 280] (рис. 1.6.).

Їх застосовували як в нативних формах, так і після хімічної, термічної обробки, кріоконсервації, сублімації, які на нашу думку доцільно поділити на та життєздатні девіталізовані форми. При цьому продемонстровано більш низьку імуногенність, довгий період деградації та більшу клінічну ефективність для консервованих препаратів. На сьогоднішній час найбільш ефективним методом збереження безклітинних, клітинних та тканинових препаратів плаценти є кріоконсервація [142, 292].

Способи застосування були досить різні: підшкірне введення, внутрішньом'язове, внутрішньовенне, інтраопераційне, як біопокриття та замісний матеріал, навіть пероральне застосування. Сферами застосування структур плаценти були хірургія, офтальмологія, терапія, ендокринологія, косметологія, дерматологія, неврологія та психіатрія, геріатрія, андрологія, ветеринарія, навіть рослинництво [86, 223, 280].

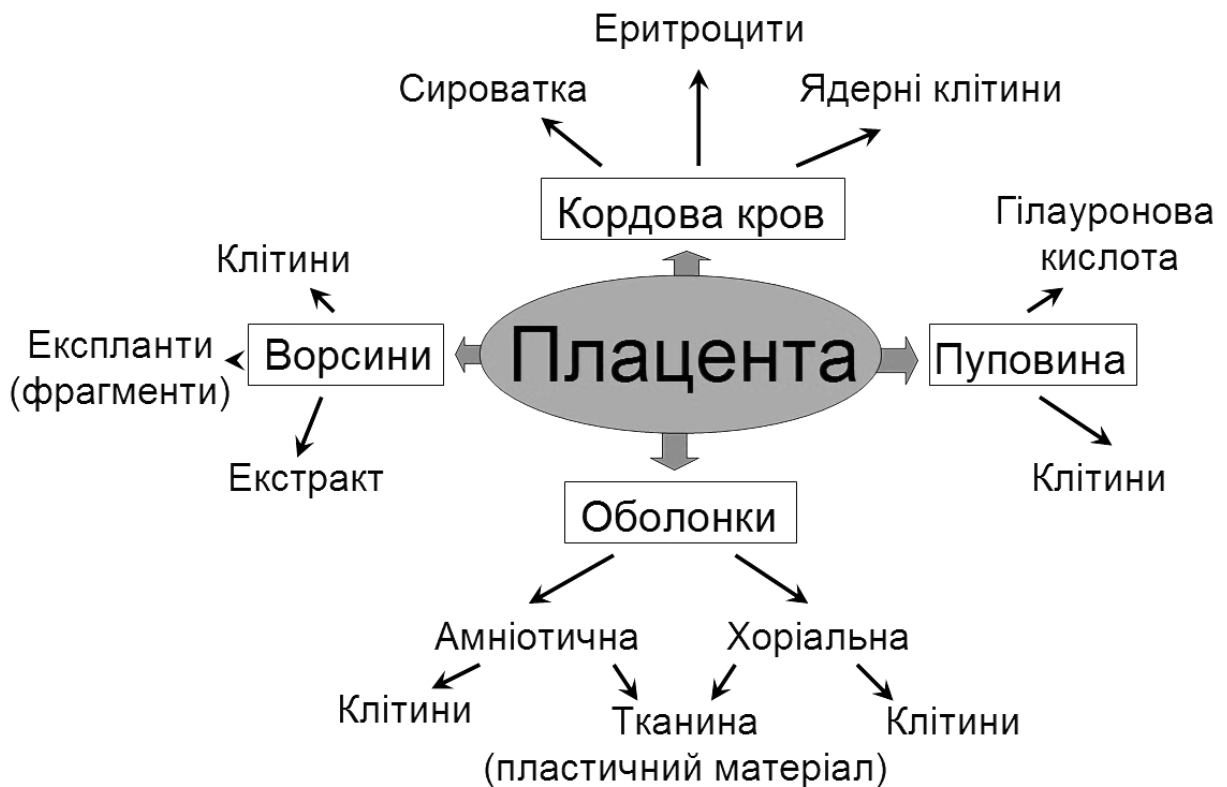


Рис. 1.6. Застосування різних похідних плаценти в медичній практиці.

Особливе місце в дослідженні та застосуванні препаратів плаценти займає акушерство та гінекологія [89]. Це пояснюється по перше тим, що акушери-гінекологи, приймаючи пологи кожен день стикаються з необхідністю утилізувати велику кількість поліфункціонального життєздатного біоматеріалу, по друге необхідністю вивчати вплив вагітності на органи та системи людини. Відомо, що при вагітності значно підвищуються адаптивні можливості органів та систем, спостерігається компенсація ряду захворювань. Крім того відомо, що функції репродуктивної системи надовго змінюються після вагітності: нормалізується оваріально-менструальний цикл, зникають проблеми непліддя, рідше зустрічаються онкозахворювання. Особливо виражений вплив трофобласту на яєчники та ендометрій, оскільки мінімальна маса трофобласту ембріону забезпечує розвиток жовтих тіл вагітності та секреторну трансформацію ендометрію [30, 102].

Історично препарати плаценти застосовувалися в медицині різних країн, який можливо базується на звичках деяких тварин поїдати свою післяпологову плаценту. Традиційно великий експериментальний та клінічний досвід мають Українські та Російські медичні школи, зустрічаються роботи наукових установ Індії, Аргентини, Кореї, Західної Європи [280, 223].

Відомі описи застосування плаценти у народній та традиційній китайській медицині, але перші науково задокументовані препарати плаценти з'являються в літературі на початку XX століття (Aschner B, 1912, Fellner OO, 1913) [113] та пов'язані з впливом екстракту плаценти на статеву систему. В той же час Davis, J. (1910) опублікував результати застосування амніотичної оболонки в офтальмології [280, 23]. Більшість досліджень, присвячені девіталізованим препаратам, опубліковані з 30-х по 80-і роки XX століття, після цього структури плаценти (тканина, оболонки та канатик) частіше розглядалися як джерело стовбурових клітин, застосовувалися кріоконсервовані життєздатні препарати плаценти.

Вперше велике систематизоване дослідження застосування препаратів плаценти проведено в 30-40 році під керівництвом академіка В.П. Філатовим, котрий заснував у 1939 році діючий нині «Інститут глазних хвороб та тканинної терапії». За методом В.П. Філатова фрагменти плаценти розміром $3 \times 2 \times 1$ см зберігали в стерильній склянці на льоду впродовж 6-7 діб. Після чого її підсушували 1 годину при температурі $60-80^{\circ}\text{C}$. Розроблено також метод отримання і застосування гомогенату і екстракту плаценти. Препарати перед застосуванням автоклавували 1 годину при температурі 120°C та тиску 1,5 атмосфер. Фрагменти імплантували підшкірно, однократно, гомогенати вводили внутрішньом'язово в об'ємі до 8 мл до 10 разів. Але при цьому вважалося, що наряду з плацентою подібні властивості мають деякі інші тканини. Продовженням цього методу є застосування екстрактів плаценти та ліофілізатів з різним ступенем збереженості сполук [75, 63].

За роки застосування цього методу було опубліковано більш ніж 3000 наукових робіт, проліковано сотні тисяч хворих, відкриті десятки відділень тканинної терапії. Продемонстрована ефективність терапії при трофічних виразках, контрактурах суглобів, облітеруючому ендартериті, туберкульозі, виразках шлунку, невритах, невралгіях, бронхіальній астмі, в геріатричній практиці, клімаксі, неплідді, запальних та ендокринних гінекологічних захворюваннях. Найбільший досвід отримано при лікуванні офтальмологічної патології, дегенеративних захворювань ока [67].

З 1982 року, після успішної трансплантації Е. Gluckman клітин пуповинної крові при анемії Фанконі найбільший інтерес дослідників привертають стовбурові клітини пуповинної крові [96]. З кінця XX століття похідні плаценти (плаценти, пуповини і оболонки) все частіше розглядається як джерело стовбурових клітин [224, 228].

Погляди на механізм дії препаратів плаценти змінювались з роками. Засновник методу клітинної терапії, В.П. Філатов вважав, що плацента, витримана несприятливих умовах, проходить біохімічну трансформацію та накопичує сполуки, які автор назвав «факторами консервації», «речовинами

опору», а потім «біогенними стимуляторами». В подальшому активність препаратів плаценти пояснювали наявністю фосфоліпідів, гормонів, ферментів та вітамінів [63, 80], окремих пептидних факторів та їх фракцій [148], ростових факторів, окремих типів клітин та їх продуктів (стовбурові, трофобластичні, мезенхімальні, макрофагальні) та цілісністю тканини зі збереженням міжклітинних взаємодій.

На теперішній час механізм дії препаратів плаценти не є остаточно визначеним, але більшість дослідників пов'язують його з наявністю комплексу ембріональних ростових факторів низькою імуногеністю, пов'язаною з обмеженою експресією антигенів HLA та здатністю підвищувати адаптивні можливості організму. Так імуномодуляторні властивості плацентарних клітин та тканин пов'язують зі здатністю супресувати Th1 клітини, нейтрофіли, Т-кілери, викликати проліферацію Т-регуляторних клітин, блокуванням диференціювання моноцитів в дендритні клітини та активацією M2 макрофагів. продемонстровано здатність клітин плаценти продукувати IL-10, TGF- β , PGE2, фактор росту гепатоцитів, індоамін 2,3 – діоксигенезу. Прямую антибактеріальну дію плацентарних клітин та плідних мембран обумовлюють бактрицидін, β -лізін, трансферин, та 7S імуноглобулін. Ангіогенез та регенерацію, що стимулюється клітинами плаценти пов'язують з інгібуванням металопротеїназ та синтезом VEGF, IL-8, ангеогеніну, IFN-g, IL-6, bFGF, EGF, фактору, виділеного з тромбоцитів (PDGF). При цьому амніотична оболонка не має здібності стимулювати ангіогенез - це дозволяє застосувати її при пластиці рогівки, яка не має судин та зберігається прозорою. Такі властивості пояснюють присутністю в амніотичній оболонці інгібіторів металопротеїназ, ламелінів 1, 5, фібронектину, ендостатину. Епітелізуючий та протирубцовий ефект пов'язують з факторами росту епітелію (EGF), кератиноцитів (KGF), гепатоцитів (HGF), інгібуванням експресії TGF- β . [64, 113, 223, 257, 280]

Клітини пуповинної крові. Найбільшу увагу дослідників і клініцистів традиційно привертають клітини пуповинної крові. Пуповинна кров є легко

доступним джерелом гемопоетичних стовбурових клітин, що є альтернативою кістковому мозку [260]. Традиційно великих успіхів досягнуто при застосуванні клітин пуповинної крові для лікування патології кроветворної системи, в тому числі після перенесеної хіміо- чи радіотерапії [119]. Також показана можливість застосування клітин кордової крові при цукровому діабеті, ішемічних порушеннях, еректильній дисфункції, вірусній інфекції, травмах [94, 96].

Крім трансплантації гемопоетичних клітин пуповинної крові особливий інтерес дослідників привертає еритроцити і тромбоцити пуповинної крові [265]. Основна відмінність еритроцитів пуповинної крові від еритроцитів дорослого є вміст фетального гемоглобіну. Зміст фетального гемоглобіну в еритроцитах крові пуповини становить понад 90%, в той час як в крові дорослого вона становить менше 10%. Фетальний гемоглобін має значно більш високу спорідненість до кисню, що дозволяє перенесення кисню через плаценту з крові матері. Незважаючи на можливість отримати тільки 50-100 мл післяпологовому пуповинної крові, переливання еритроцитів пуповинної крові є кращим для лікування новонароджених, особливо у недоношених дітей, а також для внутрішньоутробних переливань крові, коли кров реципієнта містить головним чином фетальний гемоглобін. Такий підхід дозволяє зменшити кількість переливань і значно прискорює відновлення. Переливання пуповинної крові еритроцитів до дорослих результатами пацієнтів в більш швидке відновлення нейтрофілів і більш повільного відновлення тромбоцитів в порівнянні з переливанням дорослих еритроцитів. Переливання пуповинної крові також згадується в якості перспективних для застосування в педіатричній практиці в тих країнах, де наявність донорської крові обмежена [99, 143].

Ізольовані плацентарні клітини. На сьогоднішній день, клітини з амніотичної і хоріонічного оболонок, плацентарних ворсин і пуповини були успішно ізольовані, фенотиповані і характеризовані [200, 111]. Застосовуються протоколи з застосуванням трипсину, колагенази, діспази.

Виділення клітин з плацентарних ворсинок вимагає додаткового застосування ДНКаз, а з пуповини вимагає - гіалуронідази, або застосування методики експлантів [228]. На думку більшості дослідників, клітини, отримані з усіх плацентарних джерел експресують CD105, CD90, CD73, CD29, CD13, CD10, і в меншій мірі HLA-A, B, C, а не мають CD44, CD14, CD34, CD45, HLA-DR [224]. Важливо відзначити, що клітини, отримані за згаданими протоколами, зберігають здатність синтезувати хоріонічний гонадотропін та експресувати цитокератин-7 і CD200 [196]. Крім того, плацентарні MSCs мають здатність диференціації не тільки в трьох класичних мезодермальних напрямках (адипогенний, остеогенний та хондрогенний), але також в ангіогенному, міогенному, панкреатогенному, кардіогенному та нейрогенному напрямку [224, 228, 334].

В експериментах продемонстровано, що плацентарні клітини інгібують антиген-специфічну проліферацію Т-клітин *in vitro*, і в природних умовах гальмують реакцію гіперчутливості сповільненого типу, покращують перебіг експериментального енцефаломієліту, індукують толерогенну імунну відповідь за рахунок диференціювання дендритних клітин і пригнічує Th1 імунної відповідь, підвищуючи Th2 [196, 280]. Дослідження *in vitro* та *in vivo* присвячені порівняльному аналізу впливу мезенхімальних стовбурових клітин, отриманих з різних джерел на клітини імунної системи показали, що клітини, отримані з плаценти мають більш виражений імуномодулюючий ефект, ніж клітини жирової тканини і кісткового мозку [204, 189]. Крім того, плацентарні MSCs мають більший проліферативний потенціал у порівнянні з клітинами з інших джерел, що може бути досить значним для регенеративної медицини, чи тканинної інженерії [93, 105, 189, 190].

MSCs амніотичної оболонки були ефективними в лікуванні оофороріту [306], передчасного виснаження функції яєчників після хіміотерапії: після прямого введення в яєчник мишей спостерігали відновлення статеві та репродуктивної функції [314, 325].

Було показано, що мезенхімальні стовбурові клітини, виділені з амніотичної мембрани можуть диференціюватися в гепатоцитоподібні клітини [224, 189]. Внутрішньовенне застосування плацентарних клітин в експериментальних моделях інтоксикації трихлористим вуглецем посилює регенерацію печінки і прискорює відновлення у тварин [164]. Трансплантація клітин в плацентарних серцевого м'яза призводить до їх диференціації в кардіоміоцити, що дозволяє поліпшити регенерацію серцевого м'яза після експериментального гострого інфаркту міокарда [132, 224].

Було виявлено, що плацентарні клітини експресують в культурі деякі нейральні маркери та мають нейропроекторний ефект як в культурі, так і при лікуванні ішемічного інсульту, моделюванні хвороби Паркінсона та Альцгеймера на лабораторних тваринах [173, 185, 194, 228]. Ефективність плацентарних клітин в лікуванні ішемічного інсульту пояснюється впливом VEGF, фактору росту гепатоцитів і нейротрофічних факторів [106]. Ефективність плацентарних клітин при серцевій недостатності, як вважають, пов'язана з паракринними взаємодіями [105].

Лікування експериментального діабету шляхом внутрішньовенного введення клітин плаценти призводило до зниження гіперглікемії, відновлення нормального рівня глюкози, збільшення ваги (нормалізація) лабораторних тварин; автори не спостерігали тератоми протягом декількох місяців спостережень [162, 165]. Крім того, використання плацентарних клітин позитивно відображалось на лікуванні ускладнень діабету – діабетичної стопи та полінейропатії [181]. Антивіковий ефект трансплантації клітин плаценти доведено на мишах [193], продемонстровано їх ефективність в лікуванні захворювань, пов'язаних зі старінням [123, 315].

Властивості екстракту плаценти всебічно досліджувалися як в системах *in vitro* так і *in vivo*. Описані його складові частини, збереженність після різних способів отримання, активність окремих фракцій, антигенні властивості [211, 294]. Продemonстрована його здатність підсилювати синтез імуноглобулінів, стимулювати виділення оксиду азоту, протизапальні,

імуносупресивні властивості [191], гормональна активність, антиоксидантна активність [110, 222, 294], здатність регулювати синтез гормонів, антикоагулянтні властивості, стимуляція фібрінолізу, здатність подовжувати життя графту [186], стимулювати ріст фібробластів [109, 300], та гемопоетичних клітин [198], впливати на пухлинні клітини та на ріст пухлин, стимулювати регенерацію та ріст грануліційної тканини та розвиток фіброзу [277], регенерацію. Продemonстровано бактеріостатичні, радіопротекторні [172] властивості екстракту плаценти.

Екстракт плаценти неодноразово застосовувався для лікування ряду патологічних станів. В хірургії екстракт плаценти найчастіше застосовувався для лікування ран, опіків та виразок [155, 168, 183, 327], в лікуванні артрити [104, 321]. В неврології отримано перспективні результати при лікуванні екстрактом синдрому хронічної втоми [221]. Отримані експериментальні данні ефективності лікування ниркової недостатності [322]. Крім того продемонстроване ефективність застосування екстракту плаценти при енурезі, атрофічному риніті, астматичному бронхиті, в геронтологічній клініці, церебральному атеросклерозі [327].

В акушерсько-гінекологічній практиці найбільш ефективним було застосування екстракту плаценти при клімактеричних розладах [174, 192], що дозволяло знизити кількість та враженість приливів, дратівливості, нормалізувати гормональний профіль, знижувати підвищений рівень пролактину, який є причиною багатьох порушень менструального циклу.

Застосування кріоконсервованого екстракту плаценти в програмах екстракорпорального запліднення призводить до зменшення кількості ооцитів з ознаками апоптозу в 2,2 рази (з $1,8 \pm 0,4$ до $0,8 \pm 0,2$), та має ембріокорегуючий ефект у вигляді збільшення кількості ембріонів 1-го класу (з $32,7 \pm 4,9\%$ до $61,1 \pm 5,4\%$), частоти культивування до стадії бластоцисти (з $0,4 \pm 0,2$ до $1,6 \pm 0,5$), кількості зигот, які характеризуються нормальними темпами дроблення й частоти імплантації ембріонів при лікуванні безпліддя методами допоміжних репродуктивних технологій [14].

У вагітних з плацентарною дисфункцією, що отримали лікування кріоконсервованим екстрактом плаценти, спостерігався більш сприятливий перебіг пологового акту, що приводило до зниження рівню його ускладнень, покращання стану новонароджених та дозволило знизити перинатальну патологію плоду на 45,4% [22].

Призначення в лікувальну програму стабільної стенокардії напруги кріоконсервованого екстракту плаценти позитивно впливає на клінічний перебіг, а саме: сприяє зменшенню кількості ангінозних нападів на 24,1%, зниженню дози нітросорбїду на 15%, підвищенню величини показника граничного навантаження на 18,6%, зменшенню добової дози метопрололу на 14,9%. Найвища ефективність терапії виявлена через 3 місяці від початку лікування, та тривалістю до 6 місяців [81].

З 70-х років з прогресом фармацевтичної науки застосування методу зменшується, існуючий офіційний препарат екстракт плаценти застосовується як супутня терапія при ряді захворювань та в період реабілітації. Обмеження застосування препаратів також пов'язано з етичними проблемами, інфікуванням та інактивацією більшості речовин при термічній обробці.

В той же час препарати плаценти, в тому числі препарати плаценти людини широко застосовуються *в сучасній ветеринарії*. На відміну від лише одного препарату, дозволеного для використання в медицині на теперішній час існує близько 10 ветеринарних препаратів: плацента денатурована емульгована, плацента денатурована, суспензована, біоглобін (водно-сольовин екстракт плаценти людини), ПАН (плацента активний початок), плацентин, хориофаг, плацентоль, умбелицен, хориоцен, амніоцен, біостимульгін. Препарати за даними виробника містять поліпептиди, амінокислоти, мікроелементи, альфафетопротейн. Препарати ефективно застосовуються для профілактики та лікування ряду захворювань та підвищення ефективності сільськогосподарського виробництва. Описано застосування препаратів для лікування післяпологової, підвищення

збереженості молодняка, пролонгації репродуктивного періоду тварин, пролонгації та підвищення яйценоскісті на 8-9%, покращення якості шерсті пушних тварин, прискорення набору маси м'ясних порід рогатої худоби та птиці на 25-30% при економії на кормах до 4-5%, імуномодуючої терапії, прискорення загоювання ран та скорочення реабілітаційного періоду після операцій та лікування ряду хвороб. Є дані по застосуванні препаратів в рослинництві для підвищення схожості насіння, урожайності, збільшення зеленої маси та кореня, зменшення строків дозрівання окремих культур. [3, 4, 117].

Описано застосування цілої плаценти чи її зрізів поза межами організму для екстрокорпоральної детоксикації. Автори застосовували плаценту як біосорбент для лікування гнійно-запальних захворювань (перитоніт, гнійний холангіт, мастит, панкреонекроз, флегмони). Спостерігали поліпшення самопочуття, зниження кількості бактерій в крові хворих, зниження лабораторних показників ендотоксикозу (білірубін на 56%, трансамінази на 55%, креатиніну на 25%), позитивну динаміку, щодо показників імунітету, посилення центрального та периферичного кровотоку, відсутність травматизації клітинних елементів, порівняно з іншими сорбентами [34].

Розвиток сучасних кріогенних технологій дозволив застосовувати життєздатні *фрагменти плаценти* у якості імплантантів. Так показано, що трансплантація кріоконсервованої тканини плаценти має виражений імунокорегуючий вплив, нормалізує показники гуморального імунітету, підсилює Т-супресорний вплив клітинного імунітету, сприяє зниженню рівня ізолейкоцитарних антитіл і гетерофільних гемолізінів. Метод трансплантації фрагмента кріоконсервованої плацентарної тканини для лікування невиношування вагітності в терміні від 12 до 16 тижнів поліпшує результати збереження вагітності: на 7 % збільшує кількість пологів в термін вагітності 37—42 тижні, на 14 % знижує народження незрілих і недоношених плодів, на 29 % знижує розвиток хронічної фетоплацентарної недостатності і гіпоксії

плода, що дозволяє рекомендувати його застосування поряд із загальноприйнятою терапією для корекції імунологічних і гормональних показників при загрозовому аборті [1, 20].

Трансплантація фрагменту кріоконсервованої тканини плаценти ефективна при лікуванні жіночого непліддя, вона призводить до нормалізації концентрації NK-клітин у разі їх підвищення, а також має імуномодулюючу дію на Т-лімфоцити-супресори: у пацієток з недостатністю лютеїнової фази їх рівень підвищується, а у жінок з синдромом полікістозних яєчників – зменшується [19, 74].

Ефективність допологової підготовки з використанням кріоконсервованої плацентарної тканини в якості тканинної терапії при недостатній біологічній готовності до пологів становила 83,1%, при патологічному прелімінальному періоді – 81,5%, у разі застосування традиційних медикаментозних методик ефективність коливалась у діапазоні 30-76,25%. При проведенні розробленої допологової підготовки знижується частота розвитку аномалій пологової діяльності (в 2 рази), оперативних розроджень (в 2-2,5 рази), відзначається кращий стан новонароджених та менша кількість післяпологових ускладнень [24].

Ефективність лікування клімактеричного синдрому з застосуванням кріоконсервованих фрагментів плаценти складає 46%-60% що більш ефективно за гормонотерапію. Відбувається нормалізація гормональних взаємовідносин (зниження високих показників кортизолу на фоні помірного росту показників β -ендорфіну) [37, 151].

Застосування фрагментів плаценти при запальних процесах дозволяє зменшити їх вираженість, прискорити загоєння та відновлення функцій органів за рахунок змін в макрофагальній системі, активізації антиоксидантних ферментів, активізації репаративних процесів [35, 80].

Застосування фрагментів плаценти при патології серцево-судинної системи призводило до швидкої (протягом одного тижня) нормалізації ліпідного спектра сироватки, зменшення площі осередків ліпоїдозу аорти,

відновлення структурно-функціональної цілісності ендотелію, збільшення кількості інтрамуральних судин у міокарді [180], зменшення кількості ангінозних нападів на 38,8%, зниженню дози нітросорбїду на 24,8%, підвищенню граничного навантаження на 27,5%, зменшенню добової дози метопрололу на 18,3%. Найбільша ефективність терапії виявлена через 6 місяців від початку лікування, та тривалістю до 12 місяців [81].

Запропоновані методи лікування чоловічого непліддя та статевої дисфункції з застосуванням фрагментів плаценти [140].

Трансплантація кріоконсервованої та нативної суспензії клітин плаценти при ад'ювантному артриті супроводжувалась нормалізацією клінічних, гематологічних та імунологічних показників. Суспензія плаценти купіровала клінічні ознаки ад'ювантного артриту, стимулювала гемопоез та інгібувала розвиток гіперплазії тимусу, селезінки і лімфовузлів [146].

Амніотична оболонка неодноразово застосовувалася в хірургічній практиці як біологічне покриття. Вперше амніотична оболонка була застосована в 1910 році J. Devis, для покриття шкірних дефектів. Найчастіше амніотична оболонка застосовується в офтальмології при патології роговиці, що пояснюється її властивостями стимулювати проліферацію та міграцією стовбурових клітин лімбальної зони [23, 86, 163, 201]. Потім амніотична оболонка застосовувалась в хірургії для загоєння ран, трофічних виразок, опіків [153, 208, 254, 310] профілактики післяопераційних злук, як пластичний матеріал в оториноларінгологічній практиці, для пластики сухожиль тимчасового відгородження черевної порожнини при лікуванні тяжких перитонітів, як антифібротичний, антибактеріальний агент [258, 291].

Механізми терапевтичної дії амніотичної оболонки пояснювали ефектом біологічної пов'язки, активізацією епітелізації, ангіогенезу, супресією запалення та рубцювання, антимікробним ефектом, стимуляцією росту стовбурових клітин. При цьому, окрім наявності біостимуляторів важливим є низька імуногенність, що обумовлена незначною експресією HLA антигенів. Запропоновано більш 10 способів консервації амніотичної

оболонки, доведено, що консервація як з девітацією, так і без неї знижує імуногенність та подовжує термін розсмоктування з 1 до 2 місяців [23, 220, 258, 293].

Сироватка кордової крові застосовувалась при хімічних та термічних ушкодженнях роговиці, її ерозіях, після лазерних операцій [125]. Продемонстровано більш повна та більш скоріша епітелізація рогової оболонки після застосування препаратів, що містять сироватку кордової крові, ніж при традиційних методах лікування [139, 278, 318]. Експериментально обґрунтовано застосування кріоконсервованої сироватки при лікуванні холодкових ран [183].

Застосування кріоконсервованої сироватки кордової крові у комплексі хірургічного лікування хворих на синдром діабетичної стопи як у ранньому післяопераційному періоді, так і у пізніші терміни спостереження (3-15 місяців) сприяє зменшенню на 30-40% показників препрандіальної, постпрандіальної глікемії та глікозильованого гемоглобіну, а також добової дози інсуліну на 30-35%; зменшенню (в 1,3-1,5 рази) лейкоцитарного індексу інтоксикації, пептидів середньої молекулярної маси, показників ПОЛ, ферментів-маркерів цитолізу гепатоцитів, покращенню білоксинтезувальної функції печінки, зменшенню кількості білків гострої фази. Імуномодуюча дія препарату призводить до збільшення кількості Ig G, Ig A, Ig M та зменшення (у 1,8-2,0 рази) циркулюючих імунних комплексів, а також суттєвої нормалізації морфометричних і цитоархітектонічних показників еритроцитів, що сприяє покращенню мікроциркуляції тканин та репаративних процесів в організмі хворих. Загоєння виразок прискорюється на 10-12 діб, частота ампутацій стегна значно зменшується [237]. Експериментально доведено можливість стимулювання виділення інсуліну під дією сироватки кордової крові [313].

Застосування кріоконсервованої сироватки кордової крові при постгістеректомічному синдромі відновлює гормональну рівновагу, не

приводячи, на відміну від замісної гормональної терапії, до наступного пригнічення яєчникового стероїдогенезу [2].

1. *Пуповину та вартонієв студень (за іншою номенклатурою – вартонієві драгли)* застосовували як перспективне джерело стовбурових клітин, які на даний момент досить вивчені, характеризовані [288, 264].

Амніотична рідина застосовувалася як в експерименті для профілактики післяопераційної спайкової хвороби [287], продемонстровано достатню ефективність: у жодної тварини не було виявлено злук, тоді як в контрольній групі злуки були виявлені у 30% тварин. Продemonстровано можливість застосування амніотичної рідини в лікуванні хронічних язв [309], для регенерації кісткової тканини [170], периферичних нервів [217]. Розроблені методи виділення стовбурових клітин амніотичної рідини [138]

Серед *побічних ефектів застосування* екстракту плаценти відмічено можливе ураження шкіри [267] та такі ускладнення вагітності, як тератогенна дія [268], можливість імунізації [159]. Побічної дії при застосуванні інших похідних плаценти не знайдено.

Онкологічний ризик. Здатність трофобласту до депортації, інвазії та погіршення прогнозу раку при вагітності [32] потребує особливої настороженості при застосуванні похідних плаценти [2]. У той же час, численні експериментальні дані показують інгібування онкопроцесу плацентарними клітинами в експерименті [324, 88]. Трофобластичних хвороба у своєму розвитку два етапи: пухирний занесок (місцевий процес переродження трофобласту) та хоріонепітеліома (процес з метастазування) [121]. Вона є абсолютним протипоказанням до трансплантації будь-яких органів, клітин і тканин від такого донора, оскільки ймовірність його прояви у реципієнта близька до 90%. Патогенез трофобластичної хвороби пов'язаний з генетичним розладом ранньої хоріону [326], що дозволяє застосовувати похідні плаценти, отримані при фізіологічній вагітності, але вимагає диференційованого підходу в лікуванні онкологічної патології.

Багато дослідників вважає перспективним пошук нових методів лікування онкопатології з застосуванням похідних плаценти. Для деяких типів пухлин їх дія може бути стимулюючою, для інших – пригнічуючою, що залежить від типу пухлини, її джерела та ступеню диференціювання. Механізм протипухлинної дії МСК плаценти пов'язують з вивільненням протипухлинних агентів TIMP-1, TIMP-2, BMP-5, BMP-6, GP96. Перспективним також вважається модифікація клітин плаценти для доставлення до злоякісних клітин «суїцидних» генів та лікарських речовин. Таким чином похідні плаценти можуть бути ефективно застосовані для лікування онкопроцесу, його ускладнень та наслідків хіміо та радіотерапії при розумінні механізму їх дії та типу патологічного процесу [279].

Клінічні випробування та наукові дослідження. Кількість і спрямованість наукових досліджень і клінічних випробувань з використанням плаценти було проаналізовано за матеріалами US National Library of Medicine [299] і US National Institutes of Health [298] (табл. 1). Найбільша кількість досліджень і клінічних випробувань присвячено клітинам кордової крові. Як гемопоетичні клітини, вони традиційно використовуються в лікуванні онкозахворювань крові, і патології кісткового мозку, нові дослідження присвячені реабілітації після хіміотерапії, ішемічним ураженням центральної нервової системи і кінцівок, цукрового діабету. МСК плацентарного походження мають більш широкий диференціювальний потенціал, однак вимагають більш складних процесів виділення. Кількість експериментальних і клінічних менше, ніж у клітин кордової крові, однак перелік патологічних станів. При яких вони можуть бути ефективні ширше. Це аутоімунні, ендокринні захворювання, патологія нервової, статеві системи. Більшість робіт є фундаментальними і експериментальними, кількість клінічних досліджень порівняно не велика.

Таблиця 1

**Дослідження та клінічні випробування, пов'язані з використанням
похідних плаценти**

	Досліджен- ня	Клінічні випро- бування	Патологія
Клітини кордової крові	>10000	351	Апластична анемія, злоякісні пухлини, гематологічні, онкологічні захворювання, черепно-мозкові травми, вірусні інфекції, ішемія кінцівок, інсульт, ішемія мозоку.
МСК з плаценти (плаценти, оболонки, пуповини, амніотичної рідини)	>4000	39	Нейропатії, трофічні виразки, хвороба Крона, реакція трансплантат проти господаря, легеневий фіброз, ішемія кінцівок, кардіоміопатія, остеоартрозу колінного суглоба, цукровий діабет, аміотрофічний бічний склероз, еректильна дисфункції, жіноче непліддя, передчасне виснаження яєчників.
Плідні оболонки	>1900	114	Виразки рогівки, травми, періодонтит, діабетична стопа, виразка стопи, опіки, спайкова хвороба.
Екстракт плаценти	65	2	Кератити, загоєння ран, ревматоїдний артрит, міжхребцева дегенерації диска, клімактеричні симптоми у жінок в перименопаузі.
Сироватка плацентарної крові	7	3	Виразка роговиці
Амніотична рідина	4	-	Профілактика фіброзу, спайкова хвороба, регенерації кістки, нервів.

Дослідження присвячені амніотичним оболонкам в основному пов'язані з покриттям раньових, хірургічних дефектів, виразок, опіків, рідше використання амніону для культивування клітин. При цьому більшу кількість публікацій пов'язано з клінічним застосуванням матеріалу, ніж з фундаментальними дослідженнями. Досліджень, пов'язаних з екстрактом

плаценти порівняно небагато і вони присвячені з дегенеративними захворюваннями і патології статевої системи. Роботи по дослідженню та застосуванню сироватки кордової крові пов'язані з патологією рогівки, їх кількість порівняно невелика, незважаючи на широке використання фетальних сироваток в культуральних методиках як джерело факторів росту.

Питання отримання матеріалу.

Питання одержання матеріалу пов'язані як з етичними поглядами того чи іншого суспільства, так і з законодавчою базою.

Історично в різних культурах послід та плацента розглядалися, як зв'язок дитини з матір'ю не тільки фізіологічний, а й духовний. Деякі розглядали її як компаньйона, мати, брата чи сестру новонародженого. Плацента застосовувалась в численних релігійних обрядах з метою лікування, контакту з духами та інших. Важливу роль відводили утилізації плаценти після пологів. Найчастіше плаценту ховали поблизу дому, або саджали з нею дерево, що вважалося принесе добробут в родину та новонародженому, зробить міцнішим його зв'язок з землею. Відомі ритуали нейтралізації плаценти («вбивання» гострим предметом, спалювання, з'їдання), що повинно заважати злим духам зашкодити новонародженому. Ці погляди відображають інстинктивне розуміння призначення цього органа, нашаровані на кожний період розвитку суспільства [118, 147].

На теперішній час, коли більшість жінок мають достатню освіту, ці погляди вже не є актуальними, але є деякі питання, пов'язані з донацією плаценти. По-перше, не досить зрозуміло хто є власником плаценти, оскільки генетично це тканина плоду, а не жінки. По друге донація хоріону (ранньої плаценти) пов'язана з абортами, що є етичною проблемою, технічно пов'язане з інфікуванням, пошкодженням тканини, а при застосуванні медикаментозних методів взагалі неможливе. По - третє можливість відношення застосування плаценти до трансплантації може створити низку етичних та соціальних проблем. Факторами, що поліпшують ситуацію є те,

що плацента є провізорним (тимчасовим) органом, та потребує утилізації, можливостями діагностики з її застосуванням (плацента розглядається як «щоденник» вагітності). Численні опитування жінок свідчать про відсутність негативного погляду до донації плаценти [319].

Юридично донація плаценти та її застосування регулюється тим же чином, що і діяльність банків кордової крові. В Україні плацента виведена з під дії закона про трансплантацію, та віднесена до «діяльності банків пуповинної крові, інших тканин і клітин людини згідно з переліком, затвердженим центральним органом виконавчої влади, що забезпечує формування державної політики у сфері охорони здоров'я», що затверджено наказом Міністерства охорони здоров'я України № 276 від 20.04.2012 Про затвердження Переліку тканин і клітин людини, з якими дозволена діяльність банків пуповинної крові, інших тканин і клітин людини».

Таким чином в багатьох країнах світу, в тому числі в Україні добровільна донація післяпологової зрілої плаценти не має перешкод, в той час як отримання хоріону (ранньої плаценти) обмежено рядом факторів. Застосування препаратів плаценти є доцільним в клінічній практиці. Найбільш ефективними та підтвердженими багатьма дослідниками галузями їх застосування є акушерство та гінекологія при ендокринних та функціональних порушеннях; хірургія та офтальмологія при травмах, дегенеративних та дистрофічних процесах; кардіологія, дерматологія, ендокринологія.

Найбільш дослідженими та перевіреними є клітини пуповинної крові, екстракт плаценти у якості біостимулятора та амніотична оболонка у якості біопокриття. Найбільш активно досліджуються стовбурові клітини з різних структур плаценти. Перспективним та малодослідженим є застосування життєздатних трофобластичних структур.

1.4. Сучасні проблеми збереження жіночого репродуктивного здоров'я та шляхи їх подолання

Збереження та відновлення жіночого репродуктивного здоров'я – одно з пріоритетних напрямлень роботи Всесвітньої організації охорони здоров'я в 21 сторіччі, яке потребує нових рішень. Діюча стратегія в галузі репродуктивного здоров'я була прийнята на 57 асамблеї охорони здоров'я в 2004 році [WHO]. В ній на першому місці стоїть вдосконалення допологової допомоги, допомоги при та після пологів матерям та новонародженим. На 70-ї сесії Генеральної Асамблеї ООН у Нью-Йорку були прийняті «Цілі сталого розвитку 2016-2030», де на першому місці серед цілей по забезпеченню здорового способу життя стоять зниження смертності матерів та новонароджених [297].

Ті ж проблеми є в Україні, яка за даними ВООЗ в останні роки показує показники, значно кращі, за більшість країн з її рівнем доходу, але нижчі за європейські країни незважаючи на реальні успіхи програми «Репродуктивне здоров'я нації» [311, 312]. За даними Державної служби статистики, населення України зменшується на 15 – 16 тисяч осіб за місяць, що перевищує населення середнього районного центру [6].

За матеріалами ВООЗ Україна, яка відноситься до країн зі середнім рівнем доходу «middle income country» за класифікацією світового банку має структуру та показники жіночої та дитячої захворюваності та смертності, наближену до країн з високим рівнем доходу, навіть за смертністю входить в одну групу зі сполученими Штатами Америки. Так серед основних причин непліддя та патології вагітності в Україні відзначаються пізніше одруження, ендокринні та соматичні розлади, а не інфекційні агенти та ранній початок статевого життя та, характерні для більшості країн з близьким доходом. Серед причин смертності дітей першого року життя близько половини становлять «Окремі стани, що виникають в перинатальному періоді», викликані патологією жіночої репродуктивної системи, віком жінки, «хворобами урбанізації», а не інфекції, недоїдання та відсутність адекватної

медичної допомоги, характерні для більшості країн «middle income country» [68, 312].

У світі 8-12% подружніх пар неплідні [73, 323], запальні хвороби мають 10-20% жінок різного віку [65, 120] частота тяжких гормональних порушень за останні роки зросла з 9,2 до 14 на 1000 жінок [253], 15% вагітностей завершуються абортами [16, 135]. В половині випадків в причину перинатальної патології та смертності до 1 року є «окремі стани, що виникають в перинатальному періоді», такі як плацентарна дисфункція, гестоз, передчасні пологи, синдром затримки розвитку плоду, які можуть бути курабельними [6].

За сучасними уявленнями такі патологічні стани, як невиношування вагітності, плацентарна дисфункція, гестоз, синдром затримки розвитку плоду мають у своїй основі недосконалу плацентацію та недостатню інвазію трофобласту в спіральні артерії матки, та їм передують гінекологічні захворювання [147, 156].

Найбільш розповсюдженими гінекологічними захворюваннями з патогенезом, які ведуть до непліддя та патології вагітності є інфекційний процес, ендокринні розлади, аутоімунні розлади, ятрогенні, ішемічні ураження [152, 154].

Запальні хвороби тазу є найбільш поширеною патологією жіночої репродуктивної системи. Протягом життя їх мають близько 5% жінок, у 21,3% з них спостерігаються повторні епізоди захворювання, у 19% - непліддя, а у 42,2% - хронічний тазовий біль, спостерігаються розлади менструальної функції. Тимчасові порушення біоценозу, чи легкі форми кандидозу в своєму житті, що не призводять до серйозних наслідків рано чи пізно відмічає кожна жінка. Для лікування застосовуюся терапія, орієнтована на предикацію збуднику, імунomodуляцію та посилення кровообігу [120]. Препарати плаценти неодноразово застосовувалися для лікування жінок, що перенесли запальні процеси [14, 35], але невизначеними є питання доцільності їх застосування на різних етапах розвитку та наявність

протипоказань.

Ендокринна патологія яєчників за розповсюдженість не уступає інфекційним захворюванням та також в більшому чи меншому ступеню стасуються практично кожної жінки. У більшості мається незначні проблеми при становленні менструальної функції в пубертатному періоді, чи згасанні в клімактеричному, прояви предменструального синдрому що є фізіологічними процесами, але враховуючи спрямованість сучасної медицини на підвищення якості життя підлягає корекції. Більш тяжкими та менш розповсюдженими патологічними станами є порушення оваріально-менструальної функції різного генезу, недостатність яєчників, синдром полікістозних яєчників, ятрогенні порушення після операційного втручання, радіотерапії чи хіміотерапії. Крім того багато соматичних нозологій, особливо з боку нервової чи ендокринної системи призводять до порушень оваріально-менструального циклу. Відомо, що ряд порушень проходять після вагітності та пологів, та для їх лікування застосовуються біостимулятори, гонадотропіни, аналоги прогестерону, які одночасно описані для похідних плаценти. Це перед усім недостатність яєчників різного генезу, гіперестрогенії, гіперандрогенії, синдром полікістозних яєчників, клімактеричний та предменструальний синдром [91, 92, 95, 154]. Можна припустити, що похідні плаценти будуть ефективні при лікуванні цих захворювань.

Аутоімунні гінекологічні розлади зустрічаються набагато рідше інфекційних та ендокринних. Частіше аутоімунна патологія спостерігається під час вагітності, або, як антифосфоліпідний синдром мають при ній основні прояви. Основні аутоімунні гінекологічні патологічні процеси це аутоімунна яєчникова недостатність, антифосфоліпідний синдром [87, 272]. Окремі порушення функціонування імунної системи описано як компонент патологічного процесу при ендометріозі та сальпінгоофориті. Імномодулюючі властивості похідних плаценти описані та є більш вираженими у порівнянні з іншими об'єктами клітинної терапії [190].

До ятрогенних гінекологічних порушень відносять перед усім наслідки хімію або радіотерапії, прийому цитостатичних, гормональних препаратів оперативних втручань. Більшість з них пов'язані зі зменшенням кровообігу, ішемією, атрофічними змінами. Особливістю хімію та променевої терапії є також загибель фолікулярного апарату, а оперативного лікування – спайкоутворення [128, 229]. Подібний патогенез порушень має також перекрут яєчника, який не є ятрогенним, але також має ішемічний компонент та для збереження функції потребує оперативного лікування [206].

Зниження функції яєчників з будь-якої причини з наступною гіпоестрогенією, призводить не тільки до згасання полові, репродуктивної функції, але й до психоемоційних розладів, остеопорозу, збільшення кількості переломів, інфарктів, інсультів, важкості атеросклерозу та погіршення якості життя жінок. Прогресування цих хвороб пов'язують зі зникненням протекторної дії естрогенів на ряд жіночих органів та систем. При передчасній, ятрогенній менопаузі вищезгадані патологічні процеси мають більш гострий та тяжкий перебіг [92, 137, 286].

Існують повідомлення про успішність експериментального лікування передчасного згасання функції яєчників, викликаного хіміотерапією з застосуванням стовбурових клітин, в тому числі амніотичних. Дослідникам вдалося відновити оваріальний резерв, навіть фертильність шляхом внутріоваріального введення стовбурових клітин [212, 314]. Маються повідомлення про запобігання утворенню спайок шляхом введення в черевну порожнину амніотичної рідини [287].

Таким чином, плацента людини є найбільш перспективним джерелом біологічного матеріалу (тканин, клітин, екстрактів) для потреб регенераційної медицини. Це обумовлено доступністю великої кількості матеріалу без шкоди для донорів, відсутністю етичних проблем, можливістю отримання аутоматеріалу для банкування, великим проліферативним потенціалом клітин, великою кількістю стовбурових клітин, низкою імуногенністю, можливістю існування в чужорідному організмі, ендокринною та

паракринною активністю. Плацентарні препарати неодноразово досліджувались та застосовувались при різних патологічних станах. Тканини та клітини мають тропність до жіночої статеві системи, змінює її функції та подальше життя жінки, що відкриває перспективи для застосування плацентарних препаратів в лікуванні гінекологічної патології, що може покращити як демографічну ситуацію, так і якість життя жінок. Невирішеними є декілька наукових задач. По перше, для застосування біологічних препаратів необхідно мати стандартизовані технології низькотемпературного банкування, вивчити вплив факторів кріоконсервування на різні плацентарні біоб'єкти, передбачити зміни біоб'єктів після кріоконсервування, розробити технології їх зберігання. По друге необхідно визначити вплив кріоконсервованих плацентарних біоб'єктів на жіночу статеву систему, як окремі структури, так і організм в цілому. По - третє необхідно визначити як застосування плацентарних біоб'єктів впливає на перебіг патологічних процесів жіночої статеві сфери, визначити перспективність такого лікування.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Дизайн дослідження

Враховуючи визначену мету та поставлені задачі було заплановано три послідовних етапи досліджень, обґрунтовані в попередньому розділі (рис. 2.1.).

На першому етапі отримували похідні плаценти (клітини, експланти, сфероїди, клітинами плаценти в альгінатних мікросферах), вивчали їх кріочутливість, особливості кріоушкоджень, перспективність довгострокового зберігання. Для дослідження було обрано кілька трофобластичних структур, які можуть бути використані в медичній практиці. Експланти, що представляють відокремлені ворсини є природною структурою плаценти здатною до функціонування в чужорідному організмі. Сфероїди були обрані, як структура, що містить функціональні клітини, об'єднанні за рахунок адгезії без інших компонентів [226]. Альгінатні мікросфери з клітинами плаценти обрані, як клітини, об'єднанні полімерним носієм. Клітини обрані як класичний об'єкт регенеративної медицини, трансплантології та кріомедицини.

Визначали вихідні параметри, збереженість та життєздатність після кріоконсервування, гіпотермічного зберігання, моделювання довгострокового зберігання. Особливу увагу приділяли визначенню механізмів кріоушкодження. Обирали найбільш перспективні форми плацентарних об'єктів для клінічного застосування.

На другому етапі дослідження вивчали вплив кріоконсервованих похідних плаценти на ізольовані компоненти жіночої репродуктивної системи для виключення їх взаємного впливу та впливу регуляторних систем. Методами парного культивування оцінювали вплив факторів, що виділяють похідні плаценти на культури клітин фібробластів, як загальноприйнятий об'єкт, нервові клітини, як елемент регуляції статевої функції, спленоцити, як елемент імунної системи, органотипові культури

матки та яєчників, як основні органи мішені. Порівнювали дію різних похідних плаценти в нативному стані та після кріоконсервування.

На третьому етапі вивчали вплив похідних плаценти на організм лабораторних тварин, як в нормі, так і при типових патологічних станах жіночої репродуктивної системи. На інтактних тваринах було вивчено вплив похідних плаценти на структуру оваріального циклу, фертильність. У якості патологічних процесів були обрані інфекційний процес, аутоімунний процес (антифосфоліпідний синдром), ендокринна патологія (на прикладі синдрому полікістозних яєчників), травма та ішемія (перекрут яєчників, операційна травма), ятрогенна патологія (стан після хіміотерапії). Визначали вплив похідних плаценти на інтактний організм, показання, протипоказання для їх застосування при гінекологічній патології, ефективність.

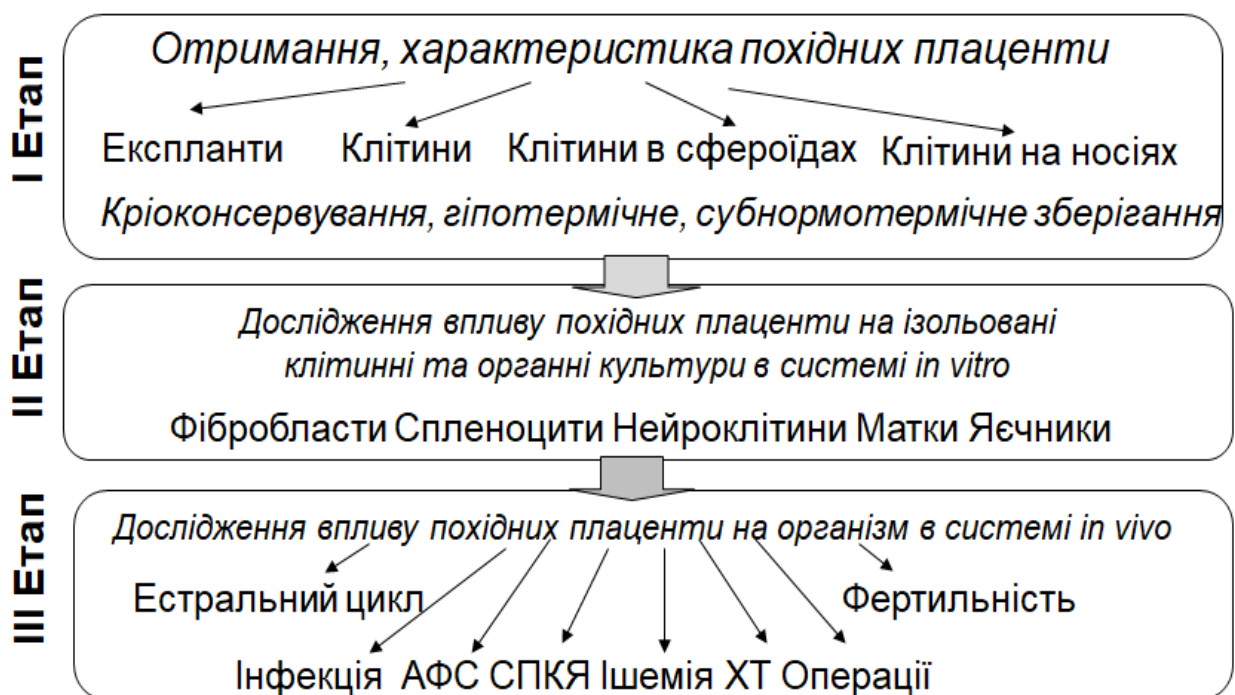


Рис. 2.1. Дизайн експерименту.

2.2. Методи отримання похідних плаценти

Первинну культуру клітин плаценти отримували окремо з двох можливих джерел – оболонок та ворсин плаценти. Згідно даних літератури, описаних в попередньому розділі два джерела мають близьке ембріональне

походження, містять клітини трофобластичного та мезенхімального походження. Інші частини плаценти – пуповина та кордова кров, амніотична рідина мають відмінності по ембріогенезу та менш клітини з меншим проліферативним потенціалом, їх виділення та культивування не включено до цього дослідження.

Клітини з плацентарних оболонок людини отримували за допомогою ферментативного методу [224]. Оболонки промивали в PBS з 10% ципрофлоксацином (Fresenius Kabi, Bad Homburg, Німеччина), а потім розрізали на дрібні шматочки і інкубували в присутності 0,25% трипсину («BioWest», Франція) протягом 1 години при 37°C. Після інактивації трипсину 10% фетальною бичачою сироваткою («Lonza», Німеччина) зразки фільтрували через клітинний фільтр 100 мкм (BD Biosciences, Durhan, США), клітинну суспензію центрифугували протягом 5 хв при 1200 оборотах на хвилину (ЦЛМН-Р10/2700-Електон, Росія), клітинний осад ресуспендували в DMEM з високим вмістом глюкози і L-глутаміном та піруватом («BioWest», Франція), збагачене 10%-ми фетальної бичачої сироватки («Lonza», Німеччина), антибіотиком, антимікотиком (PPA, Австрія) і висівали на 25 см² флаконах («SPL», Корея). Культивували клітини на флаконах та культуральних планшетах («SPL», Корея), в CO₂ інкубаторі (Thermo Fisher Scientific, США) при 37 °C в атмосфері 5 % CO₂, середовище міняли кожні 2 - 3 діб, пересівали при формуванні моношару.

Клітини з ворсин плаценти людини також отримували за допомогою ферментативного методу [177, 224]. Ворсини промивали в PBS з 10% ципрофлоксацином (Fresenius Kabi, Bad Homburg, Німеччина), а потім розрізали на дрібні шматочки і інкубували в присутності 0,25% трипсину («BioWest», Франція) та ДНКаз 0,1 мг/мл протягом 1 години при 37°C. Надосад зливали, після інактивації ферментів 10% фетальною бичачою сироваткою («Lonza», Німеччина) зразки фільтрували через клітинний фільтр 100 мкм (BD Biosciences, Durhan, США), клітинну суспензію центрифугували протягом 5 хв при 1200 оборотах на хвилину (ЦЛМН-Р10/2700-Електон,

Росія), клітинний осад ресуспендували в DMEM з високим вмістом глюкози і L-глутаміном та піруватом («BioWest», Франція), збагачене 10%-ми фетальної бичачої сироватки («Lonza», Німеччина), антибіотиком, антимікотиком (PPA, Австрія) і висівали на 25 см² флаконах («SPL», Корея). До залишків тканини знов додавали розчин з ферментами та процедуру повторювали тричі. Культивували клітини на флаконах та культуральних планшетах («SPL», Корея), в CO₂ інкубаторі (Thermo Fisher Scientific, США) при 37 °C в атмосфері 5 % CO₂, середовище міняли кожні 2 -3 діб, пересівали при формуванні моношару.

Експланти плаценти отримували шляхом фрагментації плаценти, після її відмивання, до окремих ворсин розміром до 3 мм завдовжки. Отримані ворсини відмивали, культивували при необхідності в 12 лункових планшетах в середовищі DMEM з високим вмістом глюкози і L-глутаміном та піруватом («BioWest», Франція), збагаченому 10%-ми фетальної бичачої сироватки («Lonza», Німеччина), антибіотиком, антимікотиком (PPA, Австрія) в CO₂ інкубаторі (Thermo Fisher Scientific, США) при 37 °C в атмосфері 5 % CO₂. На 10 мг ворсин застосовували 1 мл середовища, яке змінювали кожну добу.

Сфероїди з культури клітин методом висячої краплі [130, 226]. Для чого клітини плаценти, зняті з пластику ресуспензували в середовищі культивування в концентрації 5×10^5 /мл, на внутрішню поверхню кришки неадгезивної чашки Петрі наносили краплі по 30 мкл. В нижню частину наливали 20 мл стерильної дистильованої води для зберігання вологості та накривали її кришкою з клітинами. Через 24 години сформовані у краплинах сфероїди обережно змивали, відстоювали, надлишок рідини відбирали.

Альгінатні мікросфери з клітинами плаценти отримували шляхом полімеризації альгінату натрію в присутності іонів кальцію [238]. Для цього готували 1% розчин альгінату натрію на PBS, після чого ресуспензували в отриманому розчині клітини плаценти в концентрації 1×10^6 /мл. Через шприць з голкою, розміром 29 G капали отриманий розчин в 2% розчин

хлориду кальцію з висоти 3-5 мм. Отримані альгінатні мікросфери переносили в середовище культивування.

Клітини плаценти характеризували за допомогою зворотної транскрипції і полімеразної ланцюгової реакції для маркерів МСК. Виділення РНК проводили із застосуванням reqGOLD Total RNA Kit (Pqclab GmbH, Erlangen, Німеччина) відповідно до протоколу виробника.

Концентрацію РНК вимірювали за допомогою фотометра NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Німеччина). РНК транскрибували в комплементарні ДНК (кДНК) з застосуванням High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies GmbH, Дармштадт, Німеччина), додаючи праймери (IPT Molbiol, Берлін, Німеччина). Олігонуклеотидні послідовності фрагментів, розмірі і номери наведені в таблиці 2.1.

Таблиця 2.1

Олігонуклеотидні послідовності фрагментів, застосованих в ПЦР

Ген	Послідовність	Розмір фрагменту (bp)	Номер
CD 90	5'- TCC CAG AAC GTC ACA GTG CT - 3' 5'- AGG GAC ATG AAA TCC GTG GC - 3'	134	NM_006288.3
CD 73	5'- ATG GCT CCT CTC AAT CAT GC - 3' 5'- ATC AAT GGG CGA CCG GAT AC - 3'	158	NM_001204813.1
CD 105	5'- AGG CCC TGG GAA TCC CAC TG - 3' 5'- GGA TGC TCT GGG GGT CAT TC - 3'	180	NM_001114753.2
CD 34	5'- AAT CTG ACC TGA AAA AGC TG - 3' 5'- ACC GTT TTC CGT GTA ATA AG - 3'	212	NM_001025109.1

Характеристика клітин плаценти методом проточної цитометрії.
Клітини були видалені і забарвлені відповідними антитілами. Клітини, інкубовані із вторинним антитілом, були використані в якості контролю. Клітини інкубували при кімнатній температурі з первинним і вторинним

антитілом протягом 1 години послідовно. Після кожного кроку клітини двічі промивали в PBS, а потім аналізували за допомогою FACSCalibur™ (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Germany) проточному цитометрі зі швидкістю 10000 подій в вимірі. Інформація про первинних і вторинних антитіл, використовуваних для проточної цитометрії експериментів наведені в таблиці 2.2.

Таблиця 2.2

Антитіла, використані для фенотипування клітин

CD antigen	Company	Cat N	Dilution
CD105	Dianova	DLN - 07243	1:100
CD73	Abcam	7G2 ab54217	1:250
Вторинні антитіла			
DyLight 488 Donkey Anti-Mouse IgG	Dianova	91518	1:400

Направлене диференціювання проводили у адипогенному, хондрогенному та остеогенному напрямку.

Для адипогенного диференціювання клітини засівали в концентрації 5×10^4 клітин/лунку на 6-лунковий планшет (Cellstar, Greiner BioOne, Frickenhausen, Germany) і культивували протягом 14 днів в DMEM з додаванням 20 mM HEPES (Biochrom AG, Берлін, Німеччина), 20% FCS, HyClone™ (Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Німеччина), 1 мкМ дексаметазону (Sigma-Aldrich, St. Louis, США), 0,5 mM 3-ізобутил-1-метилксантину (Sigma-Aldrich, США), 60 мкМ індометацину (Sigma-Aldrich, St. Louis, США), 1% (об/об) пеніциліну/стрептоміцину (Biochrom AG, Берлін, Німеччина), і 10 мкг / мл інсуліну (Sigma-Aldrich, Сент-Луїс, США). Через 14 днів фарбували Oil Red O для оцінки формування ліпідних вакуоль. Якщо коротко, клітини промивали PBS потім фіксували протягом 20 хв в 10% формаліні і двічі промивають ddH₂O з подальшою кінцевої промиванням 50%-ним етанолом. Ліпідні вакуолі були виявлені після 10-хвилинної інкубації в маслі Red O (Sigma-Aldrich, St. Louis, США) в ацетоні та 50% етанолу з остаточної промиванням водою і візуалізували мікроскопічно.

Для остеогенного диференціювання клітини засівали в концентрації 5×10^4 клітин/лунку на 6-лунковий планшет (Cellstar, Greiner BioOne, Frickenhausen, Germany) і культивували протягом 21 днів в DMEM LG (Biochrom AG, Берлін, Німеччина) з додаванням 20 мМ HEPES буфера і 10% FCS HyClone™, 0,1 мкМ дексаметазону, 0,05 мМ L-аскорбінової кислоти-2-фосфату (Sigma-Aldrich, St. Louis, США), 1% (об / об) пеніциліну / стрептоміцину і 3 мМ натрій дигідрофосфат моногідрату (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany). Після того, як 21 дня, мінералізація клітин, диференційованих в остеобласти була виявлена фарбуванням Von Kossa. Якщо коротко, мінералізовані клітини двічі промивали PBS і фіксували 10% формаліном, потім один раз промивали PBS і двічі ddH₂O з подальшим додаванням 1% нітрату срібла (Riedel de Haen GmbH, Німеччина). Після цього планшет піддавали впливу сонячного світла протягом 30 хв, промивали ddH₂O, фарбували протягом 5 хв з 5% натрію тіосульфатом (Sigma-Aldrich, St. Louis, США) і знову обполіскували з ddH₂O. Мінералізація візуалізували мікроскопічно.

Для хондрогенного диференціювання висівали $2,5 \times 10^5$ клітин/лунку 96-лункового планшету (Cellstar, Грейнер BioOne, Frickenhausen, Німеччина), гранулювали шляхом центрифугування протягом 5 хв при 200 об\хв. Осад інкубували протягом 21 днів в середовищі DMEM, HG (Biochrom AG, Берлін, Німеччина) з додаванням 20 мМ HEPES буфера, 1% (об/об) пеніцилін/стрептоміцин, 1% (об/об) ITS Universal Cell Culture Supplement Premix (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Germany), 0,1 мкМ дексаметазону, 0,17 мМ L-аскорбінової кислоти-2-фосфат (Sigma-Aldrich, St. Louis, США), 0,35 мМ L-проліну (Biochrom AG, Берлін, Німеччина), 1 мМ пірувату натрію (Biochrom AG, Берлін, Німеччина) і 10 нг/мл трансформуючого фактора росту- β (PeproTech GmbH, Hamburg, Німеччина). Середовище зміни проводили кожні 3 дні. Через 21 день, гранули фіксували з 10% параформальдегіду, і фарбували альціановим синім (Sigma-Aldrich, St. Louis, США) в якості індикатора сульфатованих глікозаміногліканів. Все

диференціювання процедури були виконані в трьох повторах і в порівнянні з недиференційованими клітинами в якості контролю.

2.3. Методи оцінки похідних плаценти

Життєздатність культури клітин та похідних плаценти оцінювали за методами вітального забарвлення з застосуванням 7AAD, пропідіум йодиду, етидіум броміду, флюорисциндіацетату, нейтрального червоного, трипанового синього. Метаболічну активність вивчали методами МТТ тесту, тесту відновлення резазуріну, активністю продукцією лактат-дегідрогенази, лужної фосфатази, поглинанням глюкози з живильного середовища.

Кількість клітин підраховували у гемоцитометрі Neubauer (Marienfeld-Superior, Lauda-Königshofen, Germany), кількість клітин, підрахованих у великому квадранті помножували на 10^4 з урахуванням розведення.

Адгезивні властивості вивчали, пасажуючи клітини на 6-ти лунковий планшет у кількості 2×10^5 клітин на лунку, культивували в CO_2 інкубаторі (ThermoScientific, США) при 5% CO_2 та 37°C . Через добу неадгезовані клітини змивали, залишені клітини змивали 0,25% розчином трипсину та підраховували.

Культуральні властивості вивчали, пасажуючи клітини на 6-луночний планшет у кількості 2×10^5 клітин на лунку, культивували в CO_2 інкубаторі (ThermoScientific, США) при 5% CO_2 та 37°C до формування моношару.

Трипановий синій готували у вигляді 0,4% розчину на PBS та додавали до суспензії клітин у співвідношенні 1:1, через 3 хвилини підраховували кількість забарвлених та незабарвлених клітин.

Нейтральний червоний готували у вигляді 0,01 % розчину на PBS та додавали до суспензії клітин у співвідношенні 1:1, через 3 хвилини підраховували кількість забарвлених та незабарвлених клітин.

MTT тест використовували для оцінки метаболічної активності клітин чи тканин. Лунки промивали двічі PBS, середу міняли на свіжу.

Додавали МТТ («Sigma», США) в кінцевій концентрації 0,5 мг/мл, інкубували 4 години, після чого середу акуратно відбирали, кристали формагану розчиняли 10% розчином SDS на диметилсульфоксиді. Абсорбцію вимірювали на планшетному спектрофотометрі SM600 («Utrao», Китай) при довжині хвилі 570 нм. Кожен експеримент повторювали на трьох різних культурах клітин, з кожної з яких враховували 8 проб. При проведенні тесту з тканинами формаган екстрагували 96% етанолом та вимірювали абсорбцію отриманого розчину. У разі проведення тесту з тканинами оптичну щільність вимірювали на спектрофотометрі PV 1251C (Solar, Білорусія).

Тест відновлення резазурину використовували для оцінки метаболічної активності клітин чи тканин. Лунки промивали двічі PBS, середу міняли на свіжу. Додавали резазурин («Sigma», США) в кінцевій концентрації 0,15 мг/мл, інкубували 24 години. Абсорбцію вимірювали на планшетному спектрофотометрі SM600 («Utrao», Китай) при довжині хвилі 590 нм. Кожен експеримент повторювали на трьох різних культурах клітин, з кожної з яких враховували 8 проб. У разі проведення тесту з тканинами оптичну щільність вимірювали на спектрофотометрі PV 1251C (Solar, Білорусія).

Визначення активності лактатдегідрогенази, лужної фосфатази та поглинання глюкози з живильного середовища.

Похідні плаценти культивували протягом 24 годин в 1 мл живильного середовища за вищеписаною методикою, використовували комерційні набори «Лактатдегідрогеназа-L Liquid 100» (Erba Lachema s.r.o, Чехія), «Лужна фосфатаза - MEG Liquid 50» (Erba Lachema s.r.o, Чехія), «Глюкоза Liquid 500 C» (Erba Lachema s.r.o, Чехія) в відповідно до інструкції виробника. Вимірювали оптичну щільність на спектрофотометрі PV 1251C (Solar, Білорусія).

Забарвлення пропідієм йодідом застосовували для оцінки життєздатності похідних плаценти методами проточної цитометрії та

конфокальної мікроскопії. До 100 мкл суспензії клітин чи інших похідних плаценти, додавали 10 мкл розчину пропідію йодиду («Sigma», США) на PBS в концентрації 10 мкг/мл, інкубували 15 хвилин у темряві, оцінювали на проточному цитофлюориметрі FACSCalibur™ (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Germany) при довжені хвилі 617 нм (FL3(2)) чи лазерному скануючому конфокальному мікроскопі (Zeiss LSM 510 META; Carl Zeiss, Germany) з програмним забезпеченням LSM 510 software ver.4.2 (Carl Zeiss, Germany).

Забарвлення 7AAD. До 70 мкл суспензії клітин чи інших похідних плаценти, додавали 5 мкл розчину 7AAD («Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Germany»), інкубували 15 хвилин у темряві, оцінювали на проточному цитофлюориметрі FACSCalibur™ (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Germany) при довжені хвилі 650 нм (FL3).

Забарвленням *флюорисциндіацетатом (FDA) та етідіум бромідом (EB)* за методом [238]. Робочій розчин готували змішуючи 3 мл PBS з 5 мкл розчину FDA на ацетоні (5 мг/мл), 5 мкл EB на етанолі (5 мг/мл). В робочому розчині ресуспензували клітини чи похідні плаценти. Результати оцінювали на інвертованому лазерному скануючому конфокальному мікроскопі (Zeiss LSM 510 META; Carl Zeiss, Germany) з програмним забезпеченням LSM 510 software ver.4.2 (Carl Zeiss, Germany). Зображення отримували при волні збудження 488 нм, абсорбції 508-550 нм для FDA та 593-646 нм для EB. Клітини забарвлені FDA вважали життєздатними, а EB – мертвими. Розмір лазерної апертури (пенхол) дорівнював 150 нм. Аналізували окремі зрізи з трьохвимірних проекцій.

Дослідження апоптозу проводили за допомогою FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit with PI («Biolegend», США), згідно інструкції виробника, результати оцінювали на проточному цитофлюориметрі FACSCalibur™ (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Germany). Для цього клітини промивали cell staining bufer, 3×10^5 клітин ресуспензували в 100 мкл Annexin V binding bufer, додавали 5 мкл Fitec Annexin V, 10 мкл PI, 400 мкл

Anexin V binding bufer, аналізували. Клітини, забарвлені PI вважали мертвими, забарвлені Annexin V – апоптотично зміненими.

Кріомікроскопічне дослідження проводили на кріомікроскопічному комплексі КП 6 (СКТБ ІПКіК НАН України), на мікроскопі МБІ 15U 4.2 (ЛОМО, Ст.Петербург, Росія) з камерою UCMOS 3100 (SIGETA, Hangzhou, China), та програмним забезпеченням Tour View v.3.7. (Hangzhou TourTek Photonics Co. Ltd, Hangzhou, China). Для чого у камері кріомікроскопу розміщували 50 мкл середовища з біооб'єктом. Охолодження проводили При дослідженні клітин альгінаті для досягнення прозорості препарату в камері розміщували 50 мкл 1% альгінату натрію на 0,9% NaCl з клітинами в концентрації 10^6 /мл, після чого розчин полімерізували розчином 10% CaCl_2 на 0,9% NaCl. PBS не застосовували для полімерізації, оскільки фосфати змінюють прозорість препарату. Після чого отриману плівку покривали середовищем кріоконсервування з 10% ДМСО та покривним склом. Окремо проводили кріомікроскопію без ДМСО.

Для визначення впливу ДМСО на розчин альгінату до розчинів ДМСО у 0,9% NaCl у концентраціях 100, 50, 25, 20, 15, 10% по краплям додавали 1% розчин альгінату натрію. Також до розчинів ДМСО у розчині Версену у концентраціях 100, 50, 25, 20, 15, 10% по краплям додавали 1% розчин альгінату натрію.

2.4. Методи гіпотермічного зберігання та кріоконсервування похідних плаценти

Гіпотермічне зберігання клітин. Клітини знімали з культурального флакону за допомогою трипсину, трипсин інактивували FBS, відмивали, підраховували кількість клітин. Для гіпотермічного зберігання клітин застосовували середовище культивування, яким доводили концентрацію клітин до 2×10^5 /мл, що співпадало з співвідношенням середовища до кількості клітин при культивуванні. Зберігали клітини в 10 мл полістиролових пробірках з неадгезивною поверхнею (SPL, Корея). Частину

зразків зберігали при температурі $+18^{\circ}\text{C}$ $+25^{\circ}\text{C}$ (кімнатній температурі), та перевіряли їх життєздатність та функційний стан на 24-у, 48-у, 72-у, 96-у год. Частину зразків зберігали при температурі $+4^{\circ}\text{C}$ $+8^{\circ}\text{C}$ (гіпотермічне зберігання), та перевіряли їх життєздатність та функційний стан на 24-у, 48-у, 72-у, 96-у год. У якості контролю застосовували клітини, щойно зняті з культурального флакону, у якості негативного контролю – клітини, відмиті в 96° етанолі при температурі -18°C .

Кріоконсервування клітин. МСК плаценти, отримані за вищеописаною методикою знімали з культуральної посуду, відмивали від трипсину, в концентрації $6 \times 10^5/\text{мл}$ еквілібрували в кріозахисному середовищі при температурі 20°C протягом 15 хвилин, заморожували зі швидкістю 1°C до -70°C на програмному заморожувачі «ЗП-10» (СКТБ ІПКіКНАНУ, Україна), потім занурювали у рідкий азот, зберігали протягом 1-7-и діб у низькотемпературному сховищі ХБ-05 (Росія), потім розморожували на водяній бані при 37°C .

Аналіз впливу кріозахисних середовищ на збереженість клітин. У якості кріозахисних середовищ використовували середу культивування з 10% FBS та додаванням кріопротекторів, в найбільш розповсюджених за даними літератури концентраціях: 5% ДМСО, 10% ДМСО, 15% ДМСО, 11,4% пропандіол, 6,8% сахароза, 9,3 % етиленгліколь, 13,8% гліцерин, без кріопротектору. Для подальшого підбору кріозахисного середовища з мінімальним вмістом речовин, не дозволених в медичній практиці замінювали середовище культивування на розчин Хенксу, Рінгеру, чи 0,9% розчин хлористого натрію, з додаванням 10% ДМСО. Застосовували кріозахисне середовище на основі середовища культивування з 10% ДМСО без додавання FBS. У якості альтернативних кріозахисних середовищ застосовували фармакопейні плазмозамінники, до складу яких входять речовини з кріопротективними властивостями: поліглюкін (6% декстран), неогемодез (6% полівінілпіролідон), стабізол (6% гідроксиетилкрахмал), реосорбілакт (6% сорбітил). У якості позитивного контролю застосовували

неконсервовані клітини, у якості негативного контролю – клітини, заморожені без кріопротекторів.

Аналіз впливу режиму охолодження проводили з клітинними суспензіями в стандартній культуральному середовищі, що містить 10% FBS, та з додаванням 10% ДМСА як CPA. Зразки охолоджували в програмному заморожувачі ЗП-10 зі швидкістю 1°C/хв до 20° С, 30° С, 40° С, -50° С, -60° С, і -70°С, з наступним зануренням у рідкий азот, зберігали протягом 7 днів з подальшим розморожуванням в водяній бані. Як негативний контроль застосовували зразки клітин, кріоконсервовані без кріопротектору.

Крім того, досліджували клітини, які були розморожені і знову заморожені в тому ж середовищі без промивання та рекультивування.

Для оцінки впливу коливань температур на МСК плаценти, методом найбільш наближеним до реального біологічного об'єкта виймали з низькотемпературного сховища у штатній касеті та залишали при температурі +20°C у штатній касеті до досягнення необхідної температури, яку контролювали за допомогою двоканального вимірювача температур «Овен ТРМ 200» (Росія), після цього касету з кріопробірками занурювали у рідкий азот.

Температуру в зразках підвищували до -80°C, -100°C, -150°C. Кількість циклів підвищення температури складала 5, 10, 20, 30, 40, 50 для кожної температури.

Розморожували біооб'єкти перед дослідженням за класичною методикою - на водяній бані при температурі +40° С до утворення рідкої фази.

2.5. Методи оцінки властивостей похідних плаценти на моделях *in vitro*

Для оцінки властивостей похідних плаценти в моделях *in vitro* було обрано методи парного культивування, при яких культури клітин фібробластів, нейральних клітин, спленоцитів, органотипових культур

яєчників та маток культивували в присутності середовищ кондиційованих похідними плаценти [225] протягом 24 годин в умовах описаних вище. Стан культур оцінювали морфологічно: клітинні культури за допомогою інвертованого мікроскопу Delta Optical NIB-100 (Польща), органотипові культури – після приготування гістологічних препаратів з забарвленням гематоксиліном та еозином. Метаболічну активність оцінювали за результатами МТТ тесту та тесту відновлення резазурину.

Для отримання культури фібробластів [197] матку миші лінії BALB/c на 18 добу вагітності видаляли, промивали 70% етанолом, потім PBS. Видаляли плоди, відокремлювали шкіру, фрагментували її до 1-2 мм, інкубували в присутності 0,25% трипсину («BioWest», Франція) протягом 1 години при 37°C. Після інактивації трипсину 10% FBS («Lonza», Німеччина) зразки фільтрували через клітинний фільтр 100 мкм (BD Biosciences, Durhan, США), клітинну суспензію центрифугували протягом 5 хв при 1200 оборотах на хвилину (ЦЛМН-Р10/2700-Елекон, Росія), клітинний осад ресуспендували в DMEM з високим вмістом глюкози і L-глутаміном та піруватом («BioWest», Франція), збагачене 10%-ми FBS («Lonza», Німеччина), антибіотиком, антимікотиком (РРА, Австрія) і висівали на 25 см² флаконах («SPL», Корея). Культивували клітини на флаконах та культуральних планшетах («SPL», Корея), в CO₂ інкубаторі (Thermo Fisher Scientific, США) при 37 °C в атмосфері 5 % CO₂, середовище міняли кожні 2 -3 діб, пересівали при формуванні моношару. Для експериментів застосовували 4 пасаж клітин. Для проведення МТТ тесту брали 10⁴ клітин на лунку 96-лункового планшету, залишали клітини на 24 години для прикріплення, після чого проводили експеримент.

Нейральні клітини виділяли з головного мозку новонароджених щурів лінії Wistar в першу добу після народження раніше розробленим методом. Для цього тканину дезагредовані протягом 15 хв в 0,25% розчині трипсину (BioWest, Франція) на фосфатно-сольовому буфері (PBS) при 37 ° C. Клітини культивували в 6-лункових планшетах (SPL, Корея) в середовищі DMEM з

високим вмістом глюкози і L-глутамін (BioWest, Франція), збагаченої 10% FBS (Lonza, Німеччина) в CO₂ інкубаторі при 37 ° С в атмосфері 5% CO₂. Через 5 діб після адгезії клітини, що не адгезували видаляли промиванням PBS, що залишилися знімали розчином 0,25% трипсину і версія в співвідношенні 1:1 і використовували в моделі глутаматної ексайтотоксичності.

Для моделювання *глутаматної ексайтотоксичності* [169] нейтральні клітини переносили в 96 лунковий планшет в концентрації 2×10^4 на лунку на 1 добу для прикріплення, після чого середу замінювали на свіжу з додаванням глутамату (Sigma, США) з кінцевою концентрацією 10 ммоль і інкубували 1 добу в колишніх умовах. Для оцінки метаболічної активності клітин використовували МТТ-тест. При цьому показник МТТ-тесту для клітин без впливу брали за 100%.

Спленоцити отримували з селезінки миші лінії BALB/с. Для цього селезінку видаляли, паренхіму обережно відділяли від капсули, фрагментували, фільтрували через клітинний фільтр 100 мкм (BD Biosciences, Durhan, США), клітинну суспензію центрифугували протягом 5 хв при 1200 оборотах на хвилину (ЦЛМН-Р10/2700-Елекон, Росія), клітинний осад ресуспендували в RPMI з («BioWest», Франція), збагачене 10%-ми FBS («Lonza», Німеччина), антибіотиком, антимікотиком (PPA, Австрія). Для проведення МТТ тесту брали 10^5 клітин на лунку 96-лункового планшету після чого проводили експеримент [295].

Реакції спонтанної і індукованої бласттрансформації лімфоцитів (РБТЛ) проводили за стандартною мікрокультуральною методикою з фітогемаглютеніном. Для цього з селезінки миші лінії BALB / с шляхом механічної гомогенізації отримували клітинну суспензію, розводили середовищем DMEM до концентрації 5×10^6 клітин в 1 мл. Культивували 0,1 мл клітинної суспензії з 0,1 мл середовища (що містить DMEM - 22 мл, телячої сироватки - 2,5 мл, глютаміна - 0,25 мл, HEPES - 0,25 мл, 2-ME -

0,015 мл , по 0,025 мл пеніциліну і стрептоміцину) протягом 48 годин. Кількість бластів на 250 клітин оцінювали морфологічним методом [69].

Для отримання короткочасної *органотипової культури маток* [317] матки мишей лінії BALB/c в фазі еструсу відокремлювали, розрізали в поперечному напрямку на фрагменти до 3 мм, культивували в 24 лункових планшетах («SPL», Корея), по 10 мг тканини на 1 мл середовища DMEM з високим вмістом глюкози і L-глутамін (BioWest, Франція), збагаченої 10% FBS (Lonza, Німеччина) в CO₂ інкубаторі (Thermo Fisher Scientific, США) при 37 °C в атмосфері 5 % CO₂. культивування проводили не більше 3-х діб.

Для отримання короткочасної *органотипової культури яєчників* застосовували ті ж методи: яєчники мишей лінії BALB/c в фазі еструсу відокремлювали, культивували в 24 лункових планшетах («SPL», Корея), по 10 мг тканини на 1 мл середовища DMEM з високим вмістом глюкози і L-глутамін (BioWest, Франція), збагаченої 10% FBS (Lonza, Німеччина) в CO₂ інкубаторі (Thermo Fisher Scientific, США) при 37 °C в атмосфері 5 % CO₂. культивування проводили не більше 3-х діб.

2.6. Методи моделювання патології репродуктивної системи на лабораторних тваринах

Експериментальні тварини. У роботі були використані миші лінії BALB/c та F1 (перше покоління BALB/c та CBA) віком 6-ть місяців, вагою $20,0 \pm 1,5$ г та щури лінії Wistar віком 6-ть місяців та вагою $250,0 \pm 20,0$ г. Протягом експерименту тварини знаходилися при природному освітленні, отримували стандартне харчування *ad libitum*. Тварин утримували відповідно діючим правилам про оснащення і функціонування віварію. Дози КЕП для тварин розраховували згідно діючим рекомендаціям по дослідженню лікарських препаратів та даним літератури [9, 69]. Доза для мишей дорівнювала 10 мг, для щурів 70 мг, які вводили суспензійно у фосфатно-сольовому буфері через товсту голку підшкірно.

Дослідження впливу КЕП на оваріальний цикл та загальний стан проводили на двох групах мишей BALB/c по 10 тварин у кожній. Першій групі було введено КЕП, друга група була контрольна. У мишей брали вагінальні мазки, виявляли фазу циклу, реєстрували вагу, характеризували за 5-бальною шкалою загальний стан (блиск очей, колір і стан шерсті, активність).

При проведенні цитологічного дослідження фази еструсу визначали при наявності поверхневих клітин в препараті (рис. 2.1, А), коли вони збиралися в групи, визначали мета еструс, при наявності слизу та лише базальних клітин констатували дієструс (рис. 2.2, В), в проєструсі серед слизу з'являлися проміжні клітини.

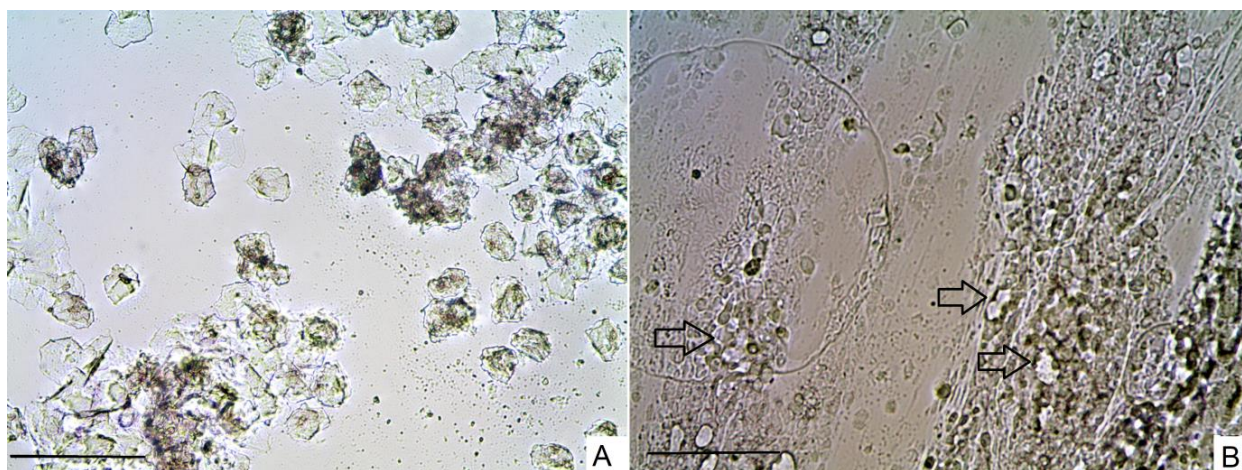


Рис. 2.2. Цитологічне дослідження фаз естрального циклу. А – поверхневі клітини, типові для еструсу та метаєструсу (починають збиратися в групи), В – слиз, проміжні та базальні клітини (позначені стрілками) при дієструсі. Масштабні лінійки 100 мкм.

Проводили гістологічне дослідження маток та яєчників, оцінювали кількість та характер генеративних елементів яєчників, шари матки, стан судин та залоз.

Дослідження впливу КЕП на фертильність проводили на групах мишей BALB/c по 10 тварин у кожній. Першій групі було введено КЕП, друга

група була контрольна. Після введення КЕП самиць спарювали з самцями у співвідношенні 2:1, наявність спарувань підтверджували методом вагінальних пробок та наявністю спермійів при цитологічному дослідженні (рис. 2.3.), реєстрували кількість тварин, які завагітніли, час до пологів, кількість та масу новонароджених.

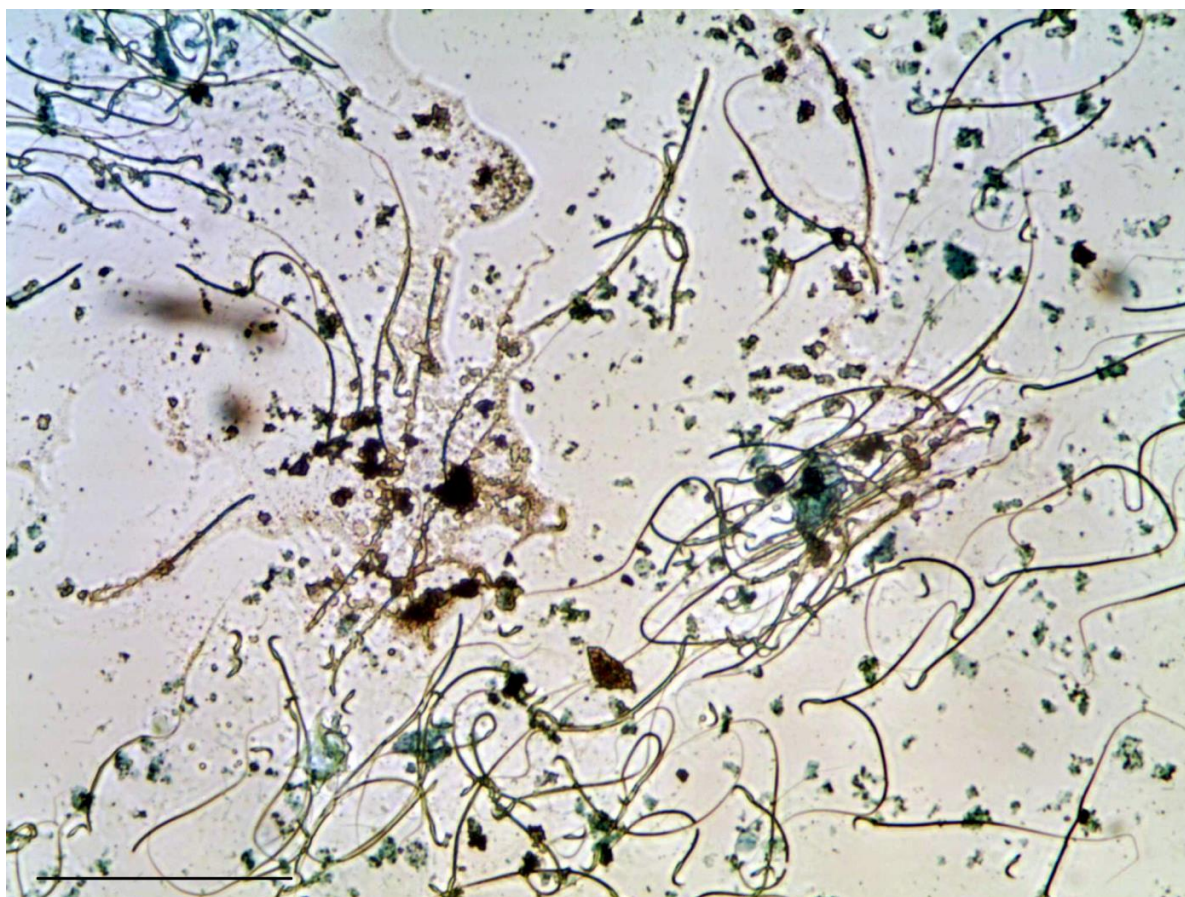


Рис. 2.3. наявність спермійів при цитологічному дослідженні. Масштабна лінійка 100 мкм.

Дослідження впливу КЕП на перебіг інфекційного процесу. Запалення черевної порожнини моделювали на мишах F1 (перше покоління СВА та BALB/c) шляхом перев'язки та пункції нижньої третини сліпої кишки за загальноприйнятим методом [261] (рис. 2.4.). Застосування аутбредної лінії було пов'язано з високою смертністю тварин при моделюванні інфекційного процесу на інбредних тваринах.

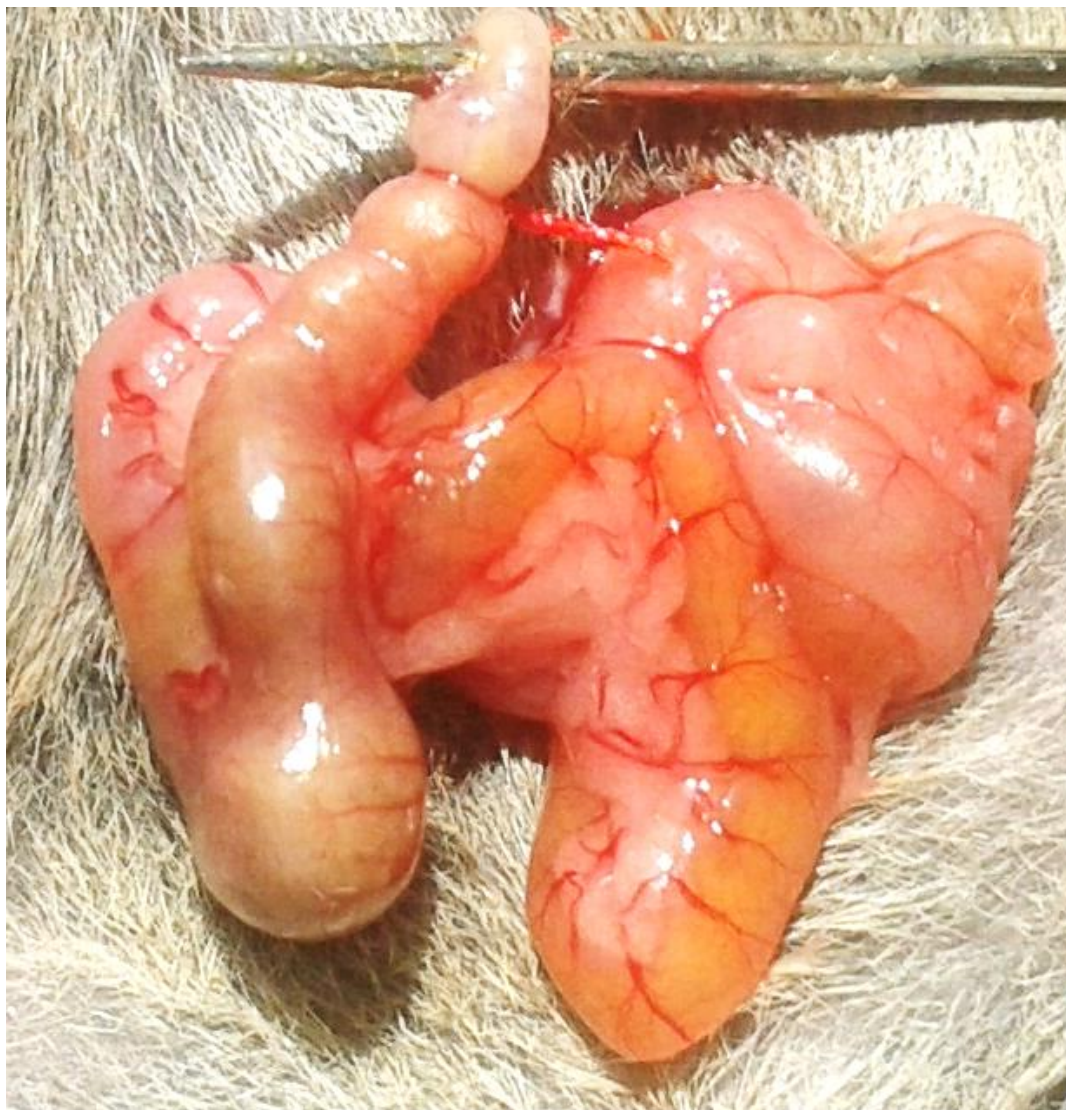


Рис. 2.4. Моделювання запального процесу шляхом пункції та перев'язки сліпої кишки.

Тварин ділили на 3 групи по 10 мишей. 1 - через 2 тижні після моделювання вводили КЕП, 2 - інфекційний процес моделювали, КЕП не вводили, 3 - контрольна група, хібнооперовані тварини. Досліджували клінічний аналіз крові, морфологічну структуру яєчників, матки. Для підтвердження впливу даної моделі на статеву систему, через місяць після операції самиць спарювали з самцями у співвідношенні 2:1, реєстрували час від спарювання до пологів, оцінювали репродуктивні показники, після завершення лактації тварин виводили з експерименту, оцінювали спайковий процес за I-IV ступенями [21].

Дослідження впливу КЕП на перебіг аутоімунного стану проводили на моделі антифосфоліпідного синдрому (АФС), як типового прояву аутоімунної патології, яка впливає на репродукцію. АФС у мишей *BALB/c* моделювали шляхом активної імунізації [303] з використанням кардіоліпінового антигена компанії «Біолек» розведеного у 0,1%-му розчині бичачого альбуміну (Україна), який вводили 1 раз у 7 днів чотириразово, із загальною дозою кардіоліпіну 30 мкг на 1 тварину. АФС вважали сформованим через 4 тижні після останнього введення та підтверджували реакцією мікропреципітації, яку проводили набором реагентів для РМП («Біолек», Україна). Тварин розділяли на три групи по 20 мишей: 1 група – з АФС та введенням КЕП через тиждень після формування моделі, 2 група – з АФС без лікування, 3 група – контрольна. Досліджували клінічний аналіз крові, реакцію бласттрансформації лімфоцитів спонтанну та індуковану через тиждень та 3 тижні після лікування, Через місяць після лікування з кожної групи виводили з експерименту по 10 тварин для гістологічного дослідження матки та яєчників, інших спарювали з самцями у співвідношенні 2:1, час настання вагітності реєстрували методом вагінальних мазків. На 18 добу вагітності тварин виводили з експерименту, оцінювали кількість плодів живих та мертвих, масу плодів, плацент. Проводили гістологічне дослідження плацент.

Дослідження впливу КЕП на перебіг ендокринної патології яєчників проводили на моделі синдрому полікістозних яєчників (СПКЯ). СПКЯ обрали як розповсюджену ендокринопатію з порушенням центральної регуляції та гіперфункції яєчників, при якій спостерігається відносна чи абсолютна гіперестрогенія. СПКЯ моделювали за описаним методом [Ruiz A, 1996] на щурах лінії *Wistar* підшкірним введенням 4 мг мефіпристону («STADA», Росія) розведеному у 0,2 мл персикової олії 1 раз на добу, протягом 8 діб. Тварин розділяли на 3 групи по 12 щурів у кожній. 1 група – тварини з СПКЯ, які отримували КЕП через 2 тижні після формування моделі, 2 група – тварини з СПКЯ без лікування, 3 група – інтактні тварини.

Оваріальний цикл тварин досліджували методом вагінальних мазків. Через місяць після лікування по 6 тварин з групи виводили з експерименту, оцінювали масові коефіцієнти, гістологічні препарати яєчників та матки. Інших самиць спарювали з самцями у співвідношенні 2:1, після пологів визначали кількість подів, вагу плодів, час від початку спарювання до пологів.

Дослідження впливу КЕП на реабілітацію після травми та ішемії вивчали на моделі перекруту яєчників (ПЯ). ПЯ моделювали на щурах лінії Wistar за методом Taskin O. Et al., 1998 [290], шляхом накладання лігатури кетгутом («Ігар», Україна, №6) на 1 см нижче правого яєчника на матку з мезосальпінгсом на 4 години з наступною релапаротомією та зняттям лігатури. Тварин ділили на 3 групи по 12 щурів у кожній. 1 група – тварини після моделювання ПЯ з введенням КЕП в післяопераційному періоді, 2 група – тварини після моделювання ПЯ без лікування, 3 група – хібнооперовані тварини. Під час другої операції по 2 тварині з кожної групи виводили з експерименту для морфологічного дослідження матки та яєчників для підтвердження формування патологічного процесу. Інших тварин через місяць після операції спарювали з самцями у співвідношенні 2:1, час настання вагітності реєстрували методом вагінальних мазків. На 18 добу вагітності тварин виводили з експерименту, оцінювали кількість плодів живих та мертвих, масу плодів, плацент. Проводили гістологічне дослідження яєчників.

Дослідження впливу КЕП при синдромі передчасного виснаження яєчників (ПВЯ). Використовували самиць мишей лінії BALB/c з регулярним естральним циклом, який підтверджували методом вагінальної цитології та вагою $20,2 \pm 0,4$ г. Синдром передчасного виснаження яєчників моделювали за методом [314], введенням циклофосфаміду в дозі 200 мг / кг (Baxter Oncology, Німеччина) і бусульфану (Aspen Pharma, Німеччина) в дозі 20 мг/кг. 200 мг циклофосфаміду розчиняли в 20 мл, PBS, додавали 20 мг бусульфану, розчиненого у 2 мл ДМСО і вводили внутрішньочеревно по 0,5

мл кожній тварині. Лікування починали через 2 тижні після хіміотерапії. Тварин поділяли на 3 групи по 15 в кожній: 1 – тварини з моделлю ПВЯ без лікування, 2 - тварини з моделлю ПВЯ з застосуванням КЕП, 3 – інтактні тварини. Кріоконсервовані експланти плаценти вводили по 10 мг через товсту голку внутрішньом'язово. Дозу і режим введення використовували відповідно до рекомендацій по дослідженню препаратів і літературними даними.

Досліджували динаміку зміни ваги тварин. Функцію яєчників досліджували методом вагінальної цитології. Статеву функцію досліджували, підраховуючи кількість вагінальних пробок. Через 4 тижні після хіміотерапії по 5 тварин з групи виводили з експерименту, проводили гістологічне дослідження препаратів яєчників, маток як органів статеві системи, печінки і нирок як органів детоксикації. Через 12 тижнів виводили всіх тварин, проводили гістологічне дослідження препаратів яєчників, маток як органів статеві системи, печінки і нирок.

Дослідження впливу кріоконсервованих похідних плаценти на прояви ускладнень після операцій на жіночих статевих органах. Для моделювання операційної травми матки застосовували модель операції позаматкової вагітності. В експериментах застосовували самиць шурів лінії Wistar віком 5 міс. з середньою вагою 230 г. В фазі еструсу на правому матковому розі робили повздовжній розріз через всі шари, довжиною 1 см на відстані 1 см від яєчника (рис. 2.5, А). Для різання радіохвильовою енергією застосовували обладнання «Надія – 120 РХ» (НДІ Прикладної електроніки, Україна). Розріз ушивали монокрилом 4,0 (рис. 2.5, В). Профілактику спайкоутворення проводили протиспайковим гелем з гіалуронатом натрію 0,5% з декаметоксином 0,02% інтраопераційно по 3 мл. Для моделювання застосовували комбінацію різання радіохвильової енергією з профілактичним застосуванням протиспайкового бар'єру для наближення моделі до реальних оперативних втручань, які за сучасними проводяться лапароскопічним доступом з профілактикою злук.

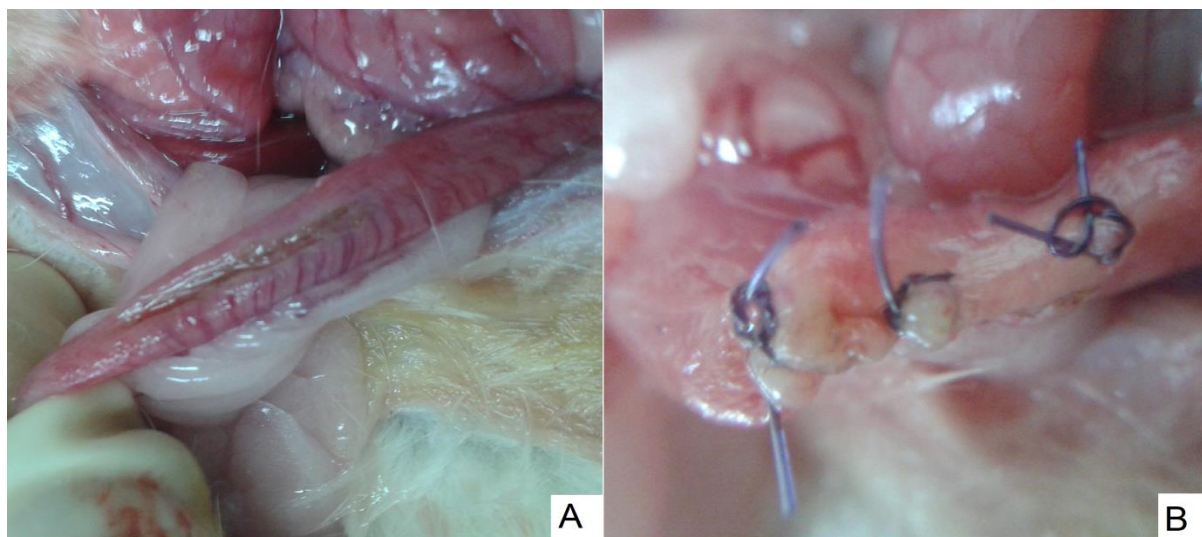


Рис. 2.5. Моделювання оперативного втручання на маткових трубах. А - проведений розріз, В – накладені шви.

Усі тварини було розділено на 3 груп по 12 тварин у кожній: 1 група – тварини з введенням КЕП через добу після операції, 2 – хібнооперовані тварини без лікування похідними плаценти з застосуванням профілактики спайкоутворення, 3 – хібнооперовані тварини без лікування похідними плаценти та без профілактики спайкоутворення. Через 7 діб виводили по 6 тварин з групи з вивченням розвитку у них спайкового процесу за шкалою 0-IV балів [21] (табл. 2.3.).

Таблиця 2.3

Шкала оцінки спайкового процесу у черевній порожнині та навколо статевих органів лабораторних тварин

0 ступінь	Відсутність злук.
I ступінь	Поодинокі, тонкі, які легко видалити (без напруження мезосальпінксу або мезооварію) злуки
II ступінь	Злуки чисельні, тонкі, локалізовані в області післяопераційної рани, злуки, які легко видалити.
III ступінь	Злуки чисельні, товсті, локалізовані в межах органу, який оперувався. Видаляються з малим напруженням мезосальпінкса або мезооварія.
IV ступінь	Злуки чисельні, товсті, поширені за межі малого таза (петлі кишкового, сальник, стінки таза та сечового міхура). При їх видаленні настає напруження або ушкодження очеревини, або стінки органа, або мезосальпінкса.

Проводили гістологічне дослідження маткових рогів, яєчників з забарвленням гематоксилін-еозином. Надалі проведено спарювання з половозрілими самцями та виведення всіх тварин із експерименту на 18 добу після спарювання з вивченням настання у них вагітності. Оцінювали місце розрізу, кількість ембріонів.

2.7. Методи обробки даних

Для обробки зображень застосовували програмне забезпечення ToupView V 3.7. (Hangzhou ToupTek Photonics Co. Ltd, Hangzhou, China) та ImageJ V.1.48. (National Institutes of Health, USA). Для аналізу даних конфокальної мікроскопії додатково застосовували Zeiss LSM Image Browser V. 4.2.0.121 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Germany).

Для аналізу даних проточної цитометрії застосовували програмне забезпечення Flowing Software V.2.5.1. (University of Turku, Finland).

Для отримання статистично вірогідних висновків застосовували U критерій Мана-Уїтні, критерій Краскела-Уолліса. Для статистичних розрахунків та обробки даних використовували програмне забезпечення Past V. 3.15 (University of Oslo, Norway).

2.8. Біоетичні протоколи

Плаценти отримували з інформованої згоди жінок після операції кесарів розтин. Проведення експериментів було погоджено з комітетом з біоетики Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (протокол № 2 від 3.06.2013, протокол № 1 від 26.02.2019), відповідно до «Загальних принципів експериментів на тваринах», схвалених V конгресом з біоетики (м Київ, 2013) і узгоджених з положенням «Європейської Конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986).

РОЗДІЛ 3. ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ФАКТОРІВ КРІОКОНСЕРВУВАННЯ, ГІПОТЕРМІЧНОГО ТА ГІПОТЕРМІЧНОГО ЗБЕРІГАННЯ НА ПОХІДНІ ПЛАЦЕНТИ

В даному розділі представлені результати дослідження впливу факторів кріоконсервування, гіпотермічного та субнормотермічного зберігання на похідні плаценти. Ця робота дозволяє по-перше визначити механізми ушкодження, типові для всіх похідних плаценти та для кожного об'єкту, по-друге – створити ефективні протоколи кріоконсервування та низькотемпературного зберігання для різних біооб'єктів, по-третє – відібрати найбільш перспективні похідні плаценти для подальшого застосування, створити теоретичну базу та виробити практичні рекомендації щодо протоколів низькотемпературного зберігання. До цих факторів, від яких залежить збереженість біоматеріалу відносять склад середовища кріоконсервування (іонний склад, кріопротектор, інші домішки – сироватка чи фактори росту), швидкість та кількість етапів охолодження та відігріву, коливання температур під час зберігання та транспортування, найнижча температура зберігання.

Клітина є елементарною одиницею життя та класичною моделлю дослідження. Проведення дослідження на суспензії клітин дозволяє об'єктивно та точно оцінити вплив окремих факторів на збереженість при виключенні інших факторів (впливу міжклітинного середовища, контактів, біологічно активних сполук) на кожну клітину. Більшість методів об'єктивні для клітинної суспензії, та далеко не всі – для інших похідних плаценти. Тому дослідження проводили перш за все на клітинній суспензії.

Після цього проводили дослідження на інших похідних плаценти – експлантах, сфероїдах, клітинах плаценти в альгінатних мікросферах з урахуванням їх особливостей та можливості застосування різних методів.

Наприкінці проводили порівняння отриманих результатів та відбір похідних плаценти, які доцільно застосовувати в подальшій роботі.

3.1. Дослідження впливу факторів кріоконсервування, субнормотермічного та гіпотермічного зберігання на клітини плаценти

В розділі наведено характеристику первинних культур клітин плаценти, отриманих з різних джерел, їх порівняння. Проведені дослідження впливу факторів кріоконсервування та гіпотермічного зберігання на клітини. Особливу увагу приділено можливості створення методів низькотемпературного зберігання на основі GMP вимог та обладнань, що мають клінічні установи [209].

Характеристика культури клітин плаценти.

При виділенні клітин з плідних оболонок на першу добу спостерігали невелику кількість еритроцитів, детриту, що пояснювалось відсутністю васкуляризації оболонок, велику кількість клітин, що адгезували до пластику. Протягом перших 2-3 діб, коли клітини адгезували середовище обережно частково змінювали. Через тиждень клітини, які не адгезували, детрит змивали PBS та змінювали все середовище. Більше половини отриманих після ферментації клітин адгезувало до пластику. На нульовому пасажі культура складалася з поліморфних клітин. Більшість клітин мали круглу чи полігональну форму, деякі з них формували колонії та вступали в процес поділу та були найбільш активними. Після поділу їх форма була більш продовгуватою, що пояснювалось меншим розпластуванням у зв'язку з тим, що їм вже бракувало місця на пластику. Частина клітин набували продовгуватої форми з кількома відростками, але не класичної веретеновидної форми. Подекуди спостерігали клітини, що сильно розпластувалися, але не ділилися. Спостерігали клітини, які були частково адгезовані та флотували в культуральному посуді (рис. 3.1.).

При додаванні розчину Версену з трипсином більшість клітин відокремлювалось від пластику та набувало округлої форми, що говорить про збереженість цитоскелету. Деякі крупна клітини відокремлювалися без зміни форми, їх вважали мертвими.

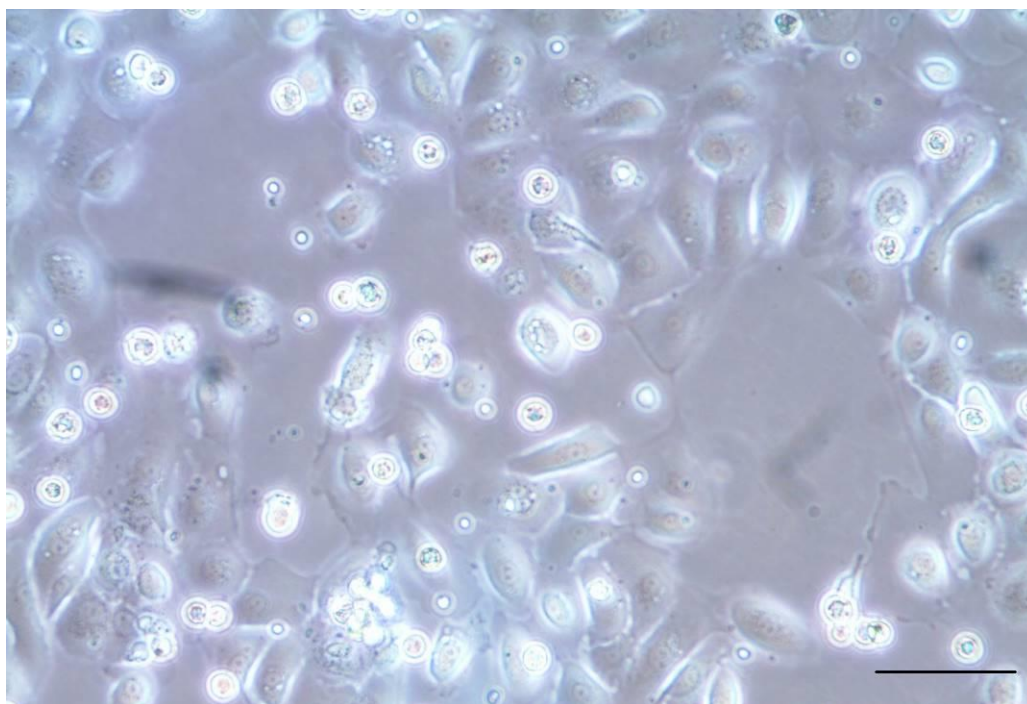


Рис. 3.1. Первинна культура клітин плаценти (оболонки) на нульовому пасажі. Фазовий контраст. Масштабна лінійка 50 мкм.

Після пересіву протягом 2-3 пасажів клітини набували веретено видної форми, яку зберігали протягом 10 пасажів (рис. 3.2.). Більше клітини на пасажували.

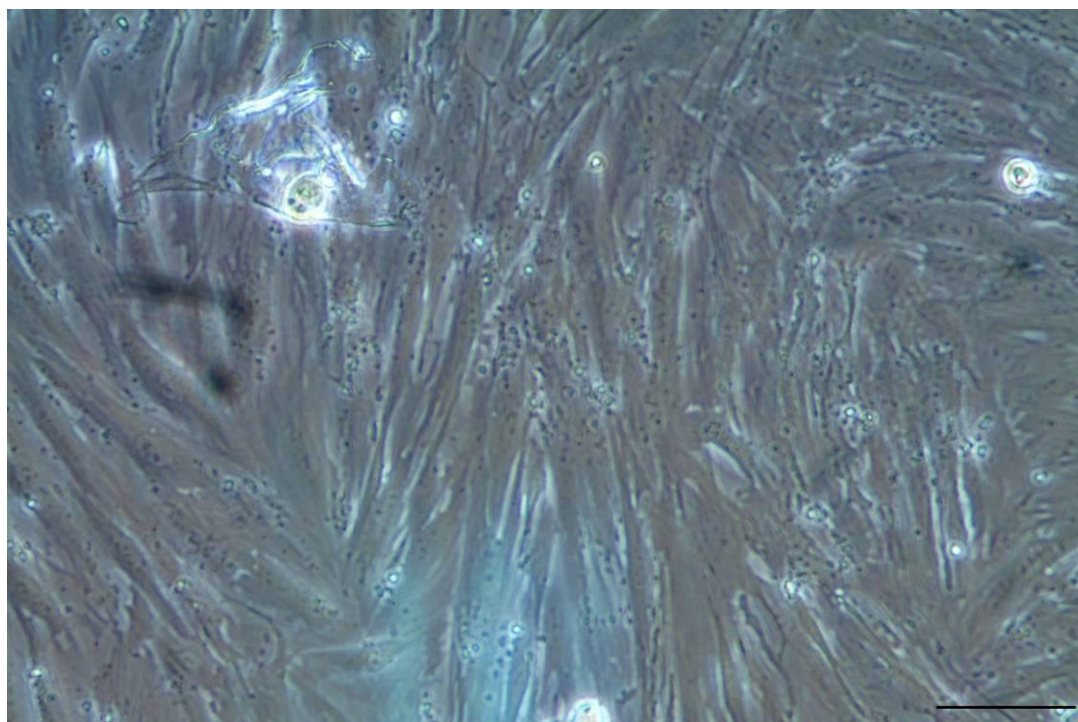


Рис. 3.2. Первинна культура клітин плаценти (оболонки) на третьому пасажі. Фазовий контраст. Масштабна лінійка 50 мкм.

Клітини набували фібробластоподібної морфології та здатності формувати щільний моношар за 2 доби культивування при пасажуванні 1:2, зі щільністю $2,5 \times 10^4$ клітин на 1 см^3 культурального посуду. Розмір клітин в суспензії при знятті з поверхні дорівнював близько 20 мкм (рис. 3.3).

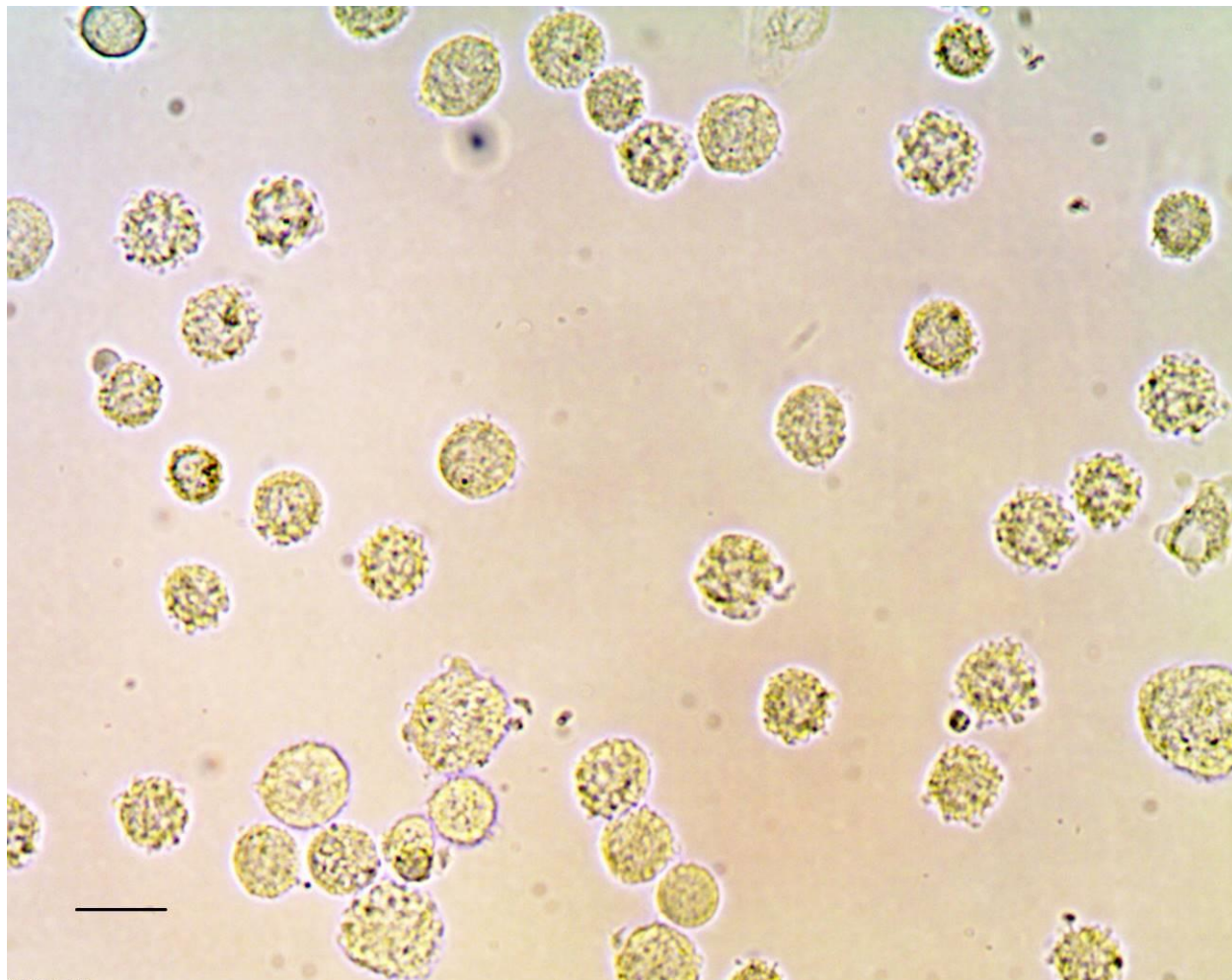


Рис. 3.3. Клітини, зняті з поверхні. Без забарвлення. Масштабна лінійка 20 мкм.

RT-PCR-аналіз показав, що клітини позитивні для типових маркерів МСК, таких як CD90, CD73 та CD105, і негативні для гематопоетичного маркера CD34. Ці результати також були підтверджені на рівні протеїну методом проточної цитометрії (рис. 3.4.).

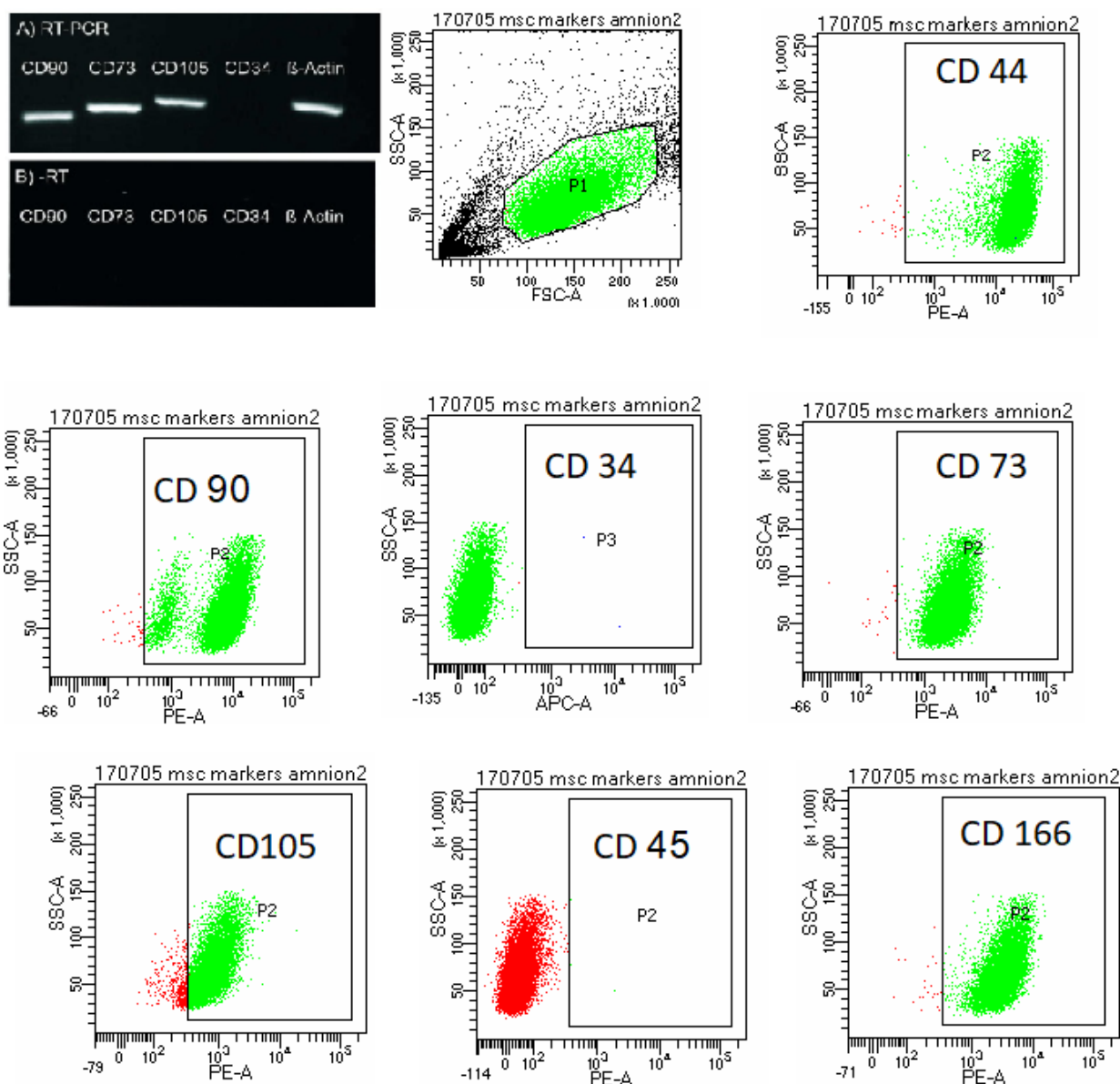


Рис. 3.4. Характеристика первинної клітинної культури, отриманої з плаценти. RT-PCR-аналіз та данні проточної цитометрії.

При проведенні диференціювання а адипогенному напрямку було показано, що клітини мають ліпідні гранули та забарвлюються Oil Red O (рис. 3.5, А). Проведення остеогенного диференціювання також продемонструвало забарвлення Von Kossa (рис. 3.5, Б). При хондрогенному диференціюванні культура забарвлювалася Alcian blue (рис. 3.4, В).

Вищесказане дозволяє віднести виділені культури до мезенхімальних стовбурових клітин, що дає змогу застосовувати їх згідно накопиченому міжнародному досвіду.

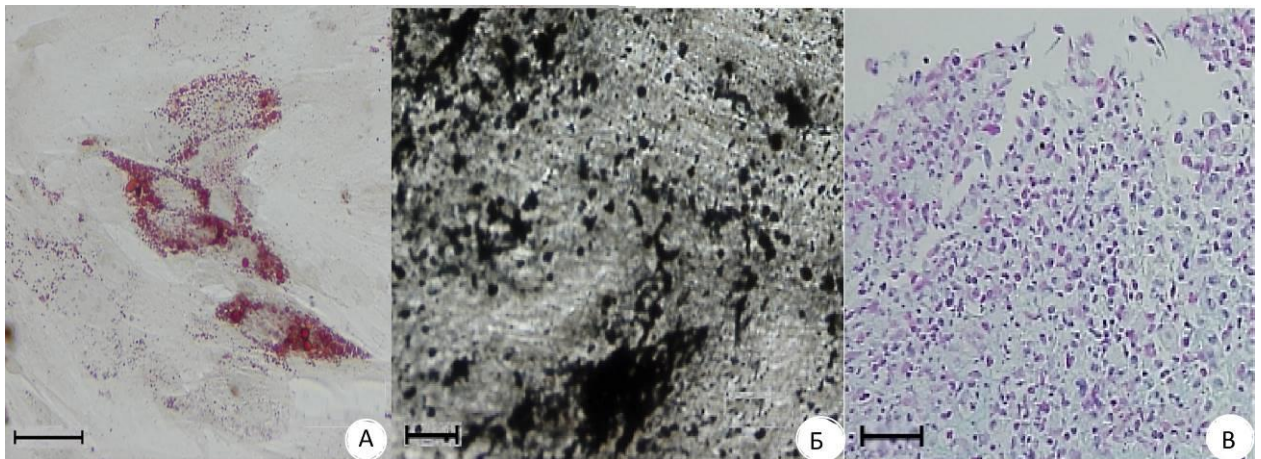


Рис. 3.5. Потенціал диференціації первинної клітинної культури, отриманої з плаценти, в лінії походження МСК. А - адипогенне (забарвлення забарвлення Oil Red O), Б - остеогенне (забарвлення Von Kossa) і В - хондрогенне (Alcian blue). Масштабна лінійка 50 мкм.

При виділенні клітин з ворсинчастої тканини плаценти її ретельно відмивали від крові PBS, але враховуючи велику кількість судин в ворсинах повністю відмити тканину не вдавалося. Тканина була більш стійкою до ферментів, що пояснюється її функцією. Після додавання трипсину спостерігали формування желеподібного згустку навколо фрагментів тканини, який розчинявся надлишком ДНКаз, що говорило про те, що він сформований нуклеїновими кислотами з синцитіотрофобласту. При пересіванні клітин на культуральний пластик спостерігали велику кількість еритроцитів, що вийшли з порушених судин та які не вдалося відмити. Протягом перших 2- діб обережно міняли середовище, але більшість клітин були неадгезовані. Через 5 діб після змивання еритроцитів та детриту спостерігали первинну культуру на нульовому пасажі. Клітини також були поліморфні, схожі на клітини, що виділені з оболонок (рис. 3.6.). Найбільш активно ділилися полігональні клітини.

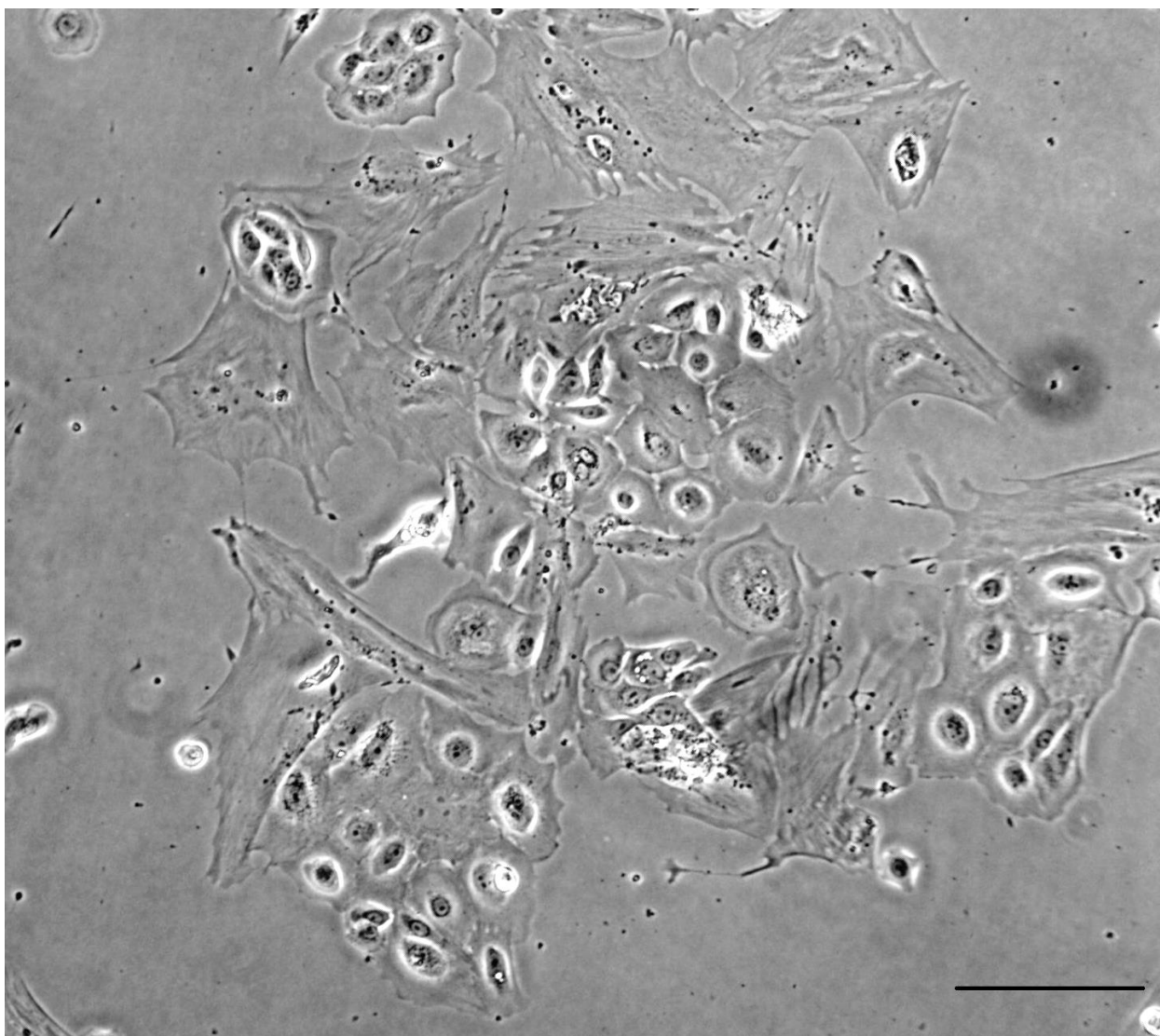


Рис. 3.6. Первинна культура клітин плаценти (ворсинчаста тканина) на нульовому пасажі. Фазовий контраст. Масштабна лінійка 50 мкм.

Після відділення розчином Версену з трипсином всі клітини, окрім великих розпластаних набували округлої форми, пересівалися. На 3-4 пасажах культура набувала характерної фібробластоподібної морфології (рис. 3.7.). При проведенні фенотипування клітин та направленого диференціювання відмінностей від культури тканин оболонки не виявлено.

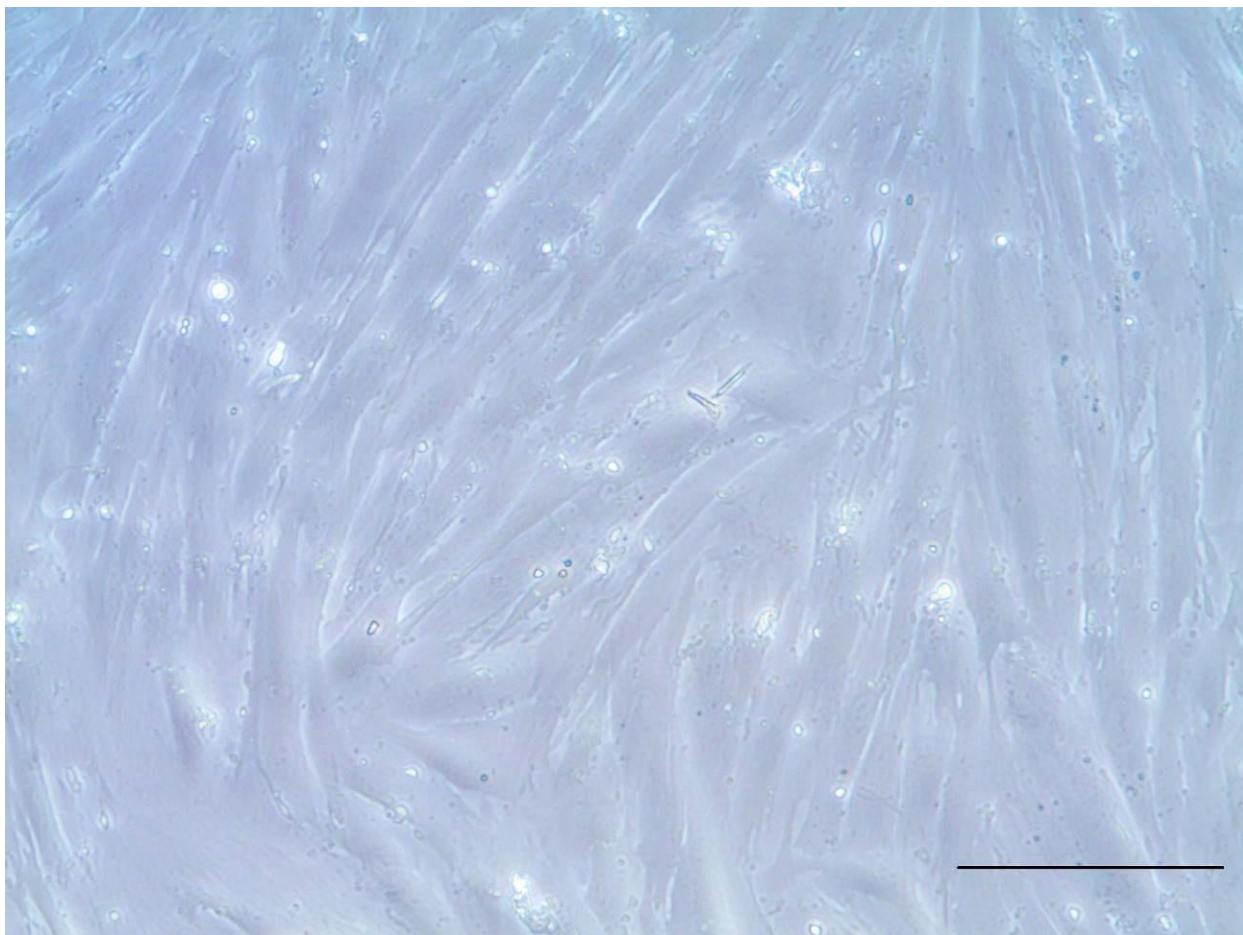


Рис. 3.7. Первинна культура клітин плаценти (ворсинчаста тканина) на третьому пасажі. Фазовий контраст. Масштабна лінійка 50 мкм.

Таким чином отримання клітин оболонок пов'язано з меншими технічними труднощами та дозволяє швидше отримати більше клітин, культура є більш стабільною. Це можна пояснити структурою та функцією ворсин та оболонок. Ворсини мають щільну васкуляризацію та шар цитотрофобласту, що дозволяє їм функціонувати в лакунах з кров'ю. Судини, що порушуються вивільняють додатково велику кількість еритроцитів, що частково інактивують трипсин та перешкоджають адгезії. Сінцитіотрофобласт є симпластом, тому не ділиться на клітини, але вивільняє перешкоджає ферментації та велику кількість ДНК, що потребує додаткових ферментів. В той час, як оболонки не мають судин та синцитію, що робить процес виділення клітин більш простим та ефективним. Тому для подальших досліджень було обрано культуру клітин, отриману з оболонок.

Вивчення можливості субнормотермічного та гіпотермічного зберігання клітин плаценти.

При вивченні суспензії культури клітин, після субнормотермічного зберігання (20°C) протягом доби відмічено, що клітини формували рихлі агрегати, розміром 50 - 200 мкм (рис. 3.8.), залишалися поодинокі клітини, при підрахування кількості клітин їх концентрація сягала $1,8-2 \times 10^5$ /мл (табл. 3.1.) в середньому зменшуючись на 10%, порівняно з початковими показниками, життєздатність за трипановим синім сягала 80%, як і адгезія, моношар формувався на 2-у добу. Морфологічно культура не відрізнялась від нативної.

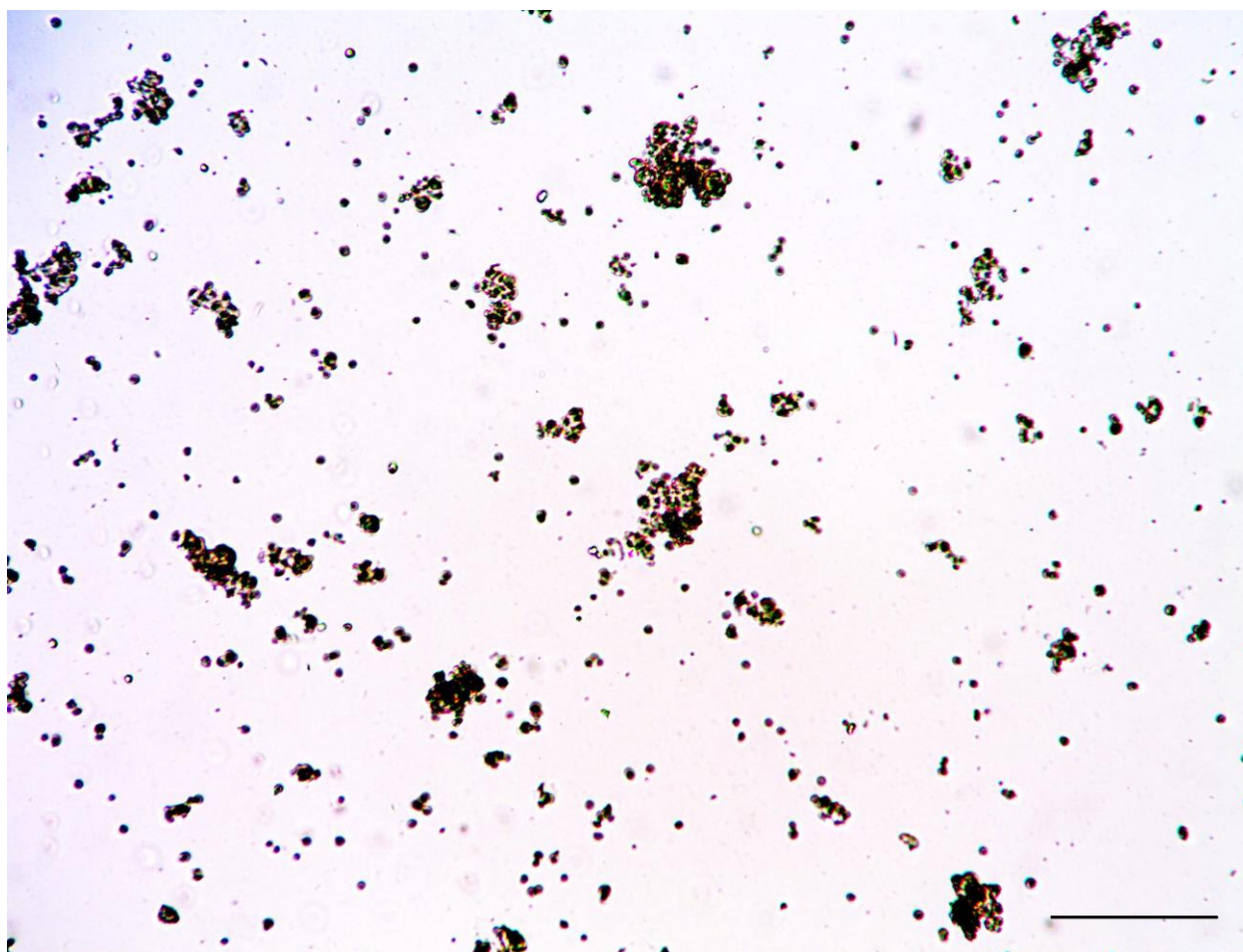


Рис. 3.8. Клітини плаценти після зберігання при +20°C забарвлення трипановим синім. Масштабна лінійка - 200 мкм.

При зберіганні клітин при в тих же умовах протягом 48 годин спостерігали незначне зниження концентрації клітин, життєздатності та адгезивних властивостей, моношар формувався на 3-4-у добу. При цьому конгломерати мали такий же розмір, їх кількість не збільшувалася. При зберіганні клітин протягом 72-х год концентрація досягала $1,5 \times 10^5$ /мл, життєздатність знижувалась до 70%, а моношар формувався на 4-у добу. Подальше зберігання суспензії клітин в таких умовах призводило до різкого зниження життєздатності та можливості формування моношару (табл. 3.1.).

Таблиця 3.1

Характеристика клітинної суспензії клітин плаценти після короткочасного зберігання при субнормотермічних умовах + 20°C ($M \pm m$, $n=10$)

	Кількість клітин $\times 10^5$	% збереженості за трипановим синім	% адгезії	Формування моношару, діб
Контроль	$2,1 \pm 0,2$	$95,3 \pm 8,6$	$95,2 \pm 6,5$	1
24 год	$2,0 \pm 0,1$	$82,9 \pm 5,5$	$80,4 \pm 6,4$	2
48 год	$1,8 \pm 0,06$	$78,5 \pm 6,8$	$71,2 \pm 5,5$	3
72 год	$1,5 \pm 0,05^*$	$69,3 \pm 5,4^*$	$65,2 \pm 4,4^*$	4
96 год	$1,2 \pm 0,03^*$	$72,5 \pm 6,8^*$	$60,5 \pm 5,8^*$	-

Примітка: * - вірогідність різниць з контролем $p < 0,05$.

При вивченні характеристик клітин після гіпотермічного зберігання (при температурі 4°C) у середовищі культивування протягом 24-х год клітинний вміст значно знизився (табл. 3.2.), що співпадає з даними літератури для інших типів клітин [116, 289], при цьому всі клітини розташовувалися окремо (рис. 3.9), конгломератів не формували. Клітини адгезували, але погано розпластувалися, ділилися повільно та формували моношар на 8-у добу.

Таблиця 3.2

**Характеристика клітинної суспензії клітин плаценти після
короткочасного зберігання при гіпотермічних умовах + 4°C (M±m)**

	Кількість клітин $\times 10^5$	% збереженості за трипановим синім	% адгезії	Формування моношару, діб
Контроль	2,1±0,2	95,3±8,6	95,2±6,5	1
24 год	0,9±0,01*	73,8±5,4*	51,2±3,5*	8
48 год	0,4±0,03*	50,5±5,6*	52,5±5,9*	-
72 год	0,2±0,02*	45,3±4,5*	50,2±4,3*	-

Примітка: *- вірогідність різниць з контролем $p < 0,05$.

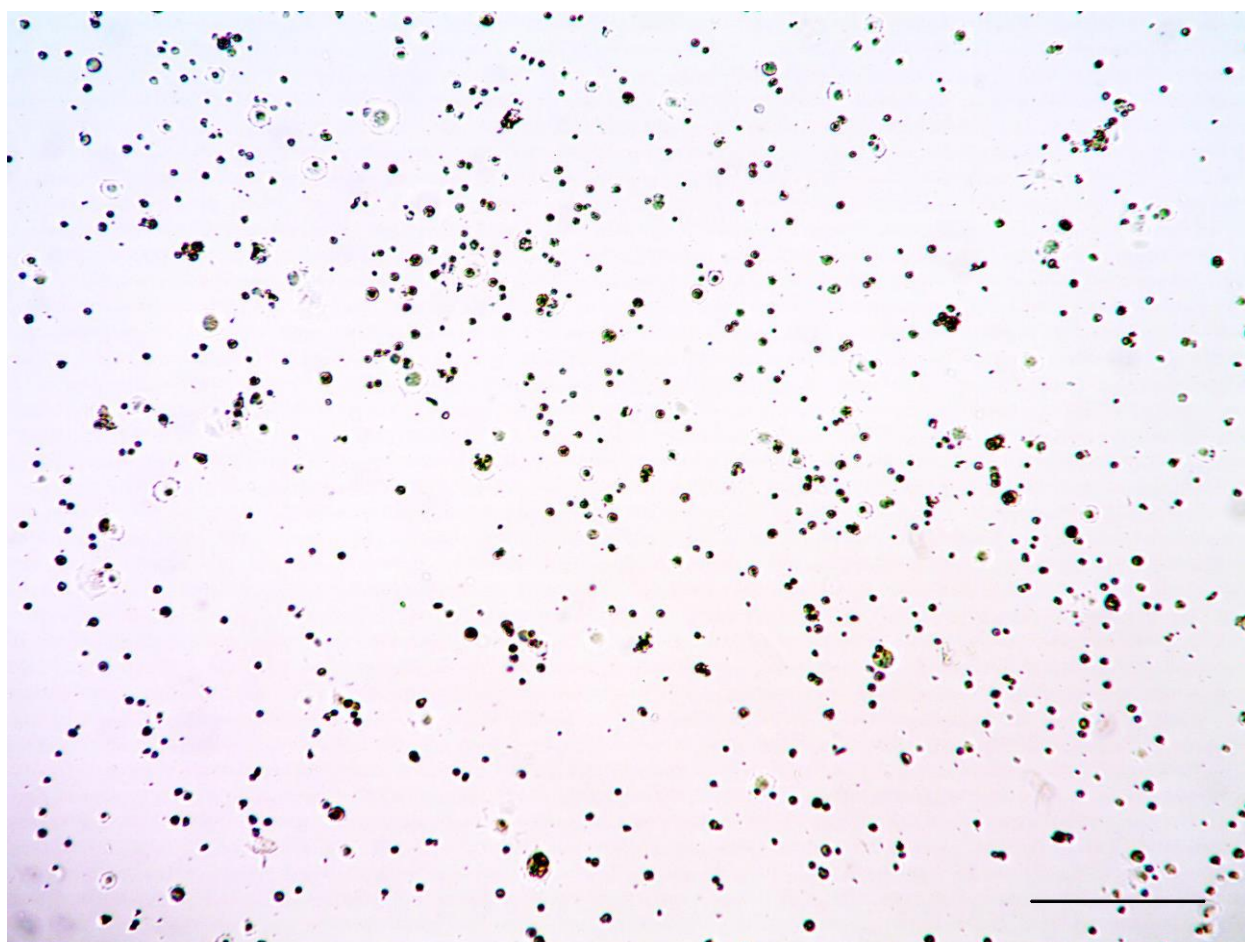


Рис. 3.8. Клітини плаценти після зберігання при + 20°C забарвлення трипановим синім. Масштабна лінійка - 200 мкм.

При гіпотермічному зберіганні клітин більше однієї доби їх життєздатність значно зменшувалася, що робило неможливим формування моношару та подальше культивування клітин.

Таким чином можна сказати, що для короточасного зберігання клітин до 3-х діб з ціллю транспортування, чи зберігання в лікувальному закладі доцільно використовувати зберігання при температурі близько 20°C в культуральному середовищі. Це дозволяє зберегти їх кількість, життєздатність та культуральні властивості без додаткового устаткування, оскільки ця температура підтримується в більшості приміщень. В той же час гіпотермічне зберігання в культуральному середовищі без додавання колоїдів, антиоксидантів та сахарів, що застосовуються в типових середовищах для гіпотермічного зберігання не дозволяє зберегти властивості клітин протягом цього терміну та знижує як кількість клітин, так і їх функціональні властивості. Ця температура зазвичай підтримується в побутових та лабораторних холодильниках. Встановлено, що для короточасного зберігання більш доцільно застосовувати середовище культивування та температури в межах 20-25°C, а для гіпотермічного зберігання при температурі 4-8°C недостатньо застосовувати лише середовище культивування без спеціальних середовищ для гіпотермічного зберігання. Результат є очікуваним для клітин гомейотермного організму, для якого зниження температури є руйнівним [98, 116, 289, 296].

Вивчення впливу вмісту кріозахисного середовища на збереженість клітин плаценти.

Склад кріозахисного середовища наряду з температурним режимом є одним з найважливіших факторів кріокосервування. Найважливішими компонентами кріозахисного середовища є по перше культуральне середовище, чи інший фізіологічний склад, який забезпечує життєдіяльність клітини з урахуванням концентрацій іонів, глюкози, кислотно-лужного та осмотичного балансу. По-друге це кріопротектор. Середовище повинне бути

нетоксичним, мати кріозахисні властивості та бажано дозволеним до клінічного використання, тобто валідоване за вимогами GMP, що не завжди можна поєднати [209]. Тому в даному розділі досліджені найбільш ефективні за літературними даними кріопротектори в рекомендованих концентраціях. Зроблена спроба замінити середовище культивування та кріоротектори на безпечні фармакологічні препарати, дозволені для клінічного використання, які мають склад, наближений до середовищ культивування та кріозахисних середовищ.

«Золотим стандартом» та найроповсідженішим кріопротектором є ДМСО. При кріоконсервуванні клітин з застосуванням 5%, 10%, чи 15% ДМСО спостерігали збереження кількості клітин, яке вірогідно не відрізнялось від позитивного контролю, життєздатність клітин за даними забарвлення трипановим синім також мало відрізнялася, при вивченні даних проточної цитометрії з барвником 7AAD у всіх зразках забарвлення було вище, ніж в позитивному контролі, найбільше забарвлених зразків спостерігали при 15% ДМСО. Дані МТТ аналізу мало відрізнялися у всіх зразках. Адгезія клітин зменшувалась при зниженні концентрації до 5%, як і формування моношару не на 2-у, а на 3-ю добу (табл. 3.3.). Ці данні підтверджують те, що найбільш ефективним кріозахисним середовищем є 10% ДМСО з середовищем культивування.

При консервуванні клітин з пропандіолом кількість клітин, життєздатність за трипановим синім була аналогічна контролю, підвищеними були кількість клітин, забарвлені 7AAD, показники МТТ, в той час, як адгезія зменшувалась до 65,8 %, моношар формувався на 3-ю добу. Оскільки на відміну від ДМСО пропандіол є нетоксичною сполукою, дозволеною для внутрішньом'язового та внутрішньовенного введення у якості допоміжної речовини висока ефективність його застосування у якості кріопротектору відкриває перспективи створення нетоксичних середовищ для клітин плаценти.

При застосуванні сахарози зберігалася кількість клітин, але їх життєздатність падала до 58,4 відсотків за даними трипанового синього, та 7AAD було забарвлено 65,7% клітин, різко знижувався рівень МТТ, практично у два рази, як і адгезія. Моношар формувався на 5-у добу.

Таблиця 3.3

**Результати кріоконсервування клітин плаценти з різними
кріопротекторами (M±m)**

Назва	Кількість клітин x 10 ⁵	% збереженості за трипановим синім	7 AAD+, %	МТТ тест, Од ОЩ	% адгезії	Моношар, діб
Негативний контроль	5,5±0,4	5,2±3,7*	89,1±8,8	0,235±0,02	-	-
Позитивний контроль	6,0±0,5	96,4±6,8	8,3±6,5	0,783±0,05	92,2±5,6	2
15% ДМСО	5,9±0,3	94,6±5,9	22,2±1,9 *	0,798±0,06	85,5±8,3 *	2
10% ДМСО	5,8±0,4	95,2±3,8	16,5±0,9 *	0,887±0,07	89,5±5,6	2
5% ДМСО	5,9±0,5	93,4±6,7	15,8±1,3 *	0,878±0,08	75,6±8,1	3
Пропандіол 11,4%	6,0±0,7	94,7±5,6	20,3±2,1 *	0,989±0,1	65,8±7,6 *	3
Сахароза 6,8%	5,7±0,3	58,4±3,6*	65,7±5,8 *	0,546±0,04*	59,5±4,5 *	5
Етиленгліколь 9,3%	4,1±0,2*	85,6±7,8	18,6±3,0 *	1,013±0,09*	66,5±5,4 *	3
Глицерин 13,8%	5,8±0,3	83,4±5,7	45,9±3,6 *	0,539±0,04*	42,5±3,8 *	4

Примітка :*- вірогідність різниць з позитивним контролем p<0,05

При застосуванні етиленгліколю знижувалась кількість клітин, зі збереженням життєздатності, при цьому підвищувався рівень МТТ, але адгезувало лише 66,5% клітин та моношар формувався на 3-ю добу.

Отримані показники нижче показників, пропандіолу. Враховуючи токсичність етиленгліколю його застосування на нашу думку не є доцільним.

При застосуванні гліцерину у якості кріопротектору не знижувалась кількість клітин, зі збереженням життєздатності, при цьому знижувався рівень МТТ, але адгезувало 42,5% клітин та моношар формувався на 4-у добу. Показники були значно нижчими, від показників пропандіолу та ДМСО.

В подальшій роботі досліджували важливість різних компонентів кріозахисних середовищ при кріоконсервуванні клітин плаценти. Оскільки для клінічної практики важливо застосування лише дозволених препаратів було досліджено можливість кріоконсервування клітин без додаткового додавання сироватки в культуральному середовищі з 10% ДМСО, кріоконсервуванні в 0,9% хлориді натрію, розчині Хенксу та Рінгеру.

При кріоконсервуванні зразків на середовищі культивування без додавання сироватки відмінностей від зразків з сироваткою знайдено не було по жодному з досліджуваних показників. В той час, як заміна середовища цілком на сироватку знижувало як кількість клітин, так і їх життєздатність, адгезували 81,5 % клітин та моношар формувався на добу пізніше (табл. 3.4.).

При спробі замінити середовище культивування на кристалоїдні розчини, дозволені для клінічного використання в клінічній практиці виявлено, що найбільш оптимальні результати спостерігаються при застосуванні розчину Рінгеру та Хенксу, які є найбільш збалансованими за сольовим вмістом та рН. При їх застосуванні спостерігали зниження кількості клітин на третину та життєздатності близько на 20 – 30 %, в залежності від методу дослідження. В той же час показники адгезії клітин, що залишилися були досить високими та моношар утворювався на 3 добу. В той же час, кріоконсервування з середовищем, що містило лише 0,9% хлорид натрію було менш вдалим: кількість клітин сягала близько 50% від початкової концентрації, їх життєздатність зменшувалась до 42-75 %, моношар формувався на 6-у добу (табл. 3.4.). Це свідчить про недостатність

одного хлориду натрію для кріоконсервування клітин. Чим середовище було ближчим до середовища культивування, тим вище була збереженість клітин та їх метаболічна активність.

Таблиця 3.4

Результати кріоконсервування клітин плаценти з кріозахисним середовищем на основі кристалоїдів різного складу, дозволених для клінічного використання ($M \pm m$)

Назва	Кількість клітин $\times 10^5$	% збереженості за трипановим синім	7 AAD+, %	MTT тест, Од ОЩ	% адгезії	Моношар, діб
Негативний контроль	5,5 $\pm$ 0,4	5,2 $\pm$ 3,7	89,1 $\pm$ 8,8	0,235 $\pm$ 0,02	-	-
Позитивний контроль	6,0 $\pm$ 0,5	96,4 $\pm$ 6,8	8,3 $\pm$ 6,5	0,783 $\pm$ 0,05	92,2 $\pm$ 5,6	2
10% ДМСО+серед (без сироватки)	6,0 $\pm$ 0,4	95,2 $\pm$ 7,2	12,1 $\pm$ 1,1	0,852 $\pm$ 0,04	90,5 $\pm$ 8,1	2
Сироватка +10% ДМСО	4,4 $\pm$ 0,2*	83,4 $\pm$ 4,3*	22,5 $\pm$ 2,1*	0,823 $\pm$ 0,05	81,5 $\pm$ 5,6*	3
0,9% NaCl + 10% ДМСО	2,9 $\pm$ 0,2*	75,2 $\pm$ 6,5*	58,6 $\pm$ 5,2*	0,497 $\pm$ 0,03*	72,1 $\pm$ 6,5*	6
Хенксу розчин +10% ДМСО	3,8 $\pm$ 0,5*	82,3 $\pm$ 6,4*	33,5 $\pm$ 2,4*	0,668 $\pm$ 0,02*	88,5 $\pm$ 6,3	3
Рингера розчин + 10% ДМСО	3,2 $\pm$ 0,2*	82,5 $\pm$ 8,1*	34,9 $\pm$ 3,5*	0,836 $\pm$ 0,05	95,2 $\pm$ 7,2*	3

*- вірогідність різниць з контролем $p < 0,05$

В наступній частині дослідження застосовували колоїдні розчини, дозволені для внутрішньовенного введення, які містять солідові, що згідно даним літератури мають властивості кріопротекторів. До них відносять зареєстровані на Україні Поліглюкін (6% розчин декстрану з йонами натрію та хлору), Неогемодез (6% полівінілпіролідон з йонами натрію, калію, кальцію, магнію та хлору), Реосорбілакт (6% сорбітом з йонами натрію,

калію, кальцію, магнію та хлору), Стабізол (6% гідроксиетилкрахмаль з йонами натрію та хлору) (табл. 3.5.). Додатково інші кріопротектори не застосовували.

При спробах замінити середовище кріоконсервування на 6% декстран, чи 6% полівінілпіролідон без додавання іншого кріопротектору кількість клітин значно знижувалась, але при цьому вони зберігали життєздатність, адгезивні властивості та формували моношар на 3-4-у добу. При цьому найбільшу ефективність мав розчин полівінілпіролідону (неогемодез), який є дозволеним для клінічного застосування та внутрішньовенного введення. При застосуванні 6% сорбітилу чи 6% гідроксиетилкрахмалю кількість клітин знижувалася більш ніж на половину, різко падали адгезивні властивості, моношар формувався на 8-10-у добу (табл. 3.5.).

Таблиця 3.5

Результати кріоконсервування клітин плаценти з кріозахисним середовищем на основі колоїдних різного складу, дозволених для клінічного використання ($M \pm m$)

Назва	Кількість клітин $\times 10^5$	% збереженості за трипановим синім	7 AAD+, %	MTT тест, Од ОЩ	% адгезії	Моношар, діб
Негативний контроль	5,5 $\pm$ 0,4	5,2 $\pm$ 3,7	89,1 $\pm$ 8,8	0,235 $\pm$ 0,02	-	-
Позитивний контроль	6,0 $\pm$ 0,5	96,4 $\pm$ 6,8	8,3 $\pm$ 6,5	0,783 $\pm$ 0,05	92,2 $\pm$ 5,6	2
Поліглюкін	4,1 $\pm$ 0,4*	93,2 $\pm$ 5,6	32,5 $\pm$ 2,3*	0,658 $\pm$ 0,05*	83,2 $\pm$ 7,5*	3
Неогемодез	5,1 $\pm$ 0,6*	91,2 $\pm$ 9,5	28,2 $\pm$ 3,5*	0,635 $\pm$ 0,04*	84,5 $\pm$ 7,6	3
Реосорбілакт	3,4 $\pm$ 0,4*	17,2 $\pm$ 1,2*	67,3 $\pm$ 6,8*	0,325 $\pm$ 0,02*	15,3 $\pm$ 2,1*	8
Стабізол	1,5 $\pm$ 0,2*	20,9 $\pm$ 2,2*	65,5 $\pm$ 5,4*	0,360 $\pm$ 0,02*	29,2 $\pm$ 2,1*	10

Примітка: *- вірогідність різниць з контролем $p < 0,05$

Таким чином проведені дослідження дозволяють стверджувати, що у якості кріопротекторів для клітин плаценти найбільш ефективними є ДМСО, пропандіол та етиленгліколь в найбільш розповсюджених концентраціях. З інших компонентів середовища сироватка не є необхідною. Найбільша збереженість клітин спостерігається при застосуванні культурального середовища. Можлива його заміна на розчини Рінгера або Хенксу з незначним зниженням кількості клітин та життєздатності, яке значно знижується при заміні середовища на фізіологічний розчин хлористого натрію. Можливо застосування для кріоконсервування розчинів декстрану чи полівінілпіролідону, які мають кріопротекторну дію, при цьому кількість клітин та їх життєздатність знижується на 20-30%, в той час, як застосування сорбітолу чи гідроксиетилкрахмалю значно знижує вищеописані показники та є недоцільним.

Визначено, що створення нетоксичних кріозахисних середовищ для клітин плаценти з урахуванням GMP стандартів цілком можливо. При цьому найбільш перспективними розчинами є пропандіол та полівінілпіролідон.

При порівнянні методів оцінки збереженості, метаболічної активності та життєздатності клітин слід зазначити, що найбільш швидким виявився тест забарвлення трипановим синім, незважаючи на те, що він мав найбільшу похибку їм можна було оцінювати стан культури. Особливістю його є те, що він оцінює цілісність мембран. При фіксації клітин формальдегідом трипановий синій не проникає до клітин та вони оцінюються як «живі». Проточна цитометрія з 7 AAD є більш інформативною, має меншу похибку, але більш складна, клітини забарвлюються після фіксації як етанолом, так і формальдегідом.

МТТ тест при оцінці клітин після кріоконсервування має свої особливості. Так він є підвищеним в першу добу після розморожування та за 1-2 доби показник повертається до значення нативної культури. Це може свідчити про активізацію метаболізму та репаративних змін після кріоушкодження.

Найбільш достовірним на нашу думку є тести адгезії до пластику. та формування моно шару.

Нажаль більшість цих тестів складно застосовувати при вивченні стану тканин та багатоклітинних похідних плаценти. Тому для можливості цієї оцінки клітини до та після кріоконсервування з ДМСО додатково були забарвлені FDA та EB.

При дослідженні суспензії клітин забарвлених FDA та EB методом конфокальної мікроскопії отримані данні, що співпадають з даними інших методів.

Нативна культура клітин, забарвлена FDA та EB та оцінена методом лазерної скануючої конфокальної мікроскопії практично повністю забарвлена FDA (рис. 3.10.)

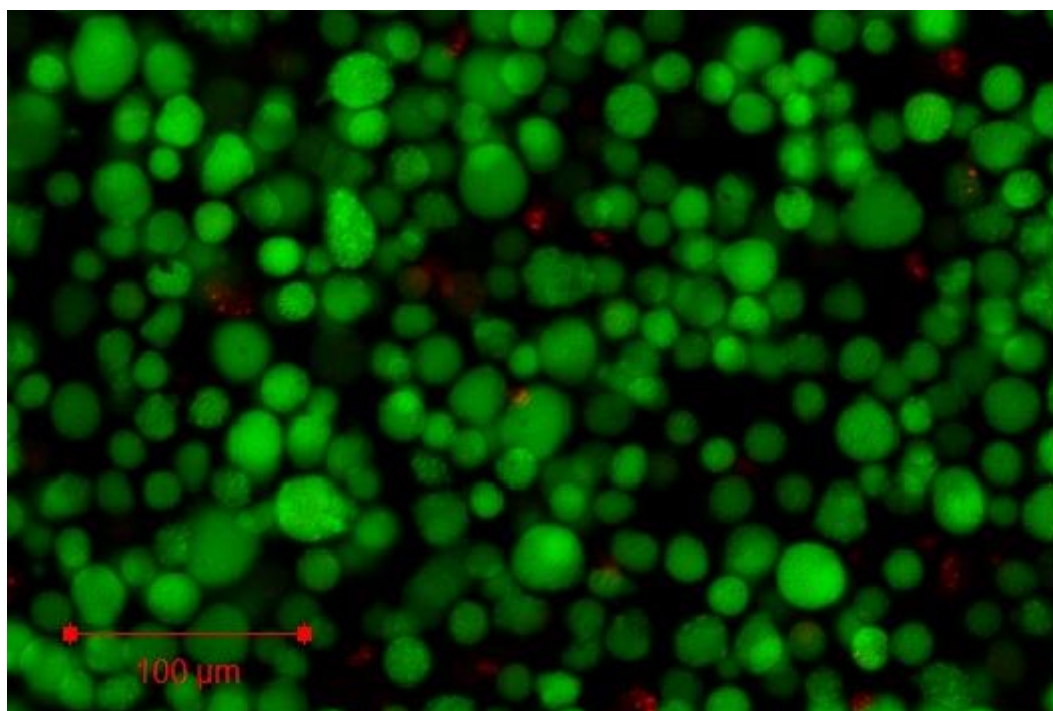


Рис. 3.10. Нативна культура клітин плаценти. Забарвлення FDA та EB. Масштабна лінійка 100 мкм.

В негативному контролі більше 98% клітин було забарвлено EB, зустрічалися поодинокі клітини забарвлені FDA (рис. 3.11).

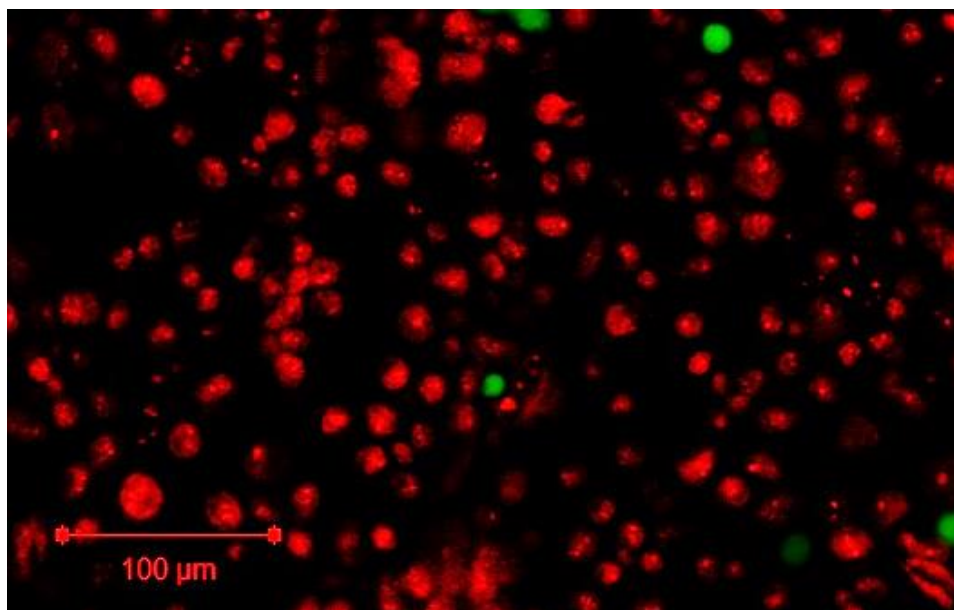


Рис. 3.11. Негативний контроль клітин плаценти. Забарвлення FDA та EB. Масштабна лінійка 100 мкм.

Суспензія клітин після кріоконсервування за даними конфокальної мікроскопії в першу годину не відрізняється від нативної (рис. 3.12.), але при забарвленні пізніше починають з'являтися клітини забарвлені EB, що говорить про поступове припинення активності метаболізму клітин після необоротних кріоушкоджень.

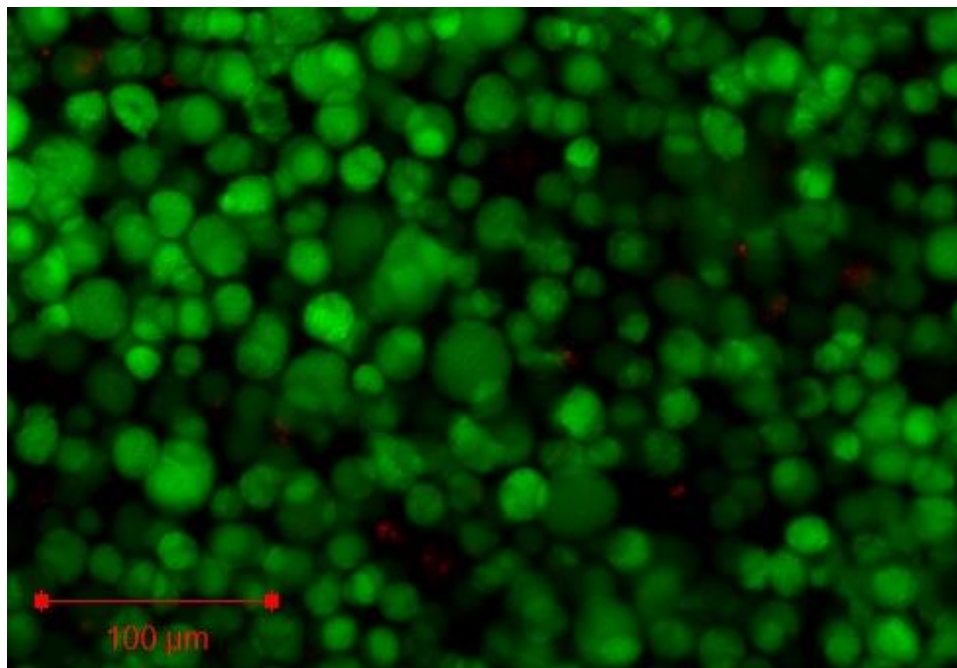


Рис. 3.12. Культура клітин плаценти після кріоконсервування. Забарвлення FDA та EB. Масштабна лінійка 100 мкм.

Вплив різних режимів кріоконсервування на збереженість клітин плаценти.

Температурний режим є другою важливою складовою процесу кріоконсервування. Оскільки для клінічного застосування необхідна велика кількість клітин процеси вітрифікації, які забезпечують збереження невеликих об'ємів не розглядаються в даному дослідженні. Методи повільного охолодження з застосуванням ізопропілових контейнерів дають змогу застосування різного низькотемпературного обладнання перед зануренням в рідкий азот. Так стандартне холодильне устаткування в залежності від класу має мінімальну температуру -20°C , $-40-50^{\circ}\text{C}$, -80°C , -140°C . При чому перші два типи зараз мають на оснащені багатьох клінічних установ, що мають відділення переливання крові [27].

При дослідженні кількості клітин визначено, що при охолодженні шляхом прямого занурення в рідкий азот кількість клітин знижується незначно до $5,3 \times 10^5$, (рис. 3.13.). При цьому життєздатність зберігають 2,3 - 9% клітин за різними методами (рис. 3.14.). Показник МТТ тесту та тесту відновлення резазуріну вірогідно не відрізняється від показників середовища без клітин (рис. 3.15.), о говорить про загибель клітин. Адгезують поодинокі клітини (рис. 3.16.). Утворення моношару не спостерігали (табл. 3.7.).

Повільне охолодження до -20°C дозволяє зберегти лише половину клітин (рис. 3.13.), при цьому їх життєздатність дорівнює близько 50% від початкової (рис. 3.14.), данні відновлення резазуріну та МТТ тесту відрізнялися від контрольних показників (рис. 3.15.), але адгезували поодинокі клітини (рис. 3.16.), що було недостатньо для утворення моношару (табл. 3.6.).

Охолодження до -30°C дозволяло зберегти значно більшу кількість клітин – близько 60% (рис. 3.13.), при цьому вже 70-80 з них були життєздатними (рис. 3.14.), показники функційних тестів вже вірогідно відрізнялися від негативного контролю (рис. 3.15.), адгезувало близько 20%

клітин (рис. 3.16.), та вони вже могли формувати моношар на 6-у добу (табл. 3.6.).

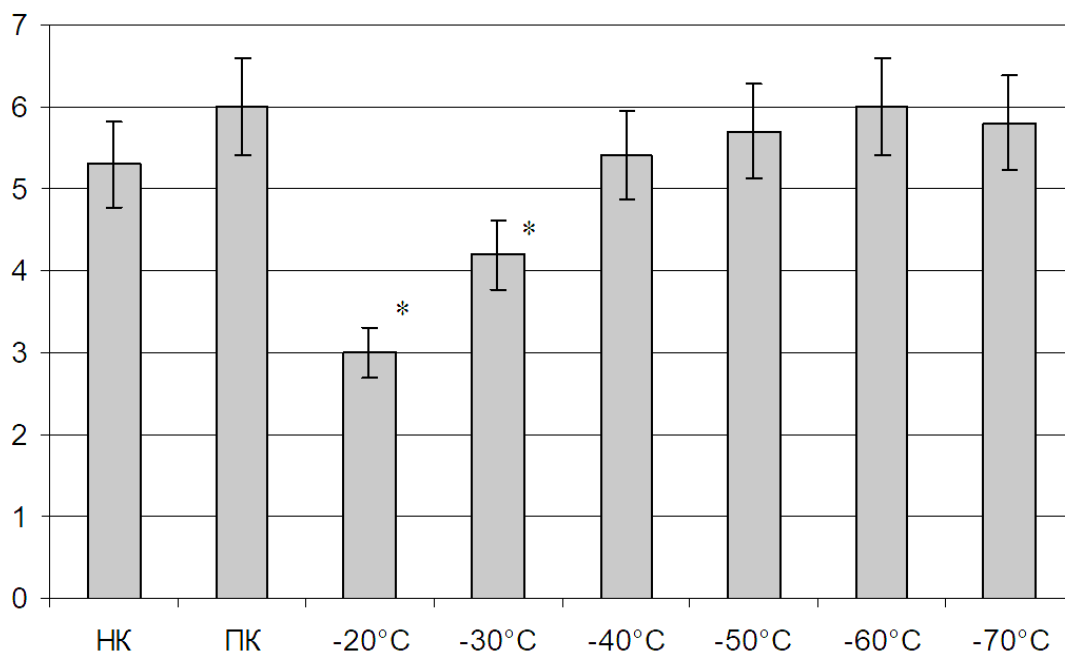


Рис. 3.13. Кількість клітин в досліджуваних зразках x 10⁵. Примітка: *- вірогідність різниць з позитивним контролем $p < 0,05$

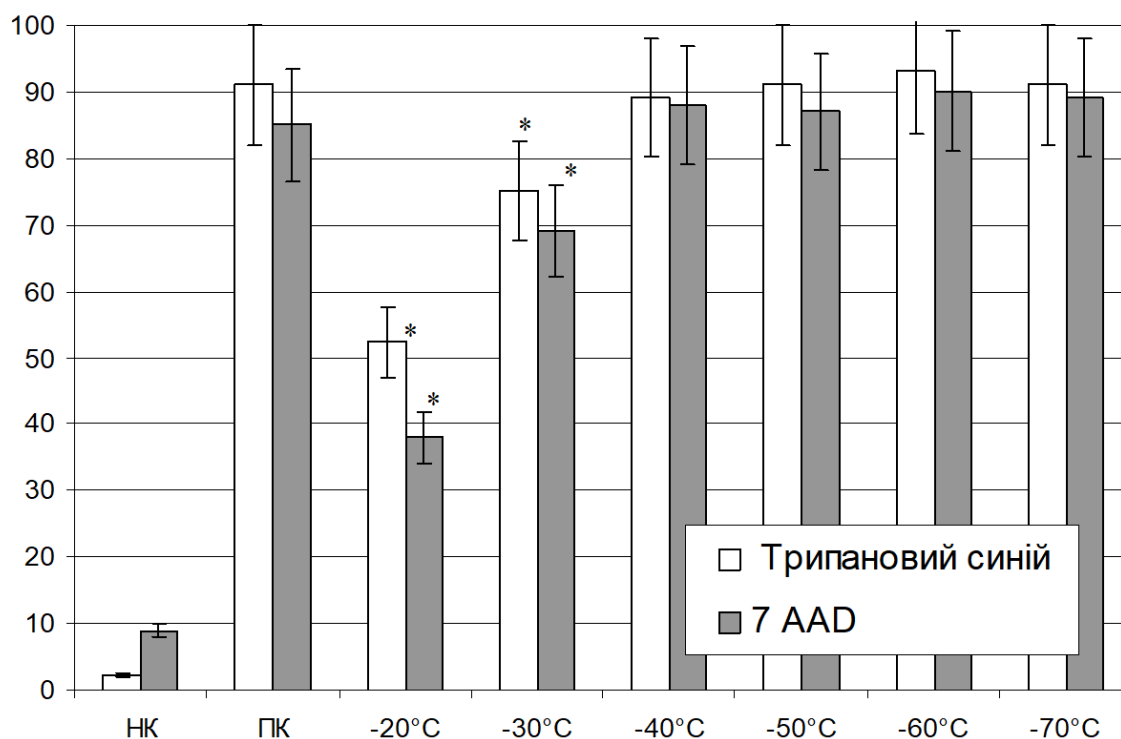


Рис. 3.14. Відсоток життєздатних клітин за даними забарвлення трипановим синім та 7 AAD в досліджуваних зразках. Примітка: *- вірогідність різниць з позитивним контролем $p < 0,05$

Різке підвищення реакції МТТ та зменшення відновлення резазурину можна пояснити агональними парабіотичними змінами в клітинах після розморожування в перші часи, та їх загибель протягом доби. Так реакція МТТ відбувається протягом 4 годин, а тест відновлення резазурину, який ми застосовували триває 24 години.

Охолодження до -40°C - -80°C дозволяло зберегти кількість клітин, які вірогідно не відрізнялися між собою також східними були показники життєздатності, функційних тестів та швидкості формування моношару. При цьому при температурі -40°C спостерігалася тенденція до зменшення кількості клітин та їх функційних характеристик, яка не була доведена статистично (рис. 3.13 - 3.16, табл. 3.6.).

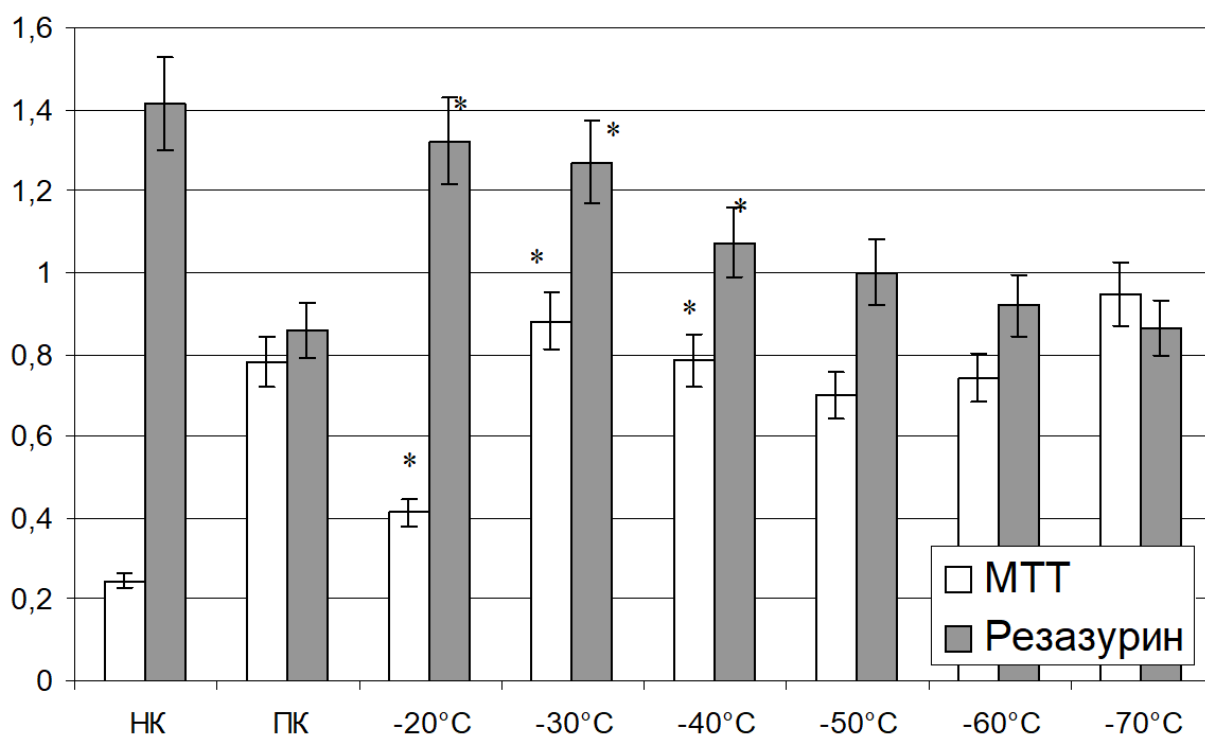


Рис. 3.15. Показники функціональної активності клітин в досліджуваних зразках (одиниці оптичної щільності).

Примітка: * - вірогідність різниць з позитивним контролем $p < 0,05$

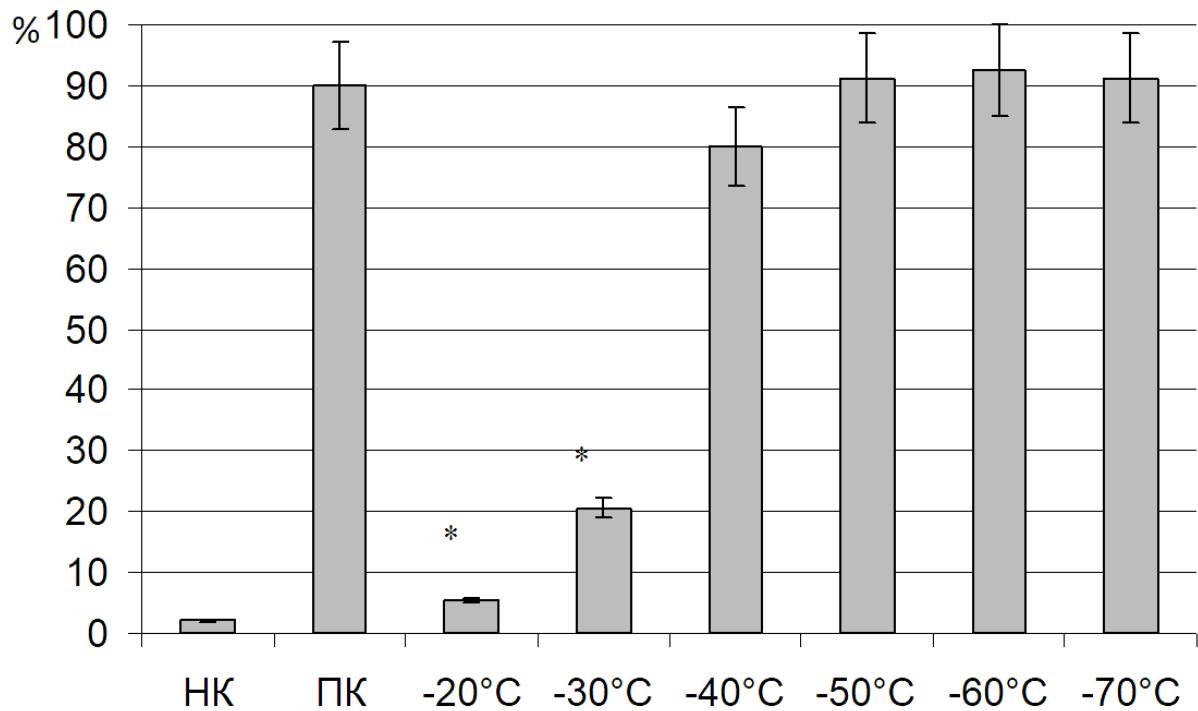


Рис. 3.16. Відсоток адгезуваних клітин в досліджуваних зразках.

Примітка: *- вірогідність різниць з позитивним контролем $p < 0,05$

Таким чином проведені дослідження дозволяють стверджувати, що мінімальна температура, до якої необхідне повільне охолодження клітин плаценти – -40°C – -50°C , що дає змогу значно економити як час, так і рідкий азот на програмному заморожуванні, крім того можливо використання для кріоконсервації холодильного обладнання, яку забезпечує температуру -40°C – -50°C , яке є близько в 10 разів дешевшим, ніж обладнання, що сягає температури -80°C , та є на устаткуванні більшості лікувальних закладів та станцій переливання крові [27].

Вивчення впливу повторного заморожування на стан клітин.

Вивчення можливості повторного заморожування рекультивування є важливою задачею яку треба вирішувати при можливих аварійних станах в низькотемпературному банку, чи під час транспортування біоматеріалу.

При повторному заморожуванні клітини плаценти було виявлено, що кількість клітин дорівнювала $0,5 \pm 0,05 \times 10^6/\text{мл}$, що є зниженням практично

вдвічі, життєздатність було близько $81,2 \pm 8,3\%$ за даними забарвлення трипановим синім, та $63,7\%$ при вивченні методом цитометрії з 7AAD, при цьому активність за даними МТТ тесту була $0,923 \pm 0,09$, адгезували близько 50% клітин та моношар утворювався на 3-4-у добу (табл. 3.7.).

Отримані дані свідчать про те, що при повторному заморожуванні – відтаюванні за стандартною програмою різко падає як життєздатність клітин, так і кількість, при цьому клітини, що залишилися зберігають культуральні та метаболічні властивості.

Таблиця 3.7

Характеристика клітин плаценти при повторному заморожуванні

Назва	Кількість клітин $\times 10^5$	% збереженості за трипановим синім	7 AAD+, %	МТТ тест, Од ОЩ	Тест відновлення резаурину, Од ОЩ	% адгезії	Моношар, діб
Контроль	$1,0 \pm 0,5$	$96,4 \pm 6,8$	$8,3 \pm 6,5$	$0,783 \pm 0,05$	$1,098 \pm 0,09$	$96,2 \pm 5,6$	2
Однократне заморожування	$0,9 \pm 0,08$	$92,1 \pm 8,5$	$20,0 \pm 0,8$ *	$0,935 \pm 0,08$ *	$1,056 \pm 0,05$	$89,3 \pm 8,3$ *	2
Повторне заморожування	$0,5 \pm 0,05$ *	$81,2 \pm 8,3$ *	$36,3 \pm 3,8$ *	$0,923 \pm 0,07$ *	$1,023 \pm 0,08$	$51,2 \pm 5,3$ *	3-4

Примітка: *- вірогідність різниць з позитивним контролем $p < 0,05$.

Таким чином при виникненні аварійної ситуації в низькотемпературному банку, що привела до розморожування зразків для збереження їх характеристик необхідне рекультивування.

Для подальших досліджень та можливості порівняння механізмів кріоушкодження різних похідних плаценти застосовували найбільш розповсюджений та стандартизований метод кріоконсервування – повільне

одолювання до -40°C - -60°C з зануренням в рідкий азот. У якості середовища кріоконсервування застосовували 10% ДМСО на середовищі культивування.

Кріомікроскопічне дослідження процесів кріоконсервування суспензії клітин плаценти.

Для вивчення механізмів кріоушкодження суспензії клітин та їх порівняння з механізмами кріоушкоджень інших похідних плаценти проведено кріомікроскопічне дослідження процесів охолодження клітин з найбільш ефективним середовищем – 10% ДМСО на середовищі культивування. Концентрація клітин на дні кріопробірки після 15 хв. становила близько 6×10^6 клітин/мл, тоді як початкова концентрація становила 1×10^6 клітин/мл, що пояснюється седиментацією клітин на дні. Зниження температури до -100°C зі швидкістю $1^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ призвело до швидкого утворення великої кількості дрібних кристалів при -11°C розміром $1,4 \pm 0,12$ мкм з каналами між ними. Зростання кристалів спостерігалось зі зменшенням температури, що призвело до злиття окремих кристалів та звуження каналів між кристалами (рис. 3.17.). Кристали набули гостру форму та окремі кристали, злиті разом.

Виявлено два типи кристалів: великі кристали в міжклітинному просторі та невеликі кристали, розташовані навколо клітин. Формування дрібних кристалів, на нашу думку, пов'язане з нерівностями клітинної мембрани або з виділенням води з клітини. Кристали набувають кінцевої форми та розмірів при -50°C - -60°C . Візуально, подальше охолодження не призвело до змін у кристалах. При температурі -100°C в міжклітинному просторі спостерігалися великі кристали з довжиною $11,8 \pm 2,4$ мкм і довжиною $33,0 \pm 11,2$ мкм, а навколо клітин розташовувалися дрібні кристали $5,6 \pm 1,6$ мкм.

При нагріванні зразка початку плавлення кристала візуально спостерігалось при 60°C , з розширенням окремих каналів та відходом окремих кристалів один від одного. Газові бульбашки між кристалами

збільшені (позначені стрілками на малюнку). При температурі 6,9°C танення кристалів закінчилося, газовані бульбашки повністю розчинилися.

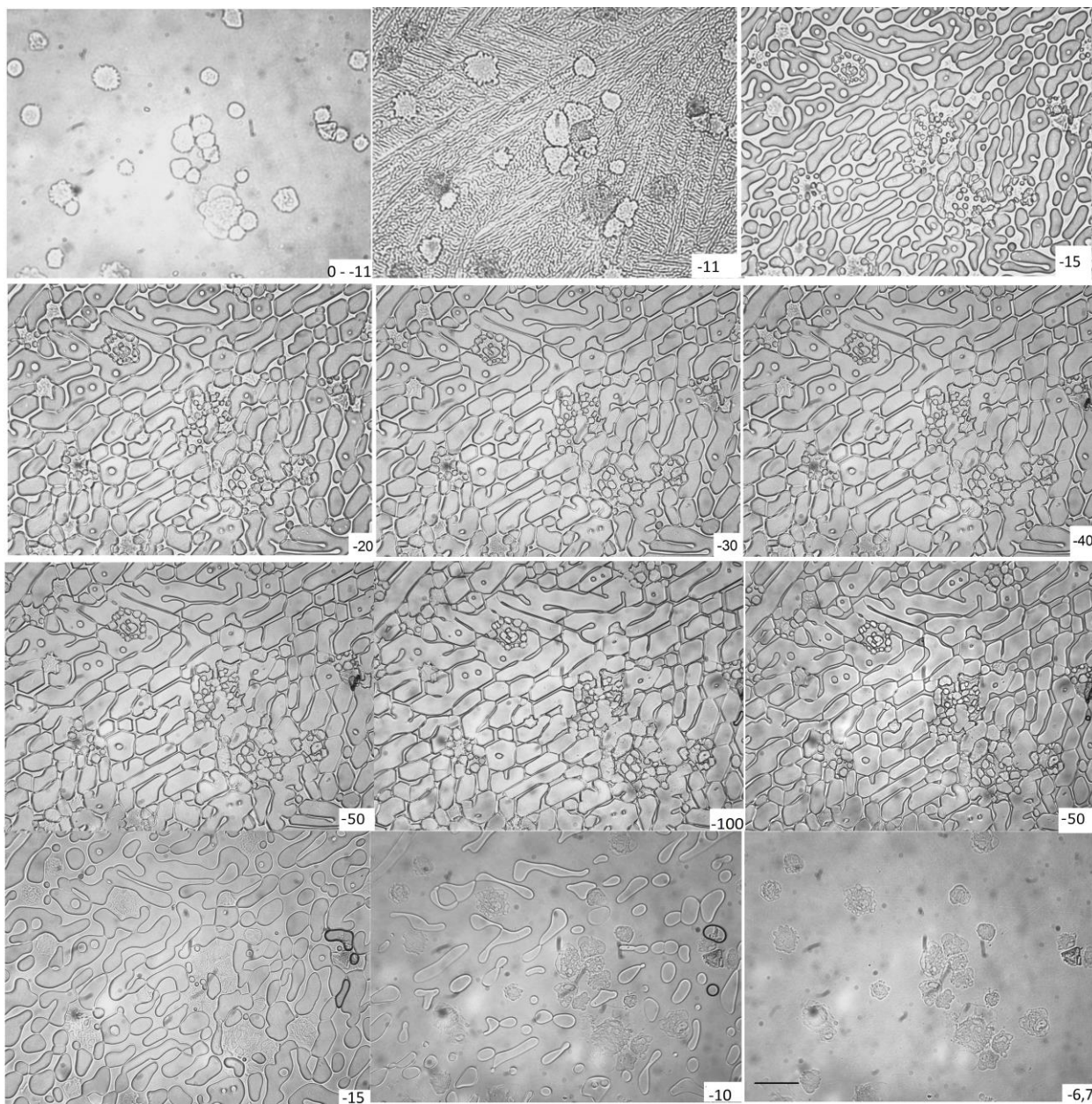


Рис. 3.17. Суспензія клітин плаценти при кріоконсервуванні, кріомікроскопічне дослідження. Перші два рядка – охолодження, нижні два рядка – відігрів. Температура позначена на кожному рисунку в °C. Масштабна лінійка 50 мкм.

Результати кріомікроскопічного дослідження співпадають з даними, отриманими в попередньому розділі. Так остаточно кристали льоду формуються в при -40°C - -50°C – саме до цих температур необхідно

проводити повільне охолодження суспензії клітин для збереження життєздатності, культуральних та метаболічних характеристик.

Вивчення впливу коливання температур при низькотемпературному зберіганні на стан клітини плаценти.

Коливання температур в низькотемпературних сховищах відбуваються постійно, вони більш характерні для парових сховищ, ніж для сховищ, де біооб'єкти зберігаються в рідкому азоті. На наш погляд це найвпливовіший чинник, який може мати місце при довгостроковому зберіганні матеріалу протягом років та десятиків років. Коливання відбуваються при роботі зі сховищем, заповненні рідким азотом аварійних станах. Зазвичай коливання не більше 20°C , рідко бувають аварійні стани, коли біоматеріал переміщується до низькотемпературного холодильника, чи сухого льоду. Тому в дослідження були обрані температури коливань від -196°C до -80°C , -100°C та -150°C .

Термограми, отримані при проведенні експерименту з моделювання коливання температур представлені на рис. 3.18.

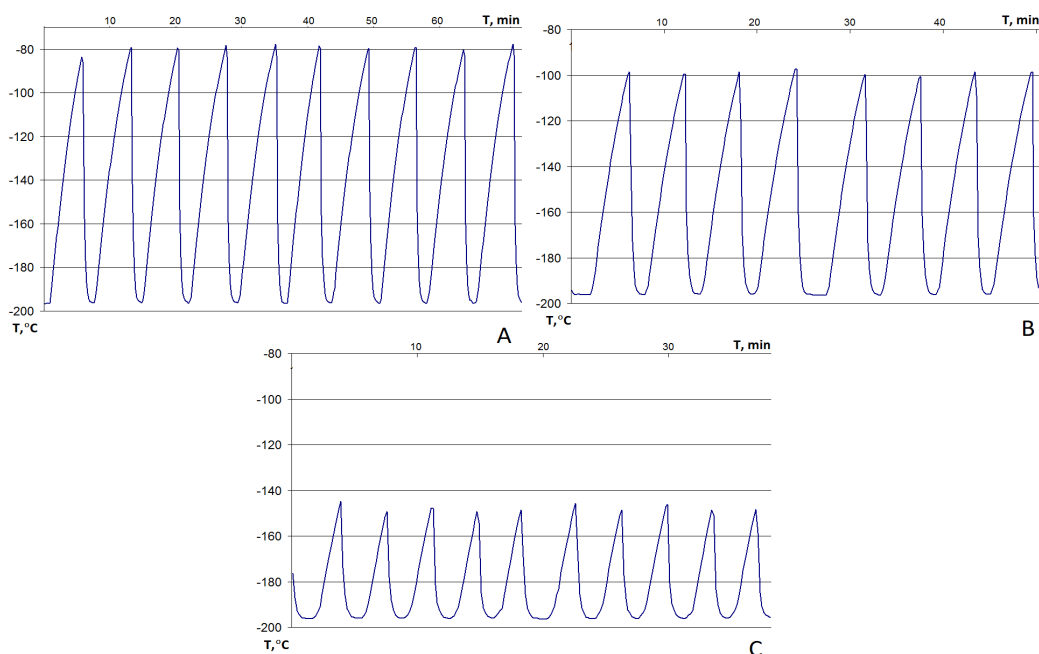


Рис. 3.18. Коливання температур в при моделюванні довгострокового зберігання. А – коливання до -80°C , В – коливання до -100°C , С – коливання до -150°C .

При вивченні кількості клітин після багаторазового коливання температур в зразках було показано, що цей показник знижувався в залежності від кількості температурних циклів, але мало залежав від діапазону коливань температури. При цьому вірогідне зниження спостерігали лише після 30 - 40 циклів коливання (рис. 3.19).

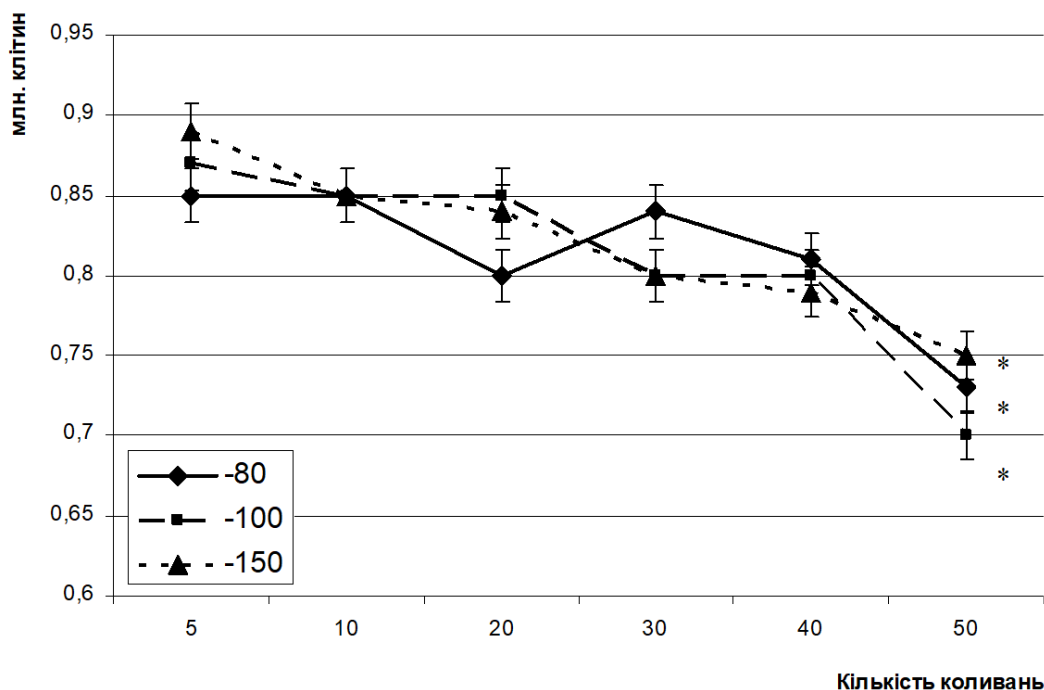


Рис. 3.19. Кількість клітин в зразках, що досліджувались, в залежності від кількості коливань температур. Примітка: *- вірогідність різниць з клітинами без коливань температур $p < 0,05$

При дослідженні життєздатності клітин методом забарвлення трипановим синім продемонстровано, що вона знижується в залежності від кількості циклів та від температури. Так життєздатність клітин при коливанні температури до -80°C падає в більш значній мірі, вже після 20 коливань температури. При коливанні температур до -100°C та -150°C вона не відрізняється між собою та вірогідно зменшується після 40 циклів коливань (рис. 3.20).

Ті ж данні було отримано шляхом проточної цитометрії після забарвлення пропідієм йодідом (рис. 3.21.), але на відміну від забарвлення трипановим синім показники життєздатності були нижче на 10-20 відсотків. Та значно відрізнялись після 10 циклів коливання температур при коливаннях до -80°C та 30 коливань в межах -100°C .

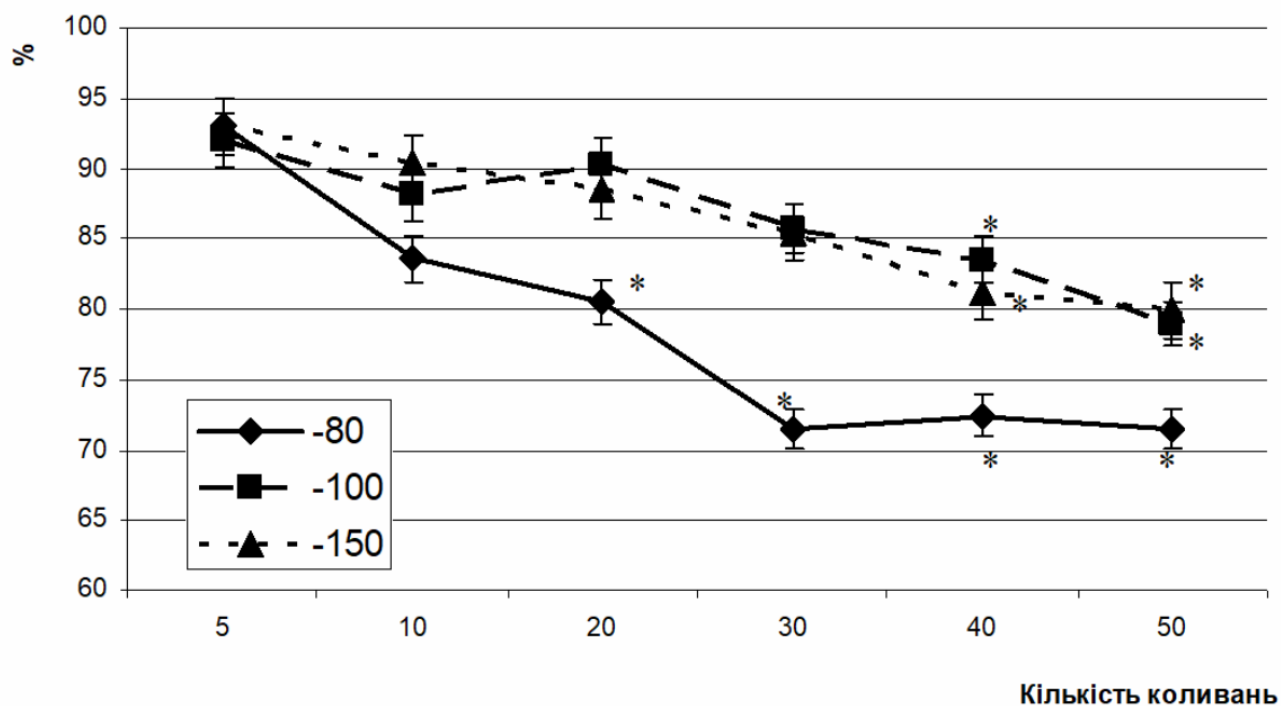


Рис. 3.20. Життєздатність клітин після коливання температур, забарвлення трипановим синім. Примітка: *- вірогідність різниць з клітинами без коливань температур $p < 0,05$

Данні проточної цитометрії з Annexin V та PI свідчать про те, що життєздатність клітин, після коливань температур значно падає, в більшому ступеню при -80°C , ніж -100°C та -150°C , вірогідно змінюючись вже після 10 циклів коливання температур, в той же час апоптотичні зміни клітин залишаються незначними, але більш вираженими при коливанні температур до -80°C . Так, при коливаннях в межах -80°C апоптотичні зміни в суспензії клітин плаценти з'являються при 5 циклах коливань, некротичні – при 10

циклах коливань та прогресують. При коливаннях в межах -100°C апоптотичні та некротичні зміни з'являються при 10 циклах коливань. При коливаннях в межах -150°C апоптотичні зміни незначні, виражені некротичні зміни спостерігаються після 40 коливань температури.

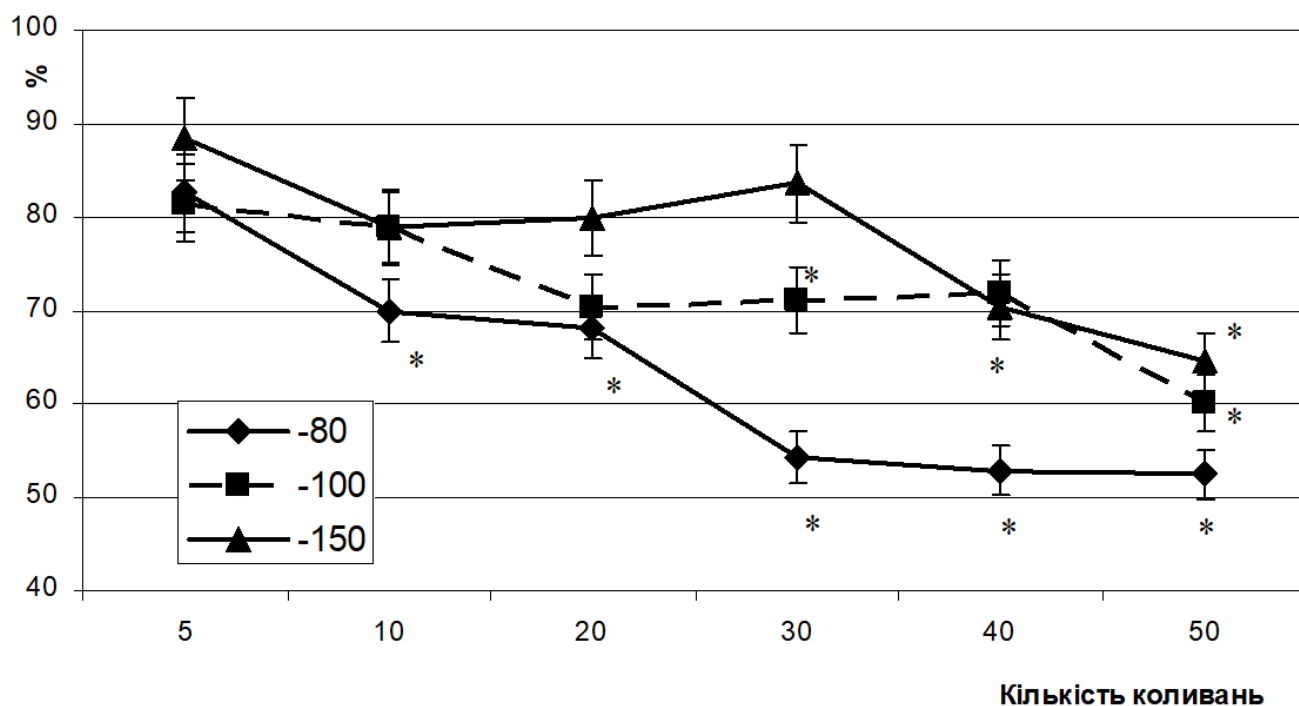


Рис. 3.21. Життєздатність клітин після коливання температур, забарвлення пропідієм йодідом. Примітка: * - вірогідність різниць з клітинами без коливань температур $p < 0,05$

При вивченні показників МТТ тесту при коливанні температур продемонстровано, що активність МТТ залежить як від меж коливання температур, так і від кількості коливань. Найбільше зниження МТТ відбувалося при коливанні температур в межах -80°C (рис. 3.22). Показник знижувався вірогідно вже після 10 коливань. В той же час показники МТТ мало знижувалися при коливанні температур в межах -100°C до 30 коливань. Коливання в межах та -150°C не впливали на показник МТТ тесту.

Таблиця 3.8

**Данні проточної цитометрії клітин плаценти з Anexin V + PI після
коливання температури (M±m)**

	FACS Anexin V + PI			
	Anexin V-,PI-	Anexin V-,PI+	Anexin V+,PI-	Anexin V+,PI+
Позитивний контроль	84,7±1,2	1,0±0,02	1,34±0,09	13,9±0,1
Негативний контроль	11,8±0,5	58,2±0,3	0,3±0,05	29,4±0,3
Кількість коливань	Коливання -196°C - -80°C			
5	82,6±0,6	1,12±0,02	2,24±0,1*	14,58±0,1
10	56,14±0,7*	1,1±0,01	2,49±0,08*	40,27±0,4*
20	68,16±0,7*	0,5±0,01	2,08±0,09*	29,17±0,3*
30	54,3±0,6*	0,73±0,02	3,03±0,07*	42,16±0,3*
40	52,9±0,6*	0,88±0,01	2,65±0,1*	43,8±0,4*
50	52,5±0,8*	0,68±0,03	1,85±0,06*	44,92±0,5*
Кількість коливань	Коливання -196°C - -100°C			
5	81,5±0,7	0,49±0,02	1,69±0,05	16,24±0,3
10	79,01±0,7	0,57±0,01	2,15±0,07*	18,27±0,2*
20	70,3±0,5*	0,9±0,03	2,03±0,02*	26,71±0,3*
30	71,13±0,8*	1,16±0,08	2,97±0,04*	24,74±0,2*
40	71,9±0,5*	0,66±0,04	3,23±0,02*	24,2±0,1*
50	57,19±0,5*	1,7±0,08	1,15±0,01	39,96±0,4*
Кількість коливань	Коливання -196°C - -150°C			
5	88,37±0,7	0,55±0,02	1,94±0,01	9,14±0,1
10	78,79±0,5*	0,34±0,01	1,58±0,03	19,29±0,2*
20	80,02±0,9	0,6±0,02	1,56±0,05	17,82±0,2*
30	83,6±0,8	0,86±0,01	1,8±0,09	13,72±0,2
40	70,39±0,8*	0,99±0,06	1,3±0,07	27,32±0,3*
50	64,49±0,5*	0,93±0,04	1,58±0,08	28,0±0,2*

Примітка: *- вірогідність різниць з клітинами без коливань температур
p<0,05

При вивченні тесту відновлення резазурину при коливанні температур продемонстровано, що активність відновлення резазурину знижується

аналогічно активності МТТ тесту, до 20-и коливань не спостерігається значної зміни при коливанні в будь-яких з досліджуваних меж, а при 40-50 коливань вірогідні зміни настають при коливанні в межах -80°C (рис. 3.23). Різниця в показниках МТТ та резазурину обумовлена тим, що тест МТТ проводиться протягом трьох годин, а тест відновлення резазурину – протягом доби. За цей час метаболізм клітини встигає нормалізуватися після кріоушкодження.

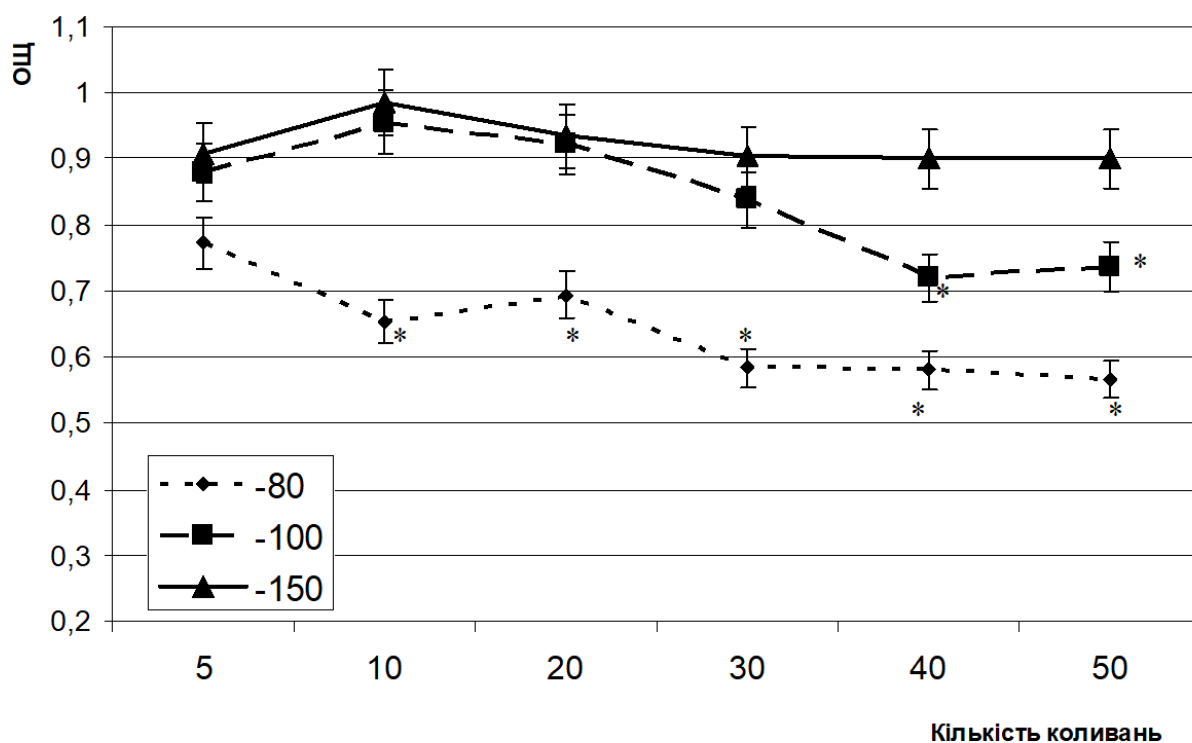


Рис. 3.22. Показники МТТ тесту клітин плаценти при коливанні температур. Примітка: *- вірогідність різниць з клітинами без коливань температур $p < 0,05$

Таким чином, після проведених досліджень, можна зробити висновок, що при коливанні температур в межах -196°C - -150°C значні зміни в кількості, життєздатності та функційній активності клітин плаценти спостерігаються при більш ніж 20 коливань, апоптотичних змін в цьому випадку не спостерігається. При коливаннях температур в межах -196°C - -100°C спостерігаються також значні зміни при коливанні температури більш ніж 20 разів, при цьому показники кількості клітин, їх життєздатності та

функційної активності мало відрізнялися від тих, що були отримані при коливанні температури в межах -196°C - -150°C . При коливанні температури в межах -196°C - -80°C отримані данні по життєздатності, кількості клітин та їх метаболічної активності вірогідно відрізняються та є більш вираженими. Відігрів до 37°C та повторне заморожування клітин призводить до втрати близько половини клітин та знижує життєздатність та адгезивну активність клітин близько на 20 %, подвоюючи строки формування моношару.

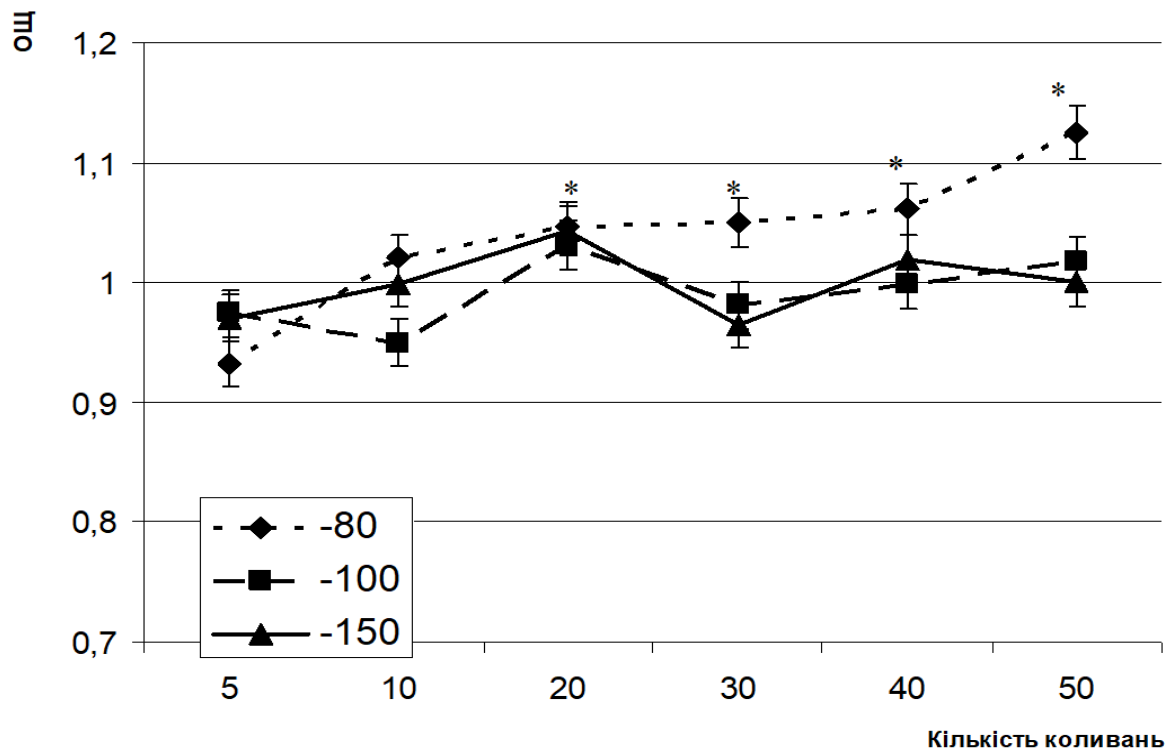


Рис. 3.23. Показники тесту відновлення резаурину клітин плаценти при коливанні температур. Примітка: *- вірогідність різниць з клітинами без коливань температур $p < 0,05$

При проведенні кріомікроскопічного дослідження циклічні коливання в інтервалі температур від -80°C до -100°C не призвели до суттєвих змін розміру клітин, розміру агрегатів клітини, кристалів та каналів між ними. Були виявлені зміни прозорості кристалів, що, однак, може бути пов'язане з характеристиками обладнання. Втім візуально при проведенні цих коливань візуально спостерігали зміни включень, що може свідчити про зміни

загального об'єму льоду та невеликі зсуви. Збільшення розміру газових бульбашок спостерігалось при зниженні температури, а при підвищенні вони набували попередніх розмірів (рис. 3. 24).

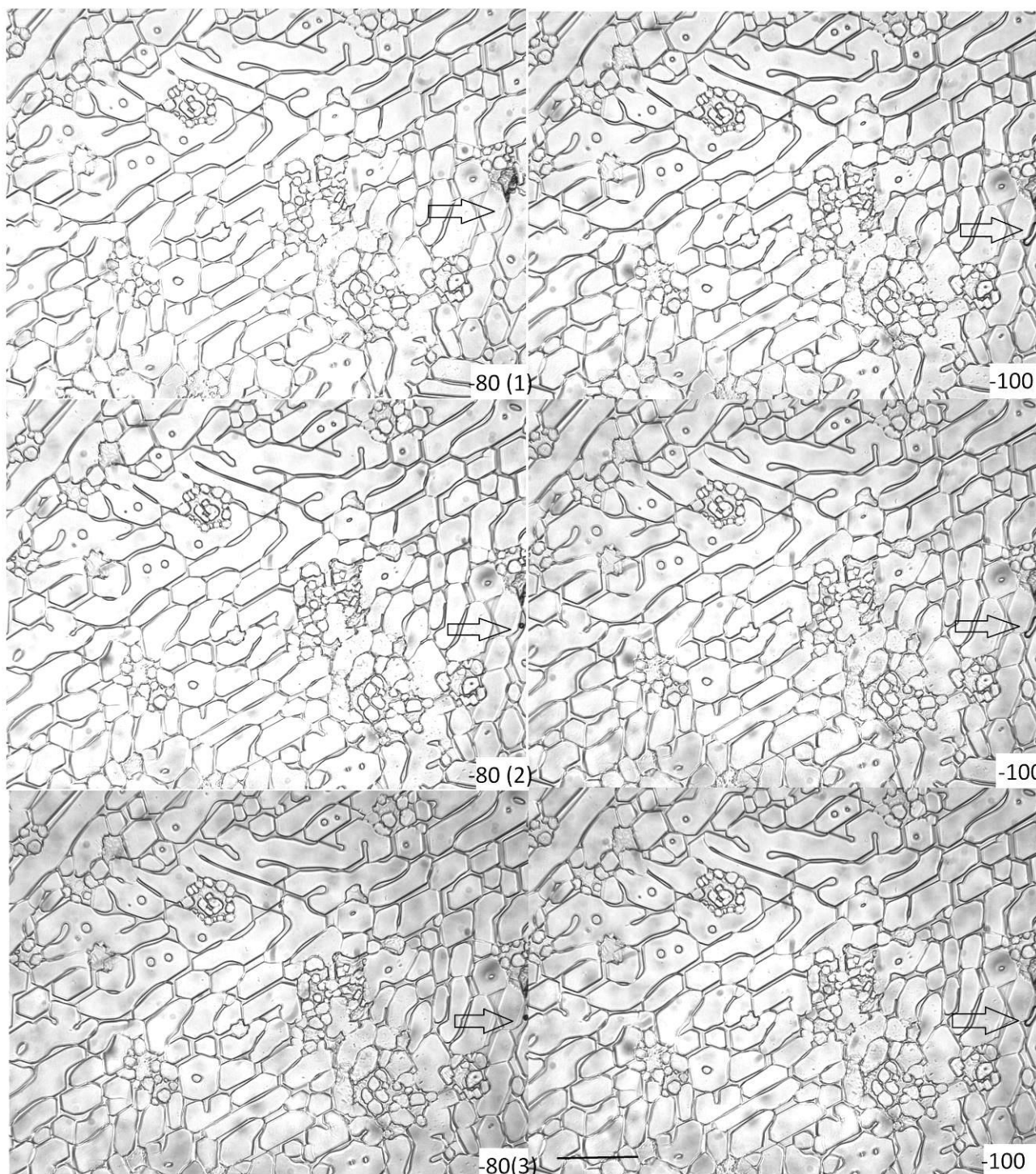


Рис. 3.24. Суспензія клітин плаценти при коливанні температур, кріомікроскопічне дослідження. Позначена температура, та номер циклу у дужках. Включення, позначені стрілками. Масштабна лінійка 50 мкм.

Таким чином при проведенні кріомікроскопічного дослідження в спостерігаються мінімальні морфологічні зміни при коливанні температур. Вірогідно основні зміни відбуваються на ультраструктурному рівні.

3.2. Дослідження впливу факторів кріоконсервування, субнормотермічного та гіпотермічного зберігання на експланти плаценти

Експланти плаценти є зручним об'єктом для кріоконсервування, гіпотермічного зберігання та трансплантації. Це обумовлено їх структурою і функцією. Так, ворсини мають невелику товщину, здатність до існування у рідкому середовищі (лакунах, заповнених кров'ю), строму з рихлої ембріональної мезенхіми та вони вкриті сінцитіотрофобластом зі зниженою імуногенністю та підвищеною стійкістю до несприятливих умов. Це сприяє легкому насиченню ворсин кріопротектором, дає можливість культивувати ворсини без застосування флотуючи систем, необхідних для інших об'єктів, уникаючи явищ центрального некрозу, підвищує час виживання ворсин в організмі реципієнта.

Вплив гіпотермічного та субнормотермічного зберігання на експлантів плаценти.

В попередньому розділі при виділенні клітин з плацентарного матеріалу було визначено, що можливо виділення достатньої кількості життєздатних клітин з матеріалу, який був доставлений не пізніше 3-х годин після пологів. При виділенні клітин з матеріалу, який було доставлено протягом 6-12 годин спостерігали виділення поодиноких клітин, які рідко формували моношар.

При роботі з тканинами важливими є питання кількісного співвідношення тканини до середовища, температуру зберігання та активності тканин. Так при зберіганні та транспортуванні експлантів плаценти в середовищі в співвідношенні 1:1 середовище змінює колір з рожевого на жовтий протягом 2-3 годин, що свідчить про зміну кислотності

та виснаження середовища. Емпіричним шляхом було доведено, що можливе культивування експлантів плаценти в співвідношенні 10 мг матеріалу на 1 мл середовища. Це співвідношення дозволило з одного боку забезпечити життєздатність тканини, з іншого – користуватися біохімічними методами оцінки клітин (МТТ, тест відновлення резазурину, поглинання глюкози з середовища, ЛДГ, ЛФ). При меншій кількості експлантів зміни в накопиченні ферментів та метаболічної активності (МТТ тест, тест відновлення резазурину) не отримувати вірогідно різні данні, навіть між позитивним та негативним контролем. При постановці експерименту з тканиною пуповини (Вартонієві драгли), та фрагментах плідних оболонок кількість тканини повинна бути в 2-3 рази більшою для можливості оцінки її життєздатності та метаболічної активності. Такі розбіжності можна пояснити функціями тканини. Ворсини плаценти активно приймають участь в обміні між матір'ю та плодом, виконують ендокринні та регуляторні функції, в той час, як клітини Вартонієвих драгелів чи оболонок менш активні та беруть участь у формуванні сполучної тканини, яка має структурну та захисну функцію. температура зберігання повинна бути такою, що б знизити метаболізм тканини, а одночасно і споживання речовин з середовища, але без ушкоджень. На нашу думку можливо підвищити кількість тканини в середовищі за рахунок зменшення температури зберігання чи застосування розчинів для гіпотермічного зберігання. Комбінування всіх цих факторів значно розширює кількість експериментів та не є завданням конкретного дослідження.

Враховуючи вищезазначене, дослідження гіпотермічного та субнормотермічного зберігання було обрано саме це співвідношення для зберігання експлантів плаценти до середовища культивування.

При субнормотермічному зберіганні виявлено, що можливо збереження експлантів плаценти в субнормотермічних умовах протягом 1-2 діб без значного зниження показників збереженості (табл. 3.9.). При подальшому зберіганні показники функційної активності відрізнялись від

негативного контролю, але значно знижувались, з чого було зроблено висновок про недоцільність подальшого зберігання.

Таблиця 3.9

Характеристика експлантів плаценти після короткочасного зберігання при субнормотермічних умовах + 20°C (M±m)

	МТТ тест (Од ОЩ)	Тест відновлення резазуріну (% зменшення абсорбції)	Глюкоза (Ммоль/л)
Позитивний контроль	3,2±0,31	59,2±5,2	1,95±0,25
Негативний контроль	0,2±0,1	4,3±0,25	2,4±0,2
24 год	3,0±0,41*	58,2±0,24*	2,0±0,28*
48 год	2,9±0,28*	55,3±0,49*	2,1±0,21*
72 год	2,5±0,24*,**	40,2±0,43*,**	2,2±0,19**
96 год	1,2±0,34*,**	20,2±0,91*,**	2,3±0,4**

Примітка: *- вірогідність різниць з негативним контролем $p < 0,05$,

** - вірогідність різниць з позитивним контролем $p < 0,05$.

При морфологічному дослідженні нативних препаратів експлантів плаценти, забарвлених гематоксиліном і еозином, спостерігали типову структуру (рис. 3.25). Ворсини вкриті шаром синцитію з нормохромними ядрами, який подекуди формує синцитіальні вузлики. Під ним знаходяться окремі скопичення клітин цитотрофобласту, які в плаценті пізнього терміну вже не формують суцільного шару. Строму ворсин формує рихла ембріональна мезенхіма, в якій окрім клітин сполучної тканини спостерігаються макрофагальні елементи. Подекуди в препараті зустрічаються вторинні та третинні ворсини, в яких видно судини з еритроцитами. Навколо ворсин зустрічаються також еритроцити матері.

Після зберігання ворсин плаценти протягом 24 годин при субнормотермічних умовах спостерігали звуження ворсин, зменшення відстані між ними (рис. 3.26). Загальна структура та форма ворсин зберігалася. Шари трофобласту візуально зливалися, потовщувалися, але повністю вкривали ворсини, не відслоюючись. Клітини мезенхіми теж чітко

не диференціювалися, що може свідчити про їх зближення, через зменшення ворсин. Підвищувалася еозинофілія цитоплазми клітин та гетерохромія ядер.

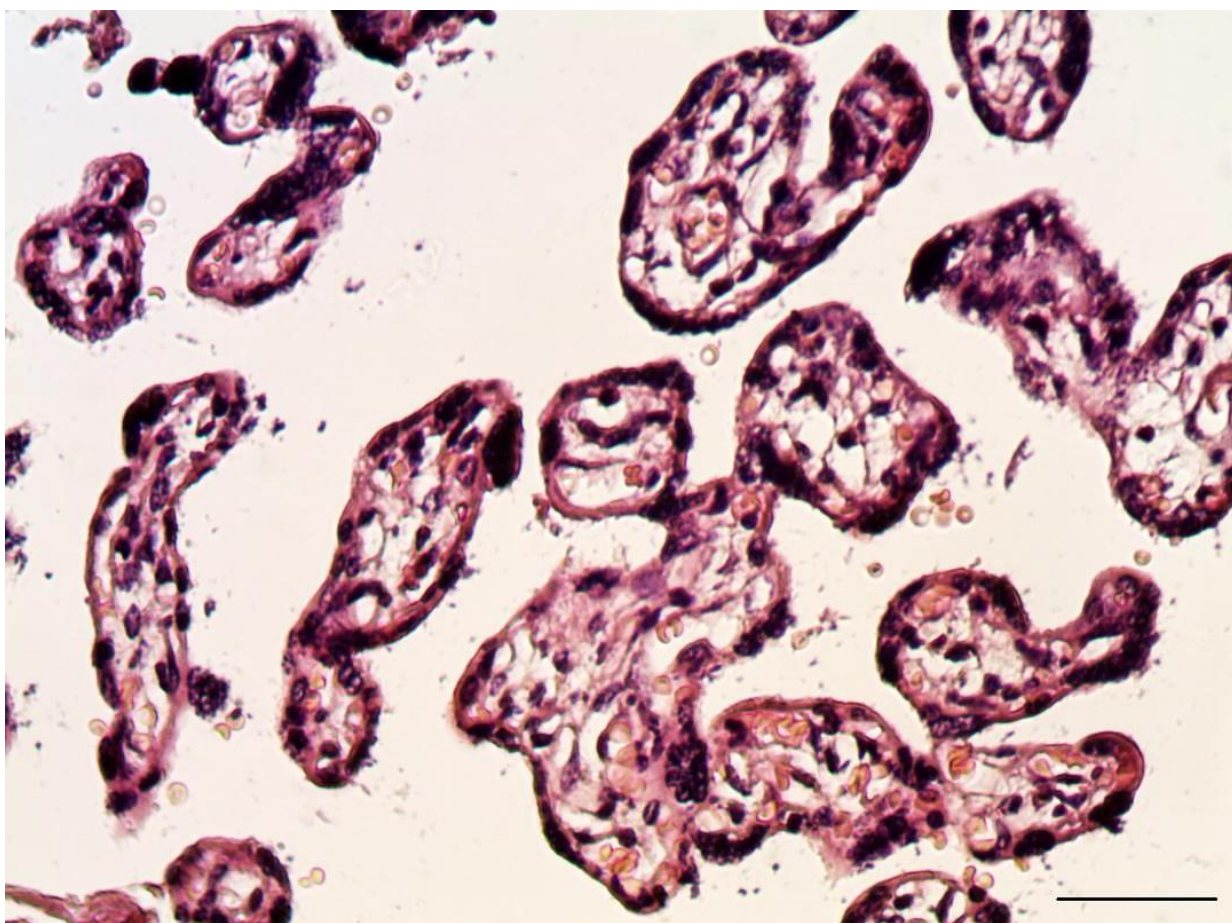


Рис. 3.25. Нативні ворсини плаценти. Забарвлення геметоксілін-еозином. Масштабна лінійка 50 мкм.

На другу добу субнормотермічного зберігання зміни прогресували, з'являлися місця відшарування трофобласту, явища деструкції ворсин (рис. 3.27). На третю добу, через 72 години зберігання трофобласт чітко не диференціювався, відшаровувався від ворсин, спостерігали деструкцію ворсин, гіперхромію ядер, яка свідчить про пригнічення синтезу РНК (рис. 3.28.). При проведенні МТТ тесту кристали формагану з'являлися лише в периферійних зонах, більшість клітин трофобласту та мезенхіми формаган не синтезували.

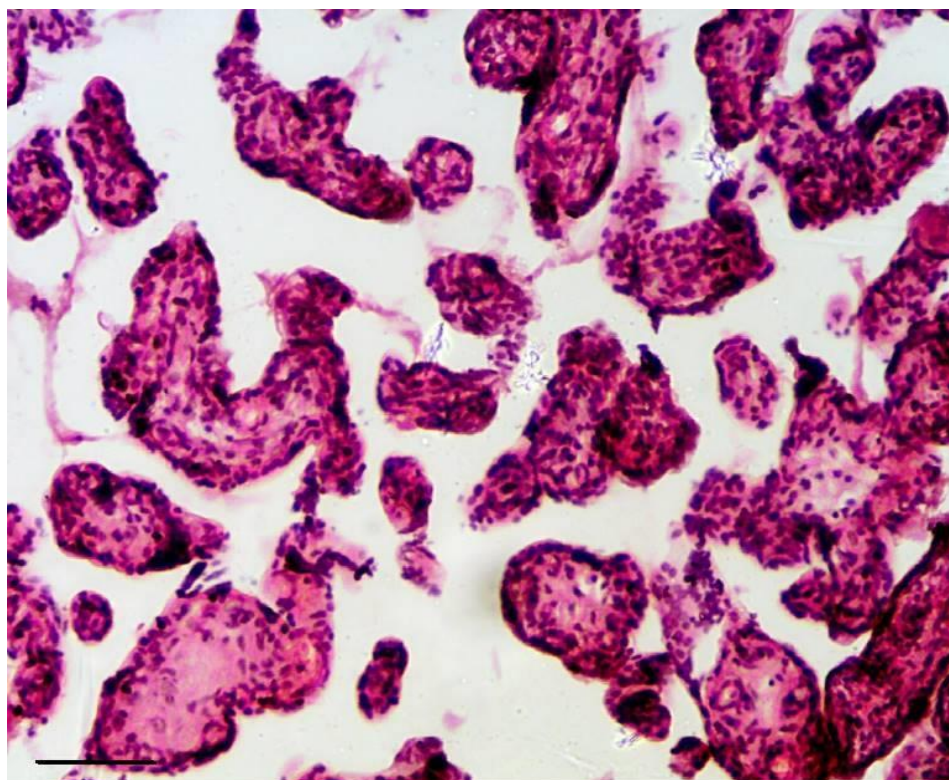


Рис. 3.26. Ворсини плаценти після зберігання протягом 24 годин при 20°C. Забарвлення геметоксілін-еозином. Масштабна лінійка 50 мкм.

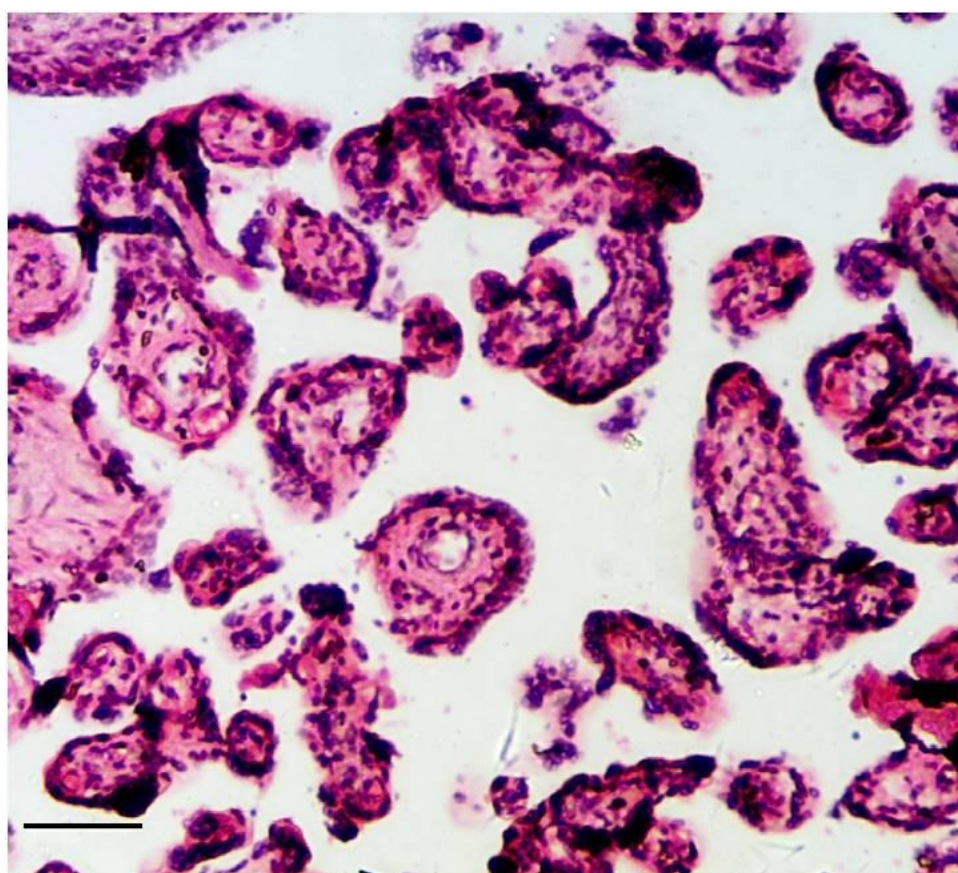


Рис. 3.27. Ворсини плаценти після зберігання протягом 48 годин при 20°C. Забарвлення геметоксілін-еозином. Масштабна лінійка 50 мкм.

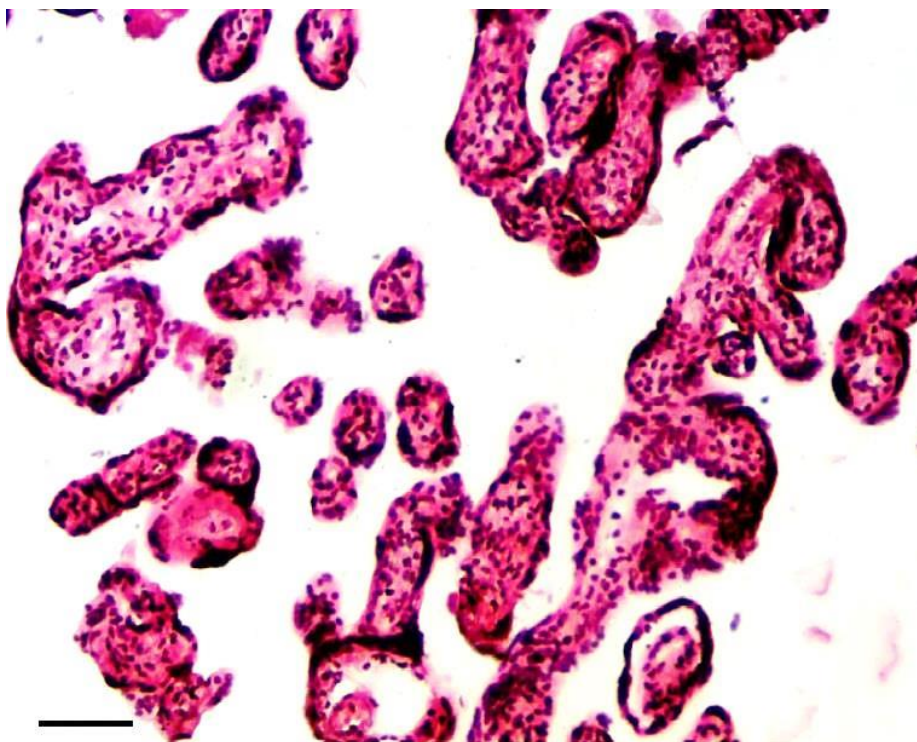


Рис. 3.28. Ворсини плаценти після зберігання протягом 72 годин при 20°C. Забарвлення геметоксілін-еозином. Масштабна лінійка 50 мкм.

При гіпотермічних умовах зберігання можливе збереження експлантів плаценти протягом 1 доби за даними МТТ тесту та тесту споживання глюкози. За даними тесту відновлення резазурину через 24 години спостерігаються вірогідні зміни від контролю (табл. 3.10.).

Таблиця 3.10

Характеристика експлантів плаценти після короткочасного зберігання при гіпотермічних умовах + 4°C (M±m)

	МТТ тест (Од ОЩ)	Тест відновлення резазурина (% зменшення абсорбції)	Глюкоза (Ммоль/л)
Позитивний контроль	3,2±0,31	59,2±5,2	1,95±0,25
Негативний контроль	0,2±0,1	4,3±0,2	2,4±0,2
24 год	2,6±0,28*	45,3±0,51*,**	2,0±0,15*
48 год	1,5±0,32*,**	21,2±0,34*,**	2,2±0,23**
72 год	0,5±0,25**	6,2±0,23*	2,3±0,21**

Примітка: *- вірогідність різниць з негативним контролем $p < 0,05$,

** - вірогідність різниць з позитивним контролем $p < 0,05$.

При морфологічному дослідженні експлантів плаценти після 24 годин зберігання в гіпотермічних умовах ворсини були зменшені, проміжки між ворсинами розширені. Трофобласт звужувався, частково відшаровувався від мезенхіми. Мезенхіма зморщена, з підвищеною еозинофільністю. Ядра всіх клітин були гіперхромні, що свідчить про зниження їх активності (рис. 3.29.), яке продемонстровано вище біохімічними характеристиками.

При зберіганні в гіпотермічних умовах протягом 48 годин прогресували деструкція та десквамація трофобласту, подекуди він зливався з мезенхімою, чи чітко не візуалізувався (рис. 3.30.). Мезенхіма також зазнавала деструктивних змін. При проведенні МТТ тесту до екстракції формазану його кристали знаходились переважно в периферійних судинних скупченнях клітин.

При зберіганні протягом 72 годин в більшості ворсин не вдавалося чітко диференціювати строму та трофобласт, виділити окремі структури (рис. 3.31.)

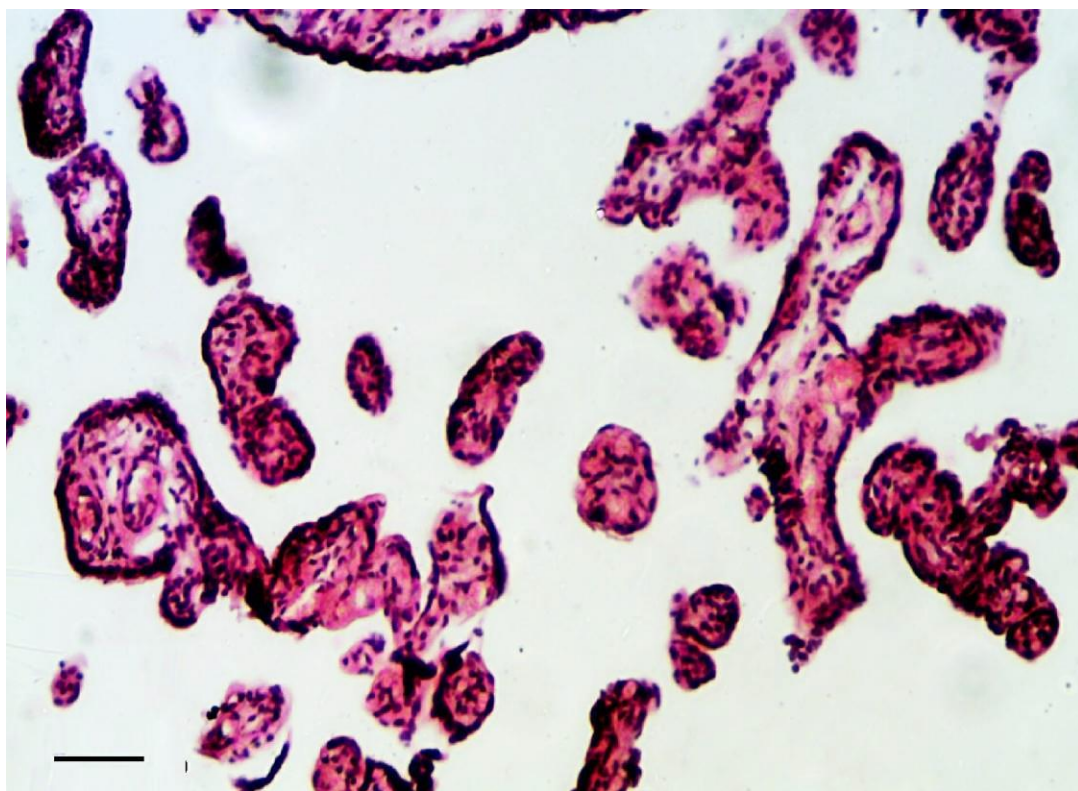


Рис. 3.29. Ворсини плаценти після зберігання протягом 24 годин при 4°C. Забарвлення геметоксілін-еозином. Масштабна лінійка 50 мкм.

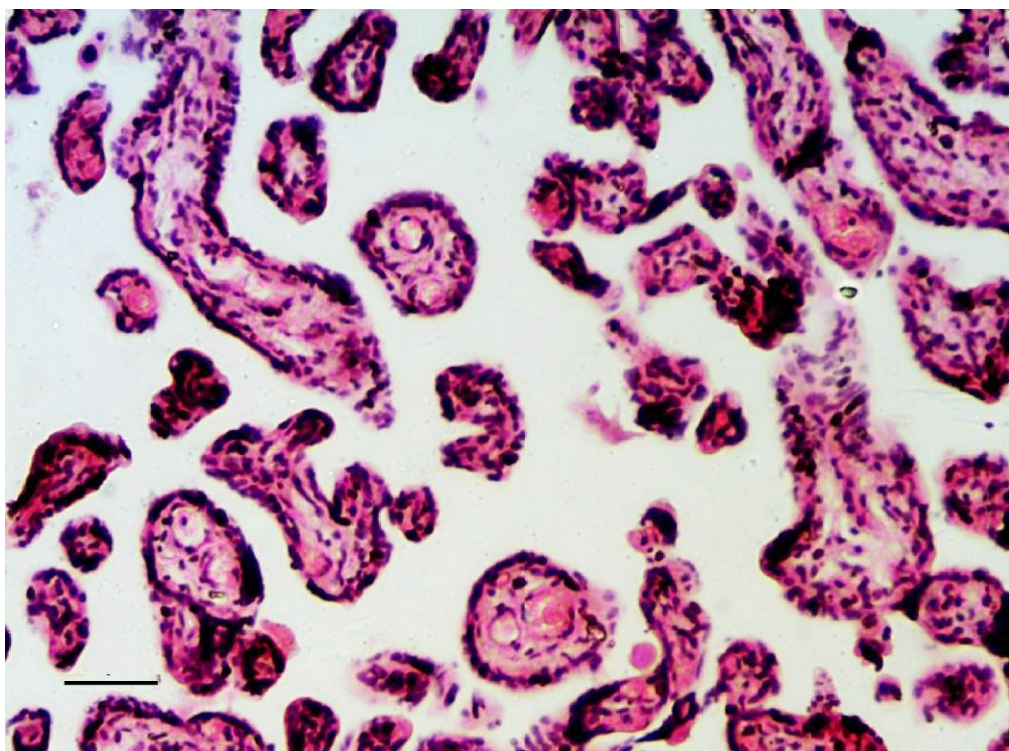


Рис. 3.30. Ворсини плаценти після зберігання протягом 36 годин при 4°C. Забарвлення геметоксілін-еозином. Масштабна лінійка 50 мкм.

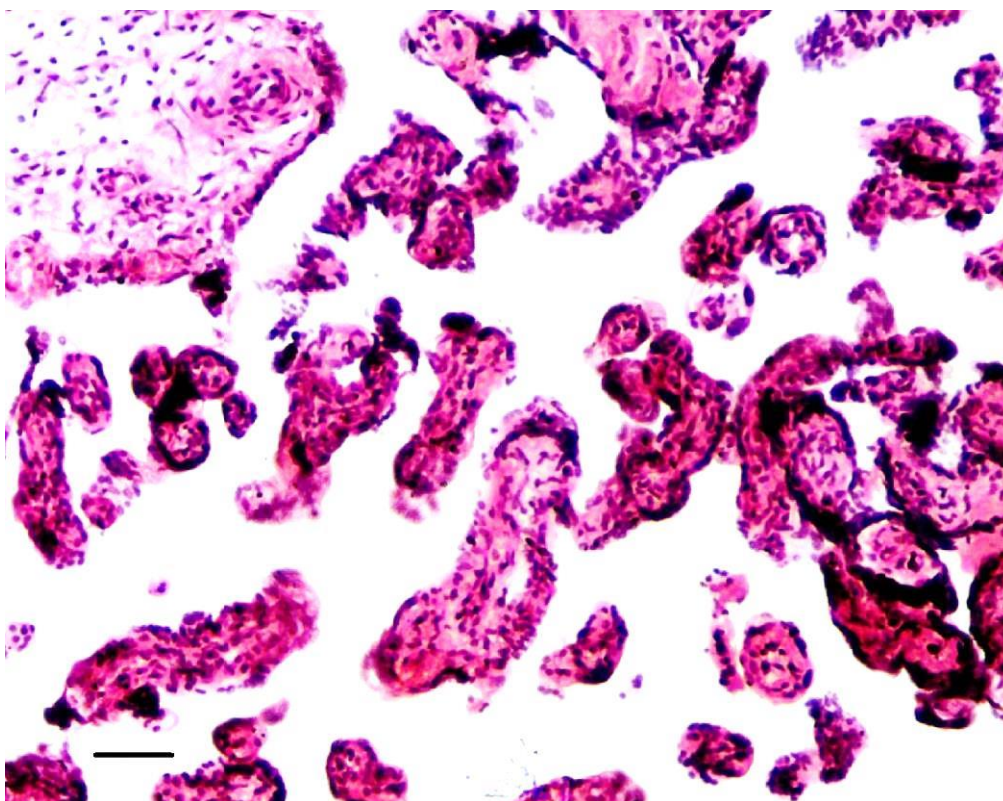


Рис. 3.31. Ворсини плаценти після зберігання протягом 72 годин при 4°C. Забарвлення геметоксілін-еозином. Масштабна лінійка 50 мкм.

Ці данні співпадають з результатами, отриманими при дослідженні можливості гіпотермічного та субнормотермічного зберігання клітин плаценти, що вказано вище.

Вплив кріоконсервування на збереженість експлантів плаценти.

Для повної оцінки стану експлантів плаценти після низькотемпературного зберігання необхідно проведення морфологічної та функційної оцінки препаратів.

У негативному контролі, отриманому зануренням у рідкий азот спостерігали характерні зміни структури, які виникають при кріоушкодженнях (рис. 3.32). Трофобласт відділений від строми ворсин по базальній мембрані, фрагментований. Ворсини зруйновані, за рахунок розривів в ембріональній мезенхімі. також спостерігаються зморщені термінальні ворсини. Ядра всіх клітин гіперхромні, клітини зморщені. Капіляри у вторинних та третинних ворсинах також зруйновані, еритроцити в них відсутні.

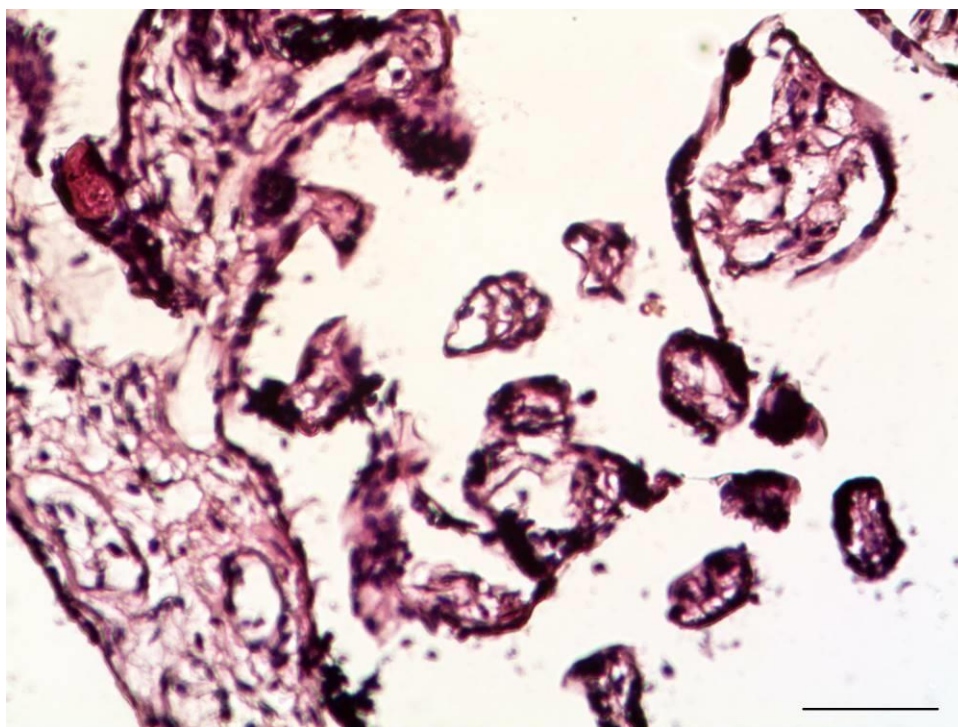


Рис. 3.32. Зруйновані зануренням у рідкий азот ворсини плаценти. Забарвлення геметоксілін-еозином. Масштабна лінійка 50 мкм.

У деконсервованих зразках експлантів плаценти загальний вигляд препаратів за своєю структурою менш відрізняється від нативних (рис. 3.33). подекуди спостерігали відшарування трофобласту від строми ворсин. Найбільші зміни спостерігали в мезенхімі: міжклітинні простори були розширені, клітини зменшені, але не відділені одна від одної: клітинні контакти зберігалися. Ці зміни можна пов'язати з ростом кристалів льоду в мезенхімі протягом охолодження. Судини зберігалися. Ядра всіх клітин нормохромні. Зміни зникали протягом доби культивування ворсин.

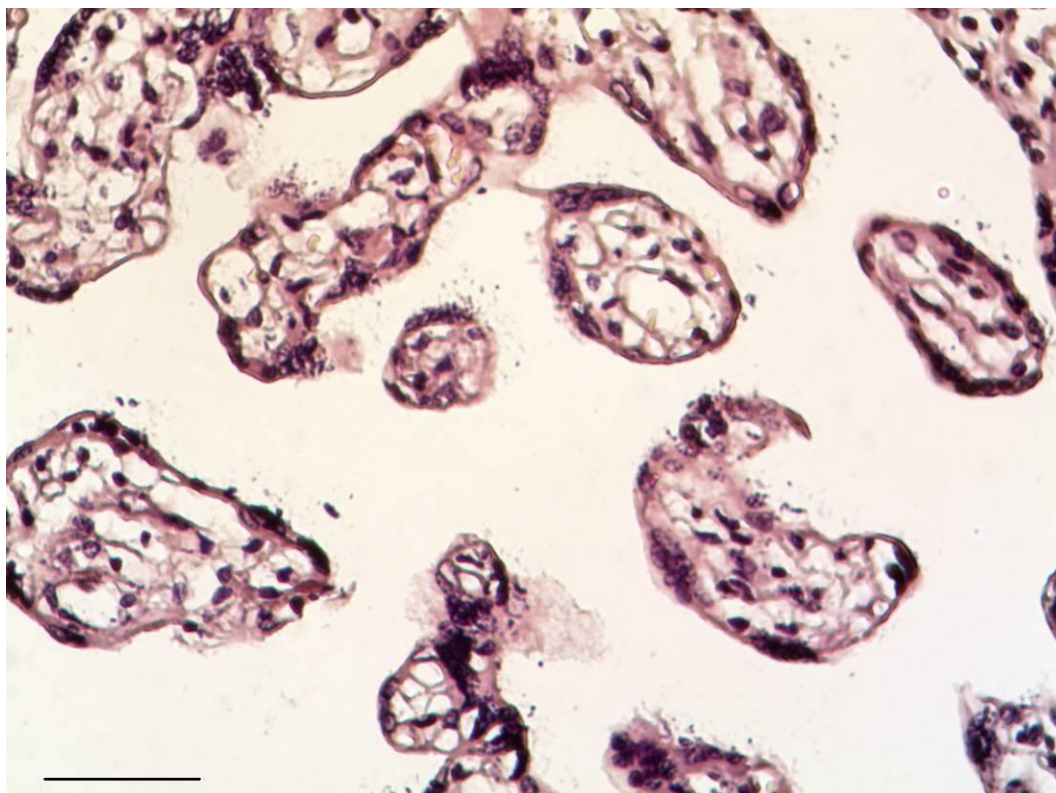


Рис. 3.33. Ворсини плаценти після кріоконсервування. Забарвлення геметоксілін-еозином. Масштабна лінійка 50 мкм.

При дослідженні вітального забарвлення нативних препаратів експлантів плаценти спостерігали поодинокі клітини забарвлені трипановим синім і нейтральним червоним, поодинокі затікання барвника в строму (рис. 3.34). Такі зміни пояснюються збереженістю клітин та тканини в цілому. Затіканні барвника в строму можна пояснити травмуванням деяких ворсин.

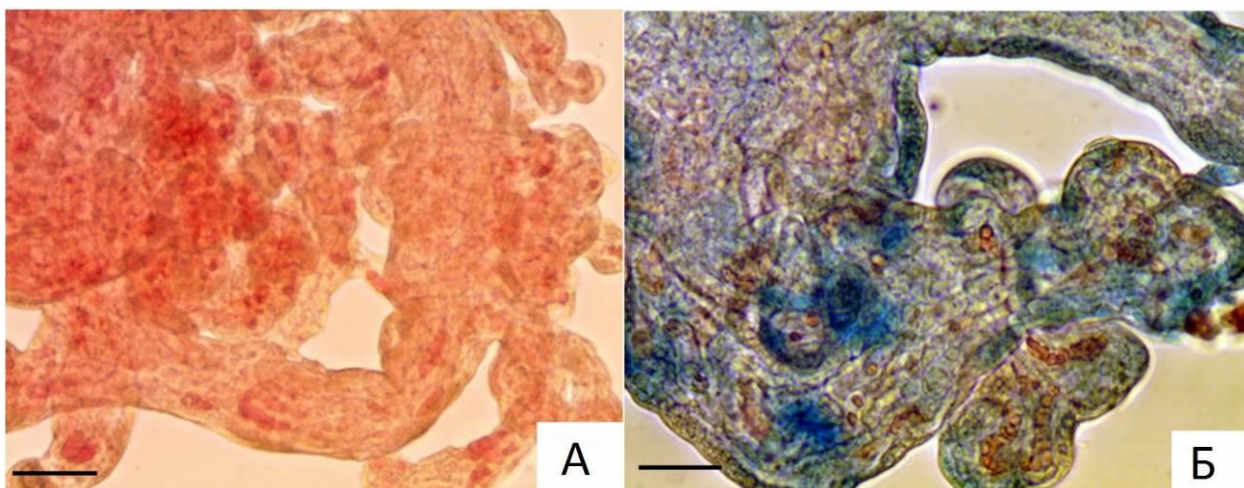


Рис. 3.34. Нативні ворсини плаценти. А – забарвлення нейтральним червоним, Б – забарвлення трипановим синім. Масштабна лінійка 50 мкм.

У негативному контролі спостерігали забарвлення трипановим синім і нейтральним червоним всіх клітинних елементів (як трофобластичних, так і клітин стромы), також спостерігається затікання барвників в строму ворсин (рис. 3.35.).

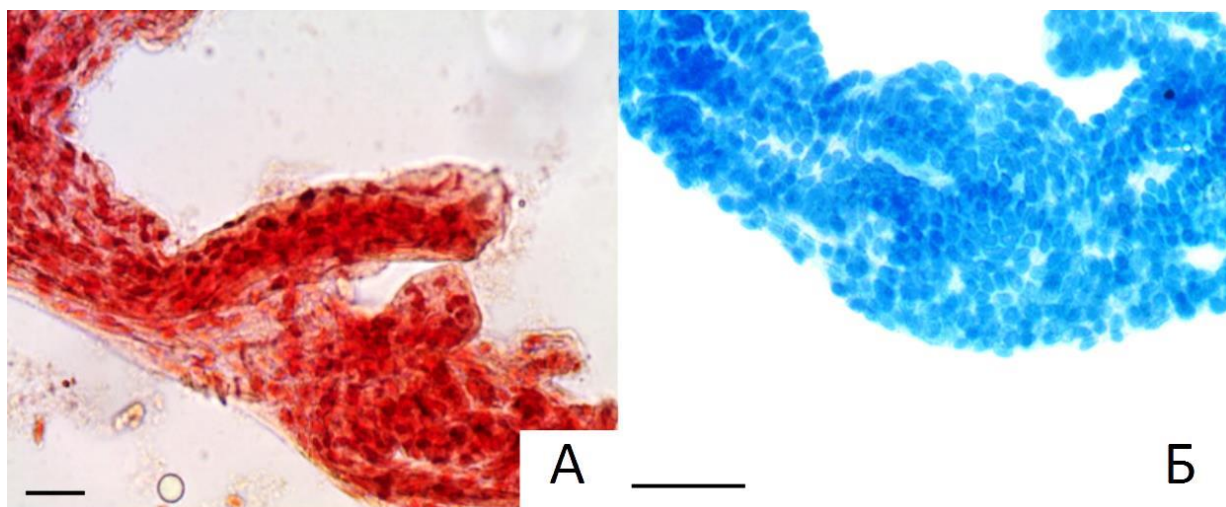


Рис. 3.35. Зруйновані зануренням у рідкий азот ворсини плаценти. А – забарвлення нейтральним червоним, Б – забарвлення трипановим синім. Масштабна лінійка 50 мкм.

У деконсервованих зразках спостерігали поодинокі забарвлені окремих клітини, затікання трипанового синього та нейтрального червоного в строму

зразків. Такі зміни можна пояснити розривом строми, та десквамацією трофобласту, виявленим при гістологічних дослідженнях (рис. 3.29).

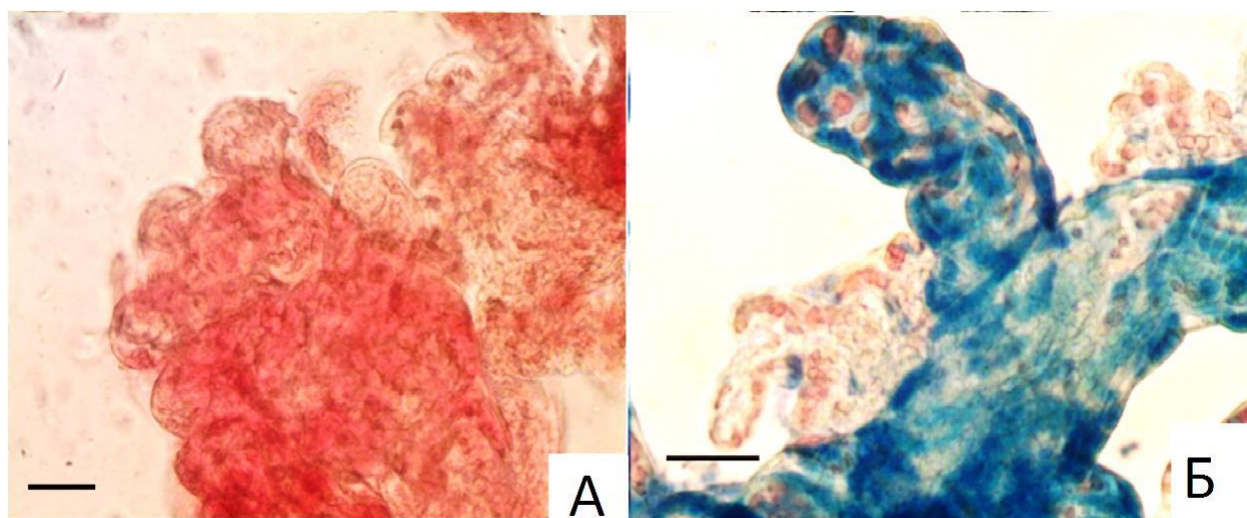


Рис. 3.36. Ворсини плаценти після кріоконсервування. А – забарвлення нейтральним червоним, Б – забарвлення трипановим синім. Масштабна лінійка 50 мкм.

При проведенні конфокальної мікроскопії в нативному зразку (рис. 3.37, А), спостерігали забарвлення FDA більшості клітин, EB забарвлював менше 1% клітин.

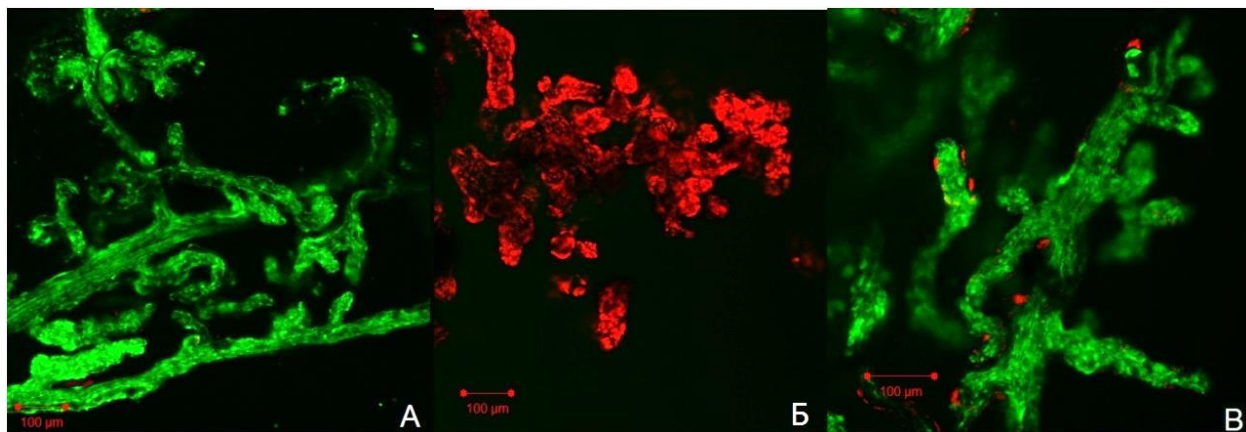


Рис. 3.37. Експланти плаценти при кріоконсервуванні. А – нативні клітини, Б – негативний контроль, В – клітини після кріоконсервування. Забарвлення FDA та EB, масштабні лінійки 100 мкм.

В негативному контролі 100% клітин забарвлювалося EB (рис 3.37, Б). В зразках після кріоконсервування більшість клітин забарвлювалося EB,

забарвлював поодинокі клітини (рис 3.37, В). Однак було помічено, що ЕВ погано проникає в середину ворсини, а FDA погано забарвлює шар сінцитію.

При аналізі МТТ тесту було виявлено достовірне його зниження в негативному контролі, в той час коли нативні зразки і деконсервовані експланти за цим показником не відрізнялися (рис. 3.38, А). При дослідженні відновлення резазурину доведено, що даний показник у деконсервованих зразках значно нижчий ніж у нативних, проте достовірно вищий ніж у негативному контролі (рис. 3.38, Б).

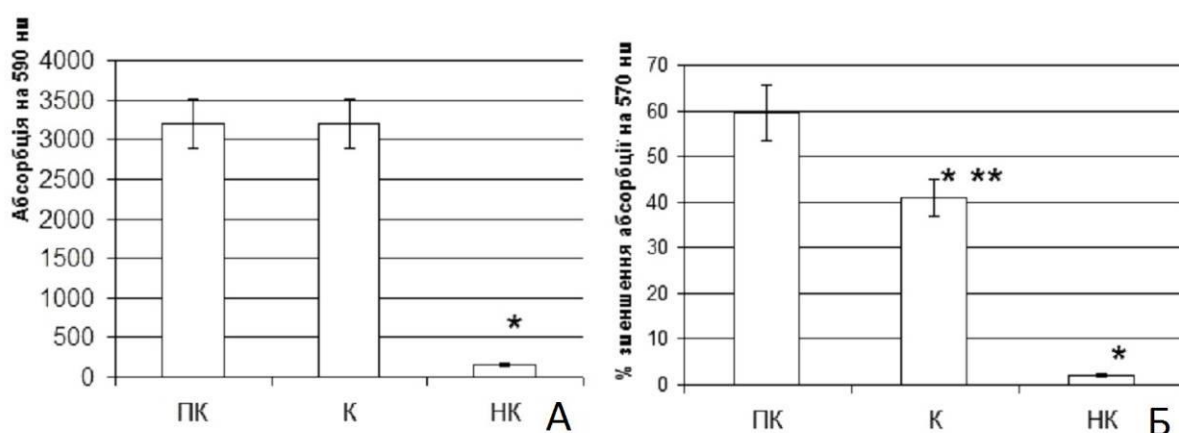


Рис. 3.38. Метаболічна активність експлантів плаценти після кріоконсервування. ПК – позитивний контроль, К – кріоконсервування, НК – негативний контроль. А – МТТ тест, Б – тест на відновлення резазурину. Примітки: * – вірогідність різниці з нативною тканиною, $p < 0,05$;

** – вірогідність різниці з негативним контролем, $p < 0,05$.

При дослідженні поглинання глюкози з середовища показано, що вміст глюкози в пробі з негативним контролем дорівнює вмісту, заявленому виробником, в той час як в нативній пробі він значно нижчий, в деконсервованих зразках концентрація глюкози має тенденцію до зниження порівняно з позитивним контролем, що може свідчити про інтенсифікацію фосфорилювання після кріовпливу (рис. 3.39, А).

Продемонстровано зниження активності лужної фосфатази (ЛФ) після кріоконсервування (рис. 3.39, Б). Оскільки лужна фосфатаза є ферментом,

специфічним для плаценти, цей показник може бути важливим в оцінці стану експлантів.

При вивченні показників лактатдегідрогенази (ЛДГ) достовірних змін показників не встановлено (рис. 3.32, В).

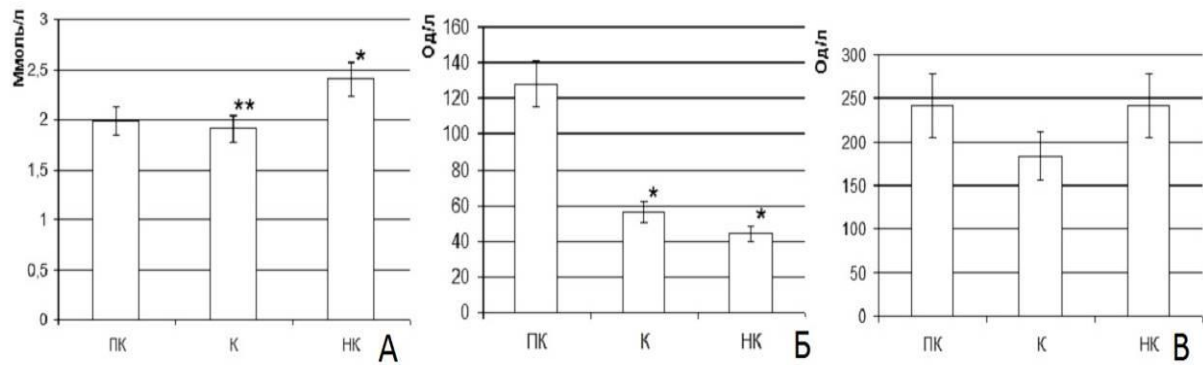


Рис. 3.39. Біохімічні показники в досліджуваних зразках: А – поглинання з середовища глюкози, Б – накопичення в середовищі ЛФ, В – накопичення в середовищі ЛДГ. ПК – позитивний контроль (нативні зразки), К – зразки після кріоконсервування, НК – негативний контроль.

Примітки: * – вірогідність різниці з нативною тканиною, $p < 0,05$;

** – вірогідність різниці з негативним контролем, $p < 0,05$.

При кріомікроскопічному дослідженні процесів кристалізації в ворсинах хоріону зображення було незмінним до -14°C , після цієї температури спостерігали різкий початок кристалоутворення, який виражався в утворенні мілких кристалів навколо тканини та потемніння самої тканини (рис 3.40). Ефект зниження прозорості тканини пояснюється різким збільшенням кількості віддзеркалюючих поверхней, відображає велику кількість кристалів у зразку та ускладнює кріомікроскопічний аналіз. Візуально помітні процеси рекристалізації продовжуються до -30°C , при цьому кристали поза тканиною значно збільшуються до розмірів $12,4 \pm 1,9$ мкм, а в тканині з'являються видимі кристали, розміром $2,3 \pm 0,5$ мкм. При подальшому заморожуванні до -100°C візуальних змін не спостерігали. При розморожуванні візуально явища рекристалізації у тканині спостерігали при підвищенні температури з -30°C до -20°C . Розмір кристалів у тканині

дорівнював $4,4 \pm 1,5$ мкм. Після -20°C спостерігали плавлення кристалів льоду в тканині та позатканинній рідині, яке закінчувалося при в межах -7°C - -6°C . Структура незабарвленого нативного препарату до та після кріоконсервування мало відрізнялася, площа препарату не змінювалася.

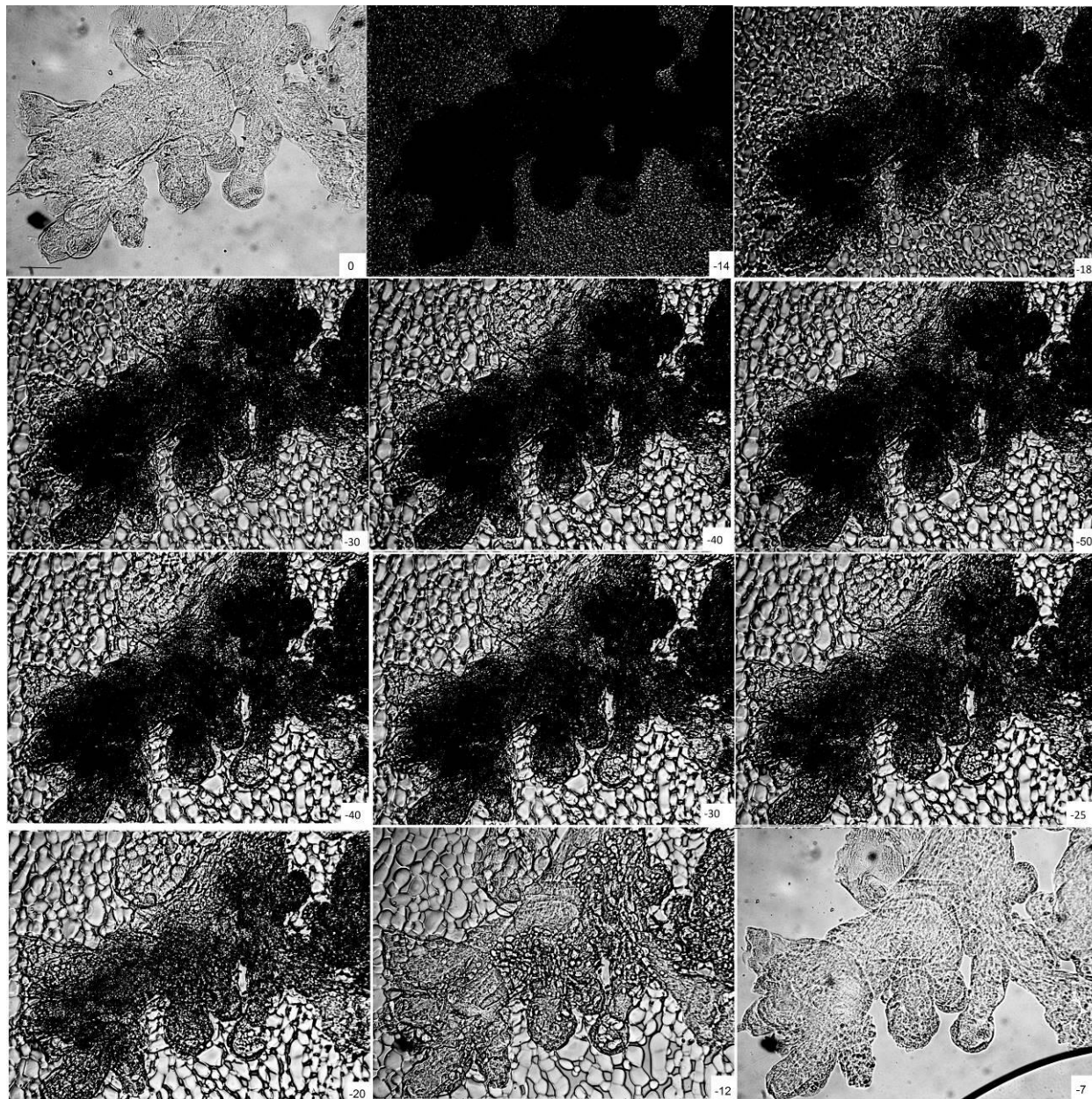


Рис. 3.40. Експланти плаценти при кріоконсервуванні, кріомікроскопічне дослідження. Перші два рядка – охолодження, нижні два рядка – відігрів. Температура позначена на кожному рисунку в $^{\circ}\text{C}$. Масштабна лінійка 50 мкм.

Результати кріомікроскопічного дослідження співпадають з морфологічним дослідженням ворсин. Завдяки ньому підтверджена гіпотеза

щодо ушкодження стромы ворсин через формування кристалів льоду, оскільки розміри кристалів співпадають з дефектами в стромі ворсин. Найбільший розмір кристалів спостерігається при процесах рекристалізації та відтаюванні препарату. Процеси кристалізації проходять в тім же діапазоні температур що й при кріоконсервуванні суспензії клітин. Таким чином експланти також можливо кріоконсервувати, застосовуючи холодильне обладнання.

Актуальною біотехнологічною задачею є виділення клітин з кріоконсервованих тканин. У купі з можливістю кріоконсервування тканин на базі лікувальних закладів та станцій переливання крові це дозволяє спростити процес отримання стовбурових клітин з похідних плаценти. В іншому випадку для отримання клітин необхідна термінова доставка плаценти в лабораторію протягом 1-3 годин. Оскільки пологи можуть проходити в будь-який час такий технологічний процес потребує по-перше наявності лабораторії поблизу пологового будинку, по-друге цілодобового чергування кур'єрів та лаборантів. Кріоконсервування експлантів плаценти з наступним виділенням клітин з деконсервованого матеріалу дозволило б значно спростити процес та зробити його доступнішим для пологових будинків, віддалених від центральних лабораторій.

В наступній частині роботи проводили виділення клітин з нативних та кріоконсервованих експлантів плаценти. Відмічено, що кількість клітин, що виділялися скоротилося в 5-10 разів у порівнянні з нативною тканиною, що потребує подальшого вдосконалення методів виділення клітин з деконсервованого матеріалу. Точно підрахувати кількість клітин, що виділялися з грама тканини технічно було неможливо у зв'язку з великими розбіжностями при виділенні клітин від різних донорів. Однак, во всіх випадках вдавалося отримати достатню кількість клітин для їх характеристики та фенотипування. За культуральними та антигенними характеристиками клітин не відрізнялися від нативних (рис. 3.41).

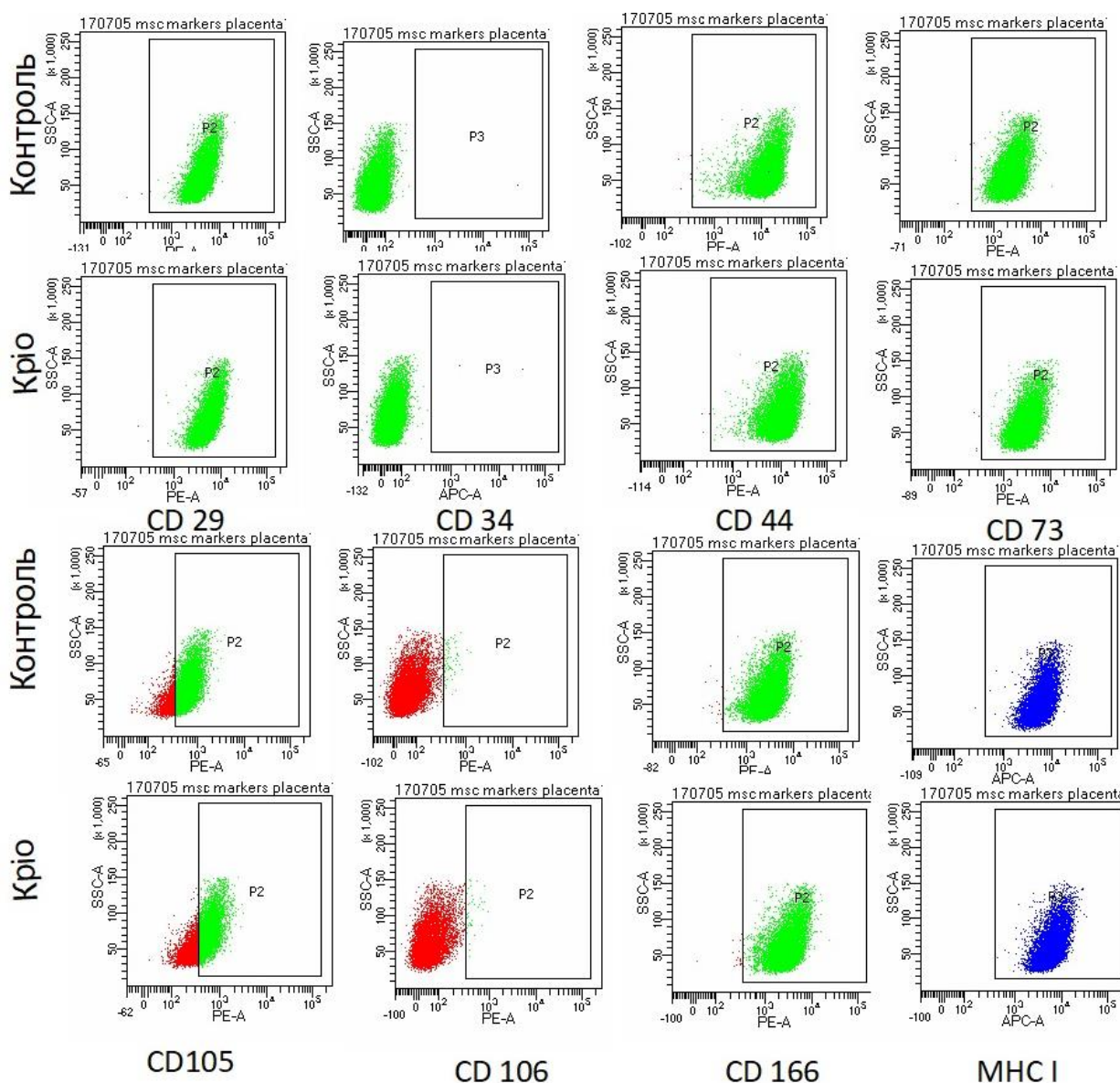


Рис. 3.41. Результати фенотипування первинної клітинної культури, отриманої з нативних та кріоконсервованих експлантів плаценти.

Таким чином, кріоконсервування за запропонованою методикою дозволяє зберегти в значній мірі експланти плаценти, найбільш універсальними методами оцінки функціональної збереженості експлантів, як об'єктів низькотемпературного банку, є МТТ тест, тест на відновлення резазурину і поглинання глюкози з середовища культивування. Дослідження активності ферментів не дає достовірних результатів, що узгоджується з даними літератури. При кріоконсервуванні ворсини пошкоджуються на в більшому ступеню на етапі відігрівання, коли при рекристалізації

пошкоджується мезенхіма. При виділенні клітин з деконсервованого матеріалу популяція клітин зберігає свою культуральні та антигенні властивості, але кількість клітин значно зменшується, що також говорить про кріоушкодження.

3.3. Дослідження впливу факторів кріоконсервування, субнормотермічного та гіпотермічного зберігання на сфероїди з клітин плаценти

При отриманні сфероїдів методом висячої краплі з 1×10^6 клітин отримано близько $825,3 \pm 56,2$ сфероїдів розміром 50-150 мкм та $62,3 \pm 5,1$ сфероїдів розміром 150-300 мкм, які мають округлу чи сферичну форму, не забарвлювалися трипановим синім (рис. 3.42).

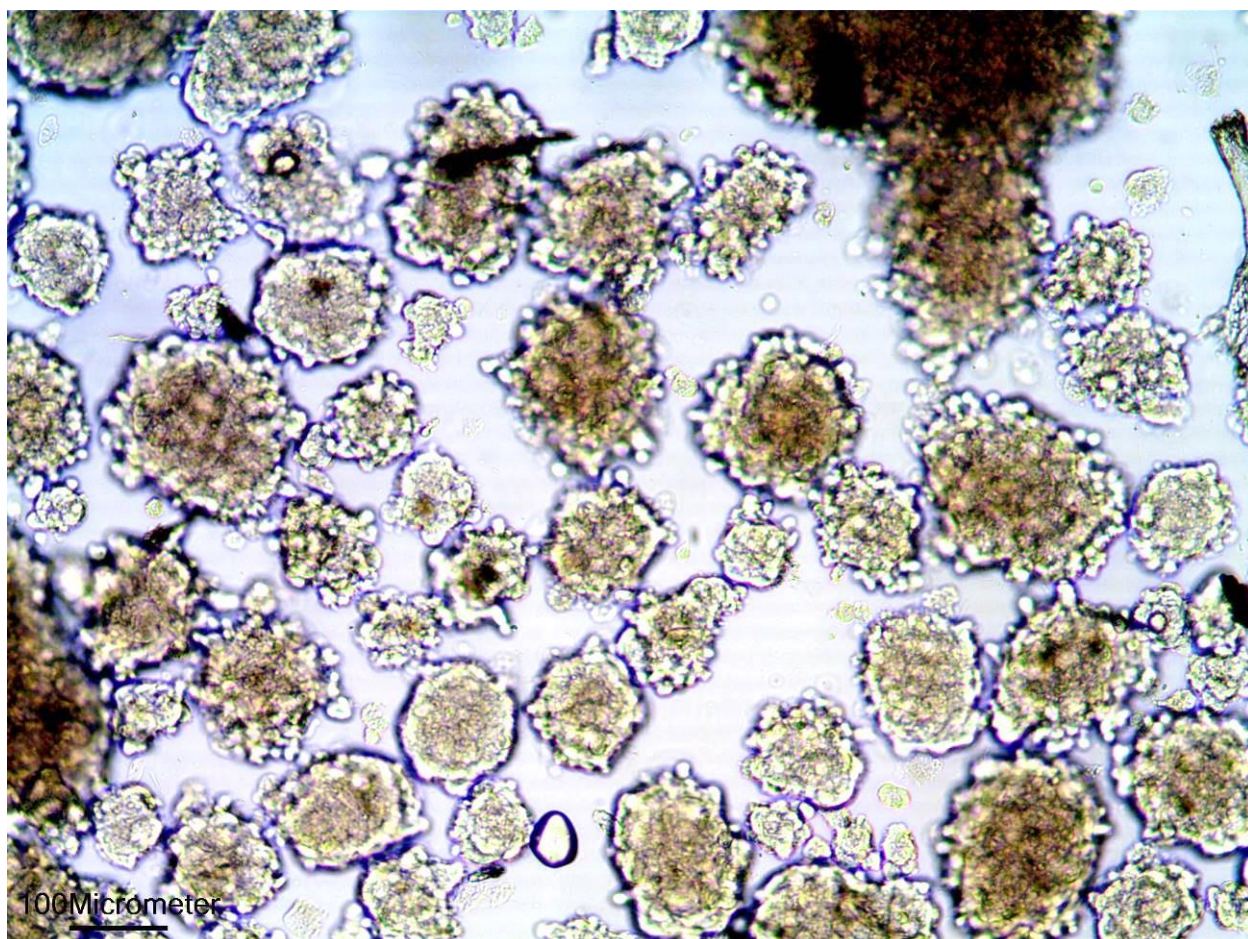


Рис. 3.42. Сфероїди з плацентарних клітин після отримання. Масштабна лінійка 100 мкм.

При переміщення на адгезивний культуральний посуд сфероїди адгезували та формували моношар (рис. 3.42, А). При проведенні реакції МТТ життєздатні сфероїди забарвлювалися формазаном, але візуалізувати окремі клітини для оцінки їх життєздатності за описаним в літературі для альгінатних мікросфер з клітинами [238] не вдавалося (рис. 3.42, Б). Життєздатні сфероїди також забарвлювалися нейтральним червоним (рис. 3.42, В). Трипановий синій забарвлював не життєздатні сфероїди, при цьому з загибеллю клітин змінювалися їх адгезивні властивості (рис. 3.42, Г). Зв'язки між клітинами не були дуже сильними: сфероїди зберігали цілісність при концентрації методом змивання та осаджування, але при відмивці центрифугуванням з ресуспензуванням починали руйнуватися.

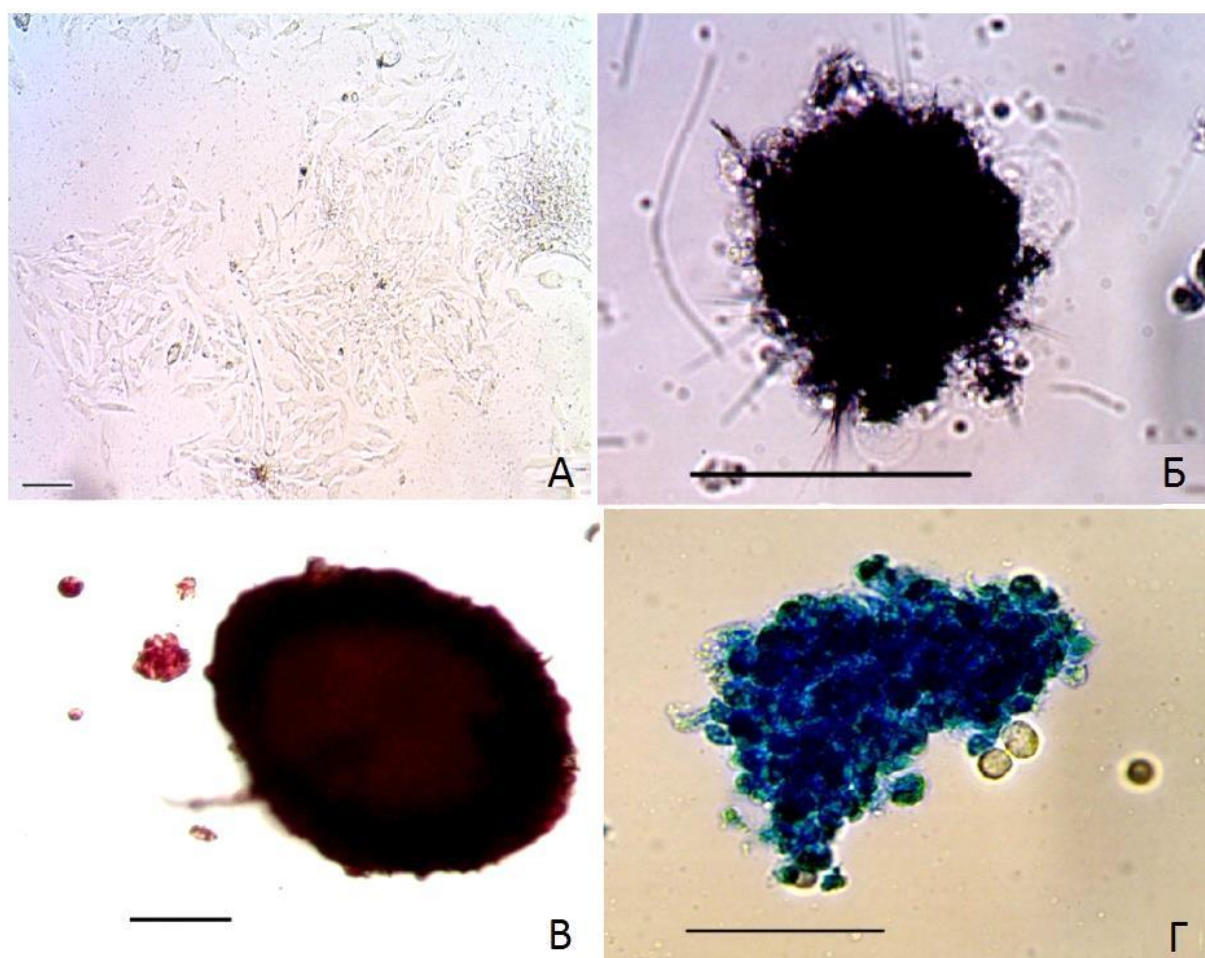


Рис. 3.42. Сфероїди з плацентарних клітин. А – адгезія на культуральному посуді, Б – забарвлення МТТ, В – забарвлення нейтральним червоним, Г – забарвлення трипановим синім. Масштабна лінійка 100 мкм.

При субнормотермічному зберіганні сфероїдів протягом однієї доби їх кількість вірогідно не відрізнялась від контролю, показники МТТ тесту та тесту відновлення резазурину також були в межах контрольних значень (табл. 3.11.). При морфологічних дослідженнях виявлено, що сфероїди частково змінювали форму, на їх поверхні виділялися окремі клітини, що можна трактувати, як зниження міжклітинної адгезії, цитоплазма ставали більш гранулярною (рис. 3.43.).

Таблиця 3.11

Характеристика сфероїдів з клітин плаценти після короткочасного зберігання при субнормотермічних умовах + 20°C (M±m)

	Кількість сфероїдів	МТТ тест (Од ОЩ)	Тест відновлення резазурину (% зменшення абсорбції)
Контроль	862,2±32,5	2,0±0,05	62,3±3,5
24 год	725,8±28,3	2,1±0,08	57,8±4,3
48 год	545,3±17,2*	1,8±0,03*	55,4±2,9*
72 год	458,6±20,9*	1,2±0,12*	39,5±3,8*
96 год	332,1±18,2*	1,0±0,07*	18,7±1,7*

Примітка: *- вірогідність різниць з контролем $p < 0,05$.

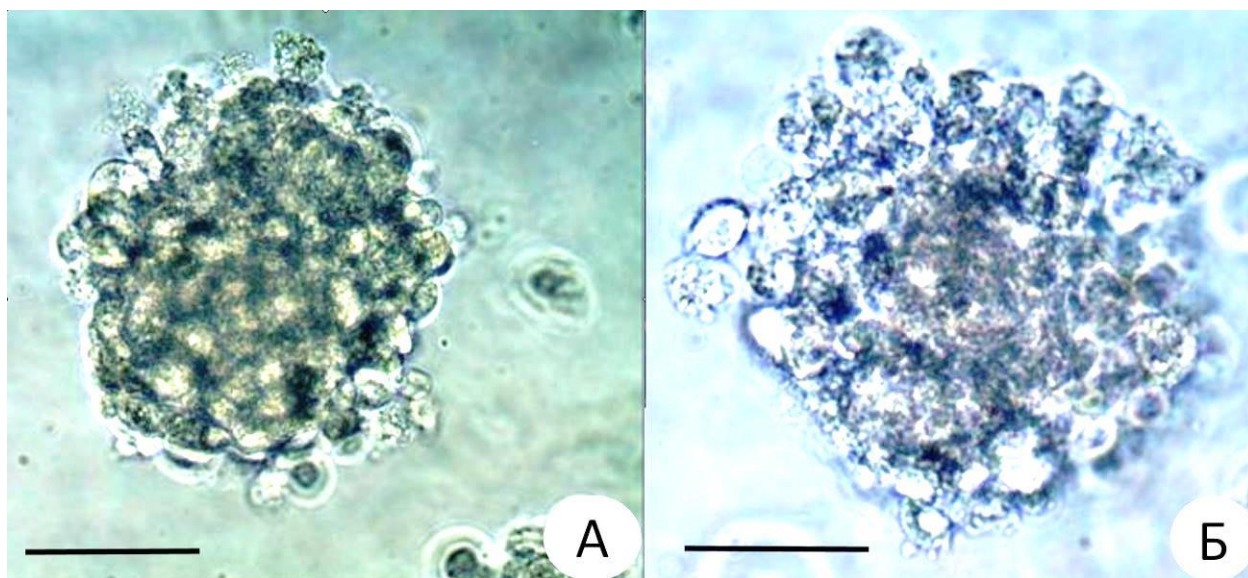


Рис. 3.43. Сфероїди з плацентарних клітин після субнормотермічного зберігання. А – 24 години, Б – 48 годин. Масштабна лінійка 50 мкм.

При подальшому зберіганні сфероїдів в субнормотермічних умовах їх кількість вірогідно знижувалась, показники метаболічної активності

знижувались двократно (табл. 3.11.). При морфологічному дослідженні клітини відокремлювались від сфероїдів, цитоплазма була більш вакуолізована, аморфна (рис. 3.43.).

При гіпотермічному зберіганні сфероїдів їх кількість та метаболічна активність вірогідно зменшувались вже після 24 годин зберігання, зміни швидко прогресували з кожною добою (табл. 3.12).

Таблиця 3.12

Характеристика сфероїдів з клітин плаценти після короткочасного зберігання при гіпотермічних умовах + 4°C (M±m)

	Кількість сфероїдів	МТТ тест (Од ОЩ)	Тест відновлення резазурину (% зменшення абсорбції)
Контроль	862,2±32,5	2,0±0,05	62,3±3,5
24 год	550,9±26,7*	1,8±0,09*	52,1±4,1*
48 год	423,6±17,6*	1,3±0,07*	30,9±2,1*
72 год	259,8±10,2*	0,6±0,06*	24,6±1,9*

Примітка: *- вірогідність різниць з контролем $p < 0,05$.

При морфологічному дослідженні клітини значно втрачали адгезію вже через 24 години, через 48 годин змінювалась структура цитоплазми за рахунок вакуолізації (рис. 3.44.).

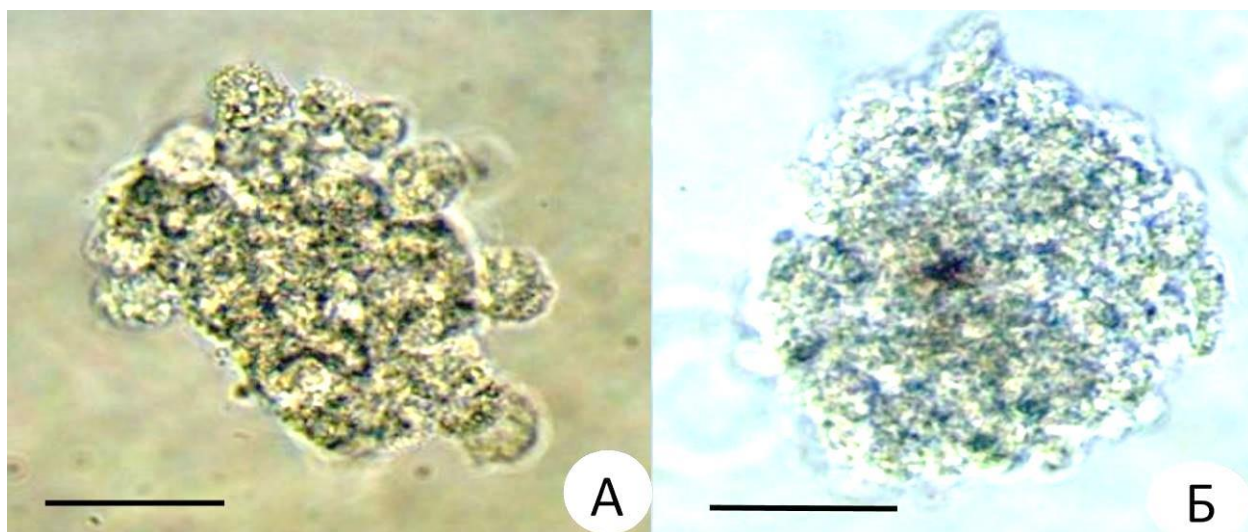


Рис. 3.44. Сфероїди з плацентарних клітин після гіпотермічного зберігання. А – 24 години зберігання, Б – 48 годин зберігання. Масштабна лінійка 50 мкм.

Після *кріоконсервування* за запропонованим протоколом спостерігали руйнування більшості сфероїдів (рис 3.45, А), велику кількість поодиноких клітин, при цьому сфероїди втрачали форму, окремі клітини розташовувалися на поверхні сфероїдів, що зберігалися, але вони не розпластувалися, а мали сферичну форму, з чого можна зробити висновок про розриви міжклітинних контактів та зменшення адгезивних властивостей (рис 3.46).

При оцінці метаболічної активності методами МТТ тесту (рис. 3.45, Б) та тесту відновлення резазурину (рис. 3.45, В), виявлено, що метаболічна активність клітин сфероїдів до та після кріоконсервування мало відрізняється. Клітини при цьому не забарвлюються трипановим синім та забарвлюються трипановим синім та мають здатність утворювати формаган при взаємодії з МТТ. Таким чином після кріоконсервування окремі сфероїди руйнуються, розділяються на клітини, але клітини в більшості залишаються життєздатними. Порушення структури, одночасно зі збереженням метаболічних показників також можна пояснити активізацією метаболізму життєздатних клітин після критичного впливу, яким є кріоконсервування.

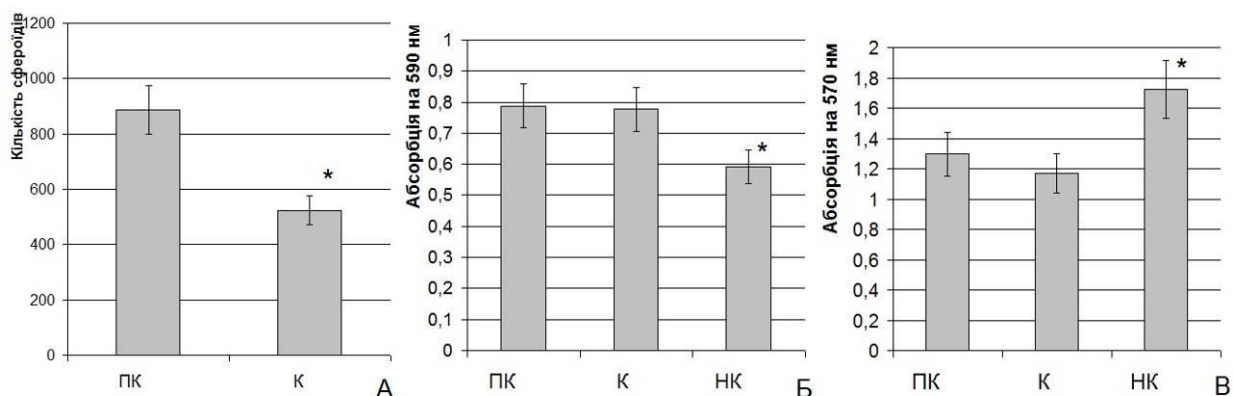


Рис. 3.45. Сфероїди з плацентарних клітин після кріоконсервування. А – кількість сфероїдів, Б – МТТ тест, В – тест відновлення резазурину. ПК – позитивний контроль, НК – негативний контроль, К – кріоконсервування. Примітка: *- вірогідність різниць з контролем $p < 0,05$. Масштабна лінійка 100 мкм.

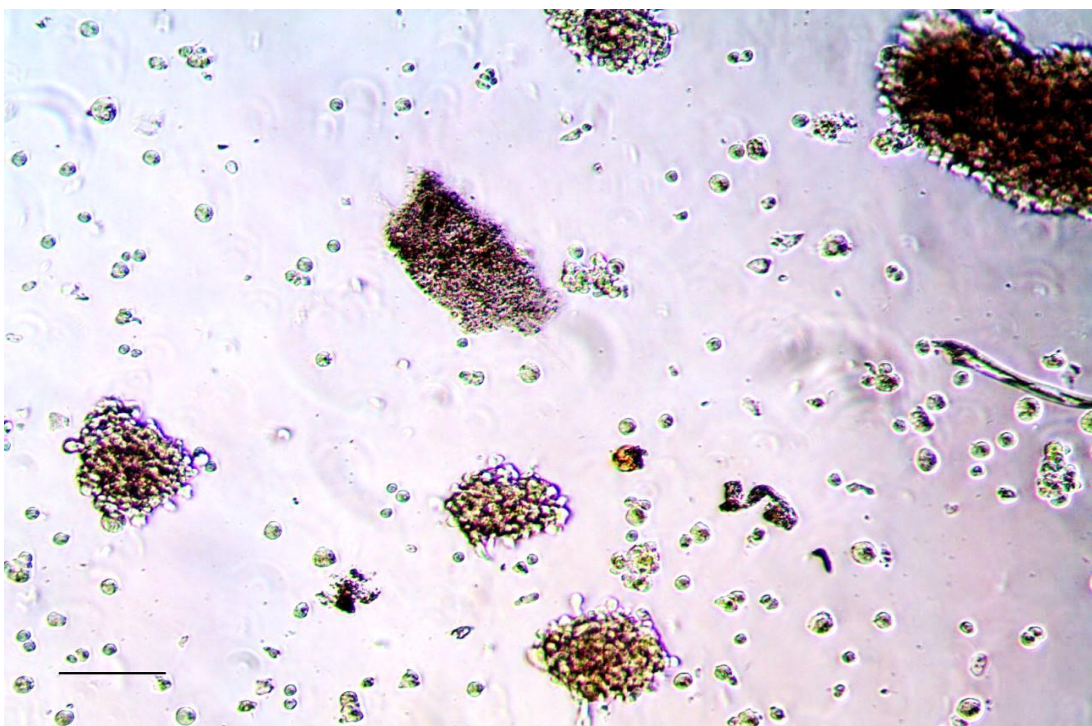


Рис. 3.46. Сфероїди з плацентарних клітин після кріоконсервування. Фазовий контраст. Масштабна лінійка 100 мкм.

Конфокальна мікроскопія нативних препаратів сфероїдів продемонструвала забарвлення FDA та цілісність клітин, поодинокі клітини забарвлені EB (рис 3.47, А). В негативному контролі спостерігали загибель клітин та повну відсутність FDA в зразку (рис 3.47, Б). Після кріоконсервування спостерігали руйнацію сфероїдів та значне збільшення кількості клітин, забарвлених EB – близько $28,3 \pm 3,8\%$ (рис 3.47, В), особливо на поверхні сфероїдів.

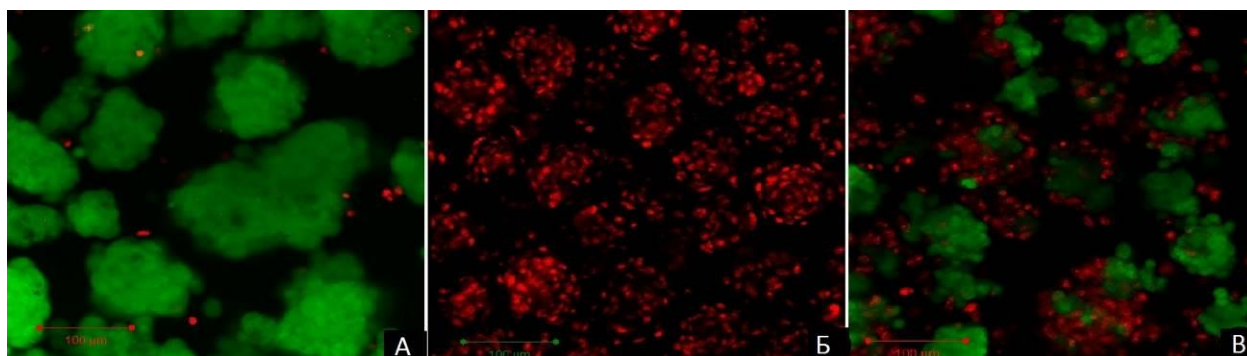


Рис. 3.47. Сфероїди плаценти при кріоконсервуванні. А – нативні, Б – негативний контроль, В – після кріоконсервування. Забарвлення FDA та EB, масштабні лінійки 100 мкм.

При проведенні кріомікроскопічного дослідження (рис. 3.48) при температурі -14°C спостерігали початок кристалоутворення, при цьому в товщі сфероїду та на його поверхні спостерігали кристали менші за розміром, ніж в оточуючій рідині. Процеси кристалізації продовжувалися при зниженні температури до -40°C , при цьому в сфероїдах та на їх поверхнях кристали були значно менші - $5,2 \pm 1,5$, ніж в середовищі.

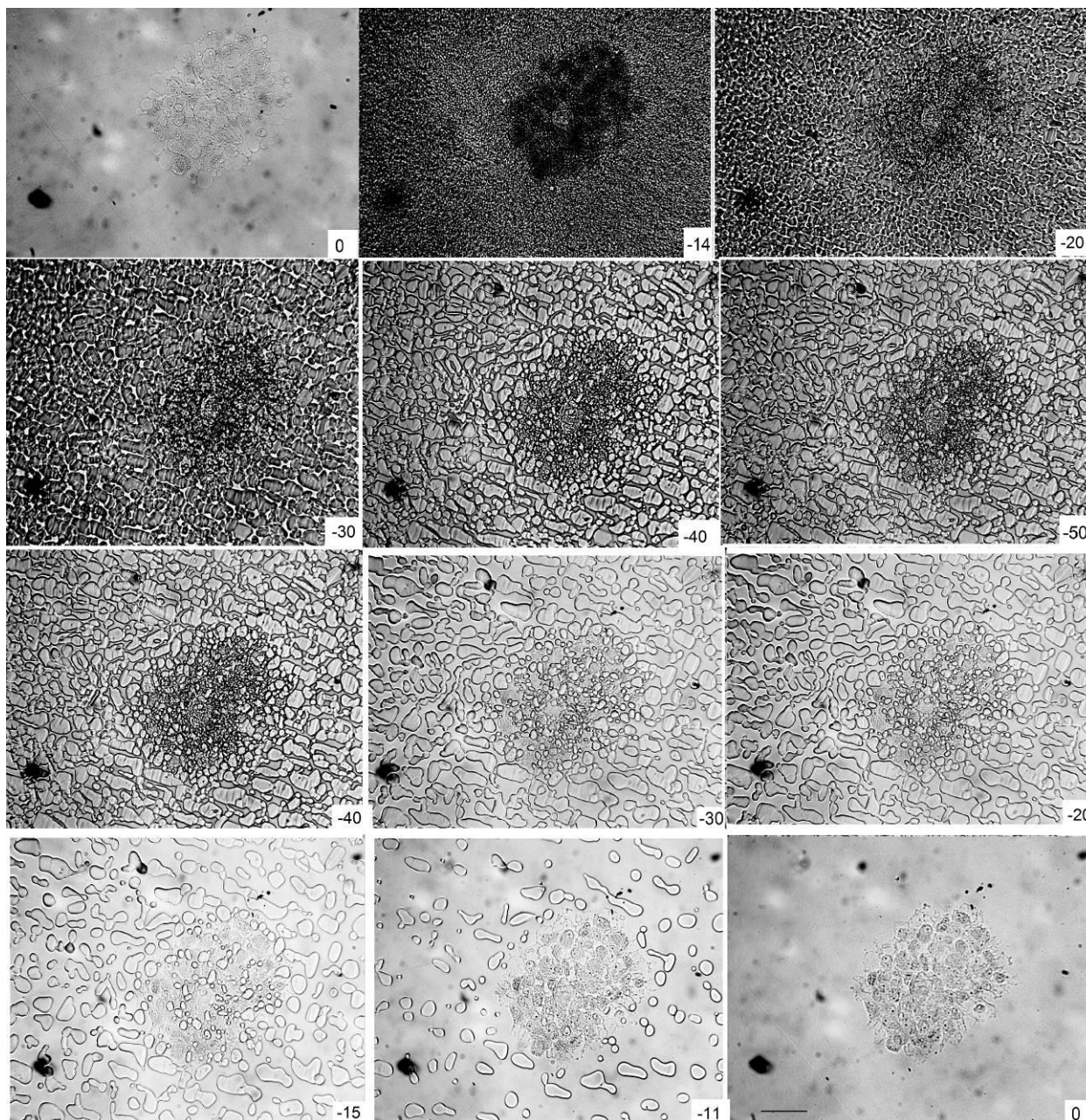


Рис. 3.48. Сфероїди з клітин плаценти при кріоконсервуванні, кріомікроскопічне дослідження. Верхні два рядки відображають процеси заморожування, нижні – відтаювання. Температура позначена на кожному рисунку в $^{\circ}\text{C}$. Масштабна лінійка 50 мкм.

При відігріванні зразка плавління починалося з температури близько -40°C та продовжувалося до -7°C . З -30°C спостерігали виражені процеси рекристалізації, особливо на поверхні та в середині сфероїдів. Максимальні розміри кристалів в сфероїдах спостерігали при температурах -20 - -15°C . Так на початку плавління середній розмір кристалів в сфероїдах дорівнював $5,2 \pm 1,5$ мкм, а після нього – $10,9 \pm 4,0$ мкм. Після розморожування структура сфероїдів значно змінювалася, спостерігали деформацію клітин, розриви мембран та підвищення гранулярності окремих клітин, особливо на поверхні сфероїдів. Ці поверхні клітини частіше гинуть за даними конфокальної мікроскопії. Клітини в середині сфероїдів є більш збереженими.

Оскільки цілісність сфероїдів підтримується за рахунок адгезії та міжклітинних взаємодій вивчали вплив не тільки кристалів льоду, а й ДМСО на клітинну адгезію. Для цього культивували культуру клітин плаценти (рис 3.49, А) в присутності 5% та 10% ДМСО. Через добу культивування клітини в присутності 5% ДМСО втрачали адгезивні властивості, (рис 3.49, Б), а в присутності 10% через добу повністю відшаровувалися (рис 3.49, В).

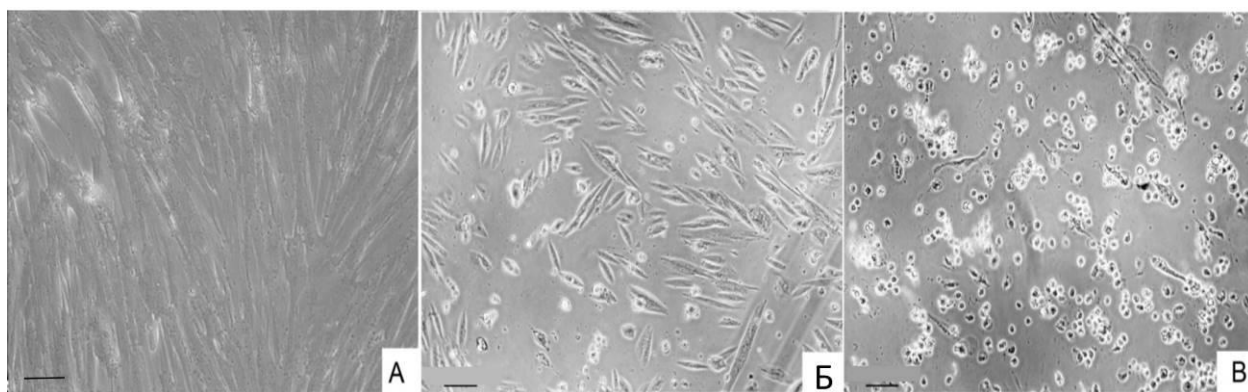


Рис. 3.49. культивування клітин плаценти в присутності ДМСО. А – культура в звичайних умовах, Б – культура з додаванням 5% ДМСО, В – культура з додаванням 10% ДМСО. Масштабна лінійка 100 мкм.

Таким чином, після проведеного дослідження можна сказати, що з клітин плаценти утворюються сфероїди методом висячої краплі. Але зв'язки

між клітинами не є міцними та руйнуються при відмиванні, ресуспензуванні та при дії факторів кріоконсервування. При кріоконсервуванні клітин плаценти в складі сфероїдів спостерігається руйнування як структури сфероїдів, так і окремих клітин. Більше руйнуються клітини, розташовані по периферії сфероїдів. Механізмом цього руйнування є по-перше формування кристалів льоду по периферії сфероїдів та в центрі, по друге – негативний вплив ДМСО на клітинну адгезію. Неоднакове руйнування клітин в різних частинах сфероїду свідчить про те, що клітини в них знаходяться в різних умовах.

3.4. Дослідження впливу факторів кріоконсервування, субнормотермічного та гіпотермічного зберігання на клітини плаценти в альгінатних сферах

При полімеризації розчину альгінату натрію з клітинами плаценти в концентрації 10^6 /мл в розчині хлористого кальцію отримані альгінатні мікросфери діаметром 1,5 – 2,0 мм з клітинами плаценти, які знаходилися в окремих комірцях, рівномірно розподілені по мікросферам (рис. 3.50, А).

При формуванні альгінатних плівок для кріомікроскопічного дослідження альгінат полімеризували в плавках товщиною до 1 мм, з рівномірним розподілом клітин (рис. 3.50, Б).

Для оцінки життєздатності клітини в альгінатних мікросферах заохарлювали нейтральним червоним, трипановим синім, FDA/EB, проводили реакцію МТТ (рис. 3.50, В-Е). Клітини забарвлюються вищезгаданими барвниками відповідно до життєздатності так, як і клітини, не заключені в мікросфери, але маються деякі особливості. Підрахування клітин, забарвлених трипановим синім або нейтральним червоним ускладнюється насамперед тим, що клітини, які не знаходяться в фокусі мікроскопу сприймаються, як незабарвлені. Ця проблема невілюється застосуванням конфокальної мікроскопії з забарвленням FDA/ED, або забарвленням формазаном, який є більш контрастним.

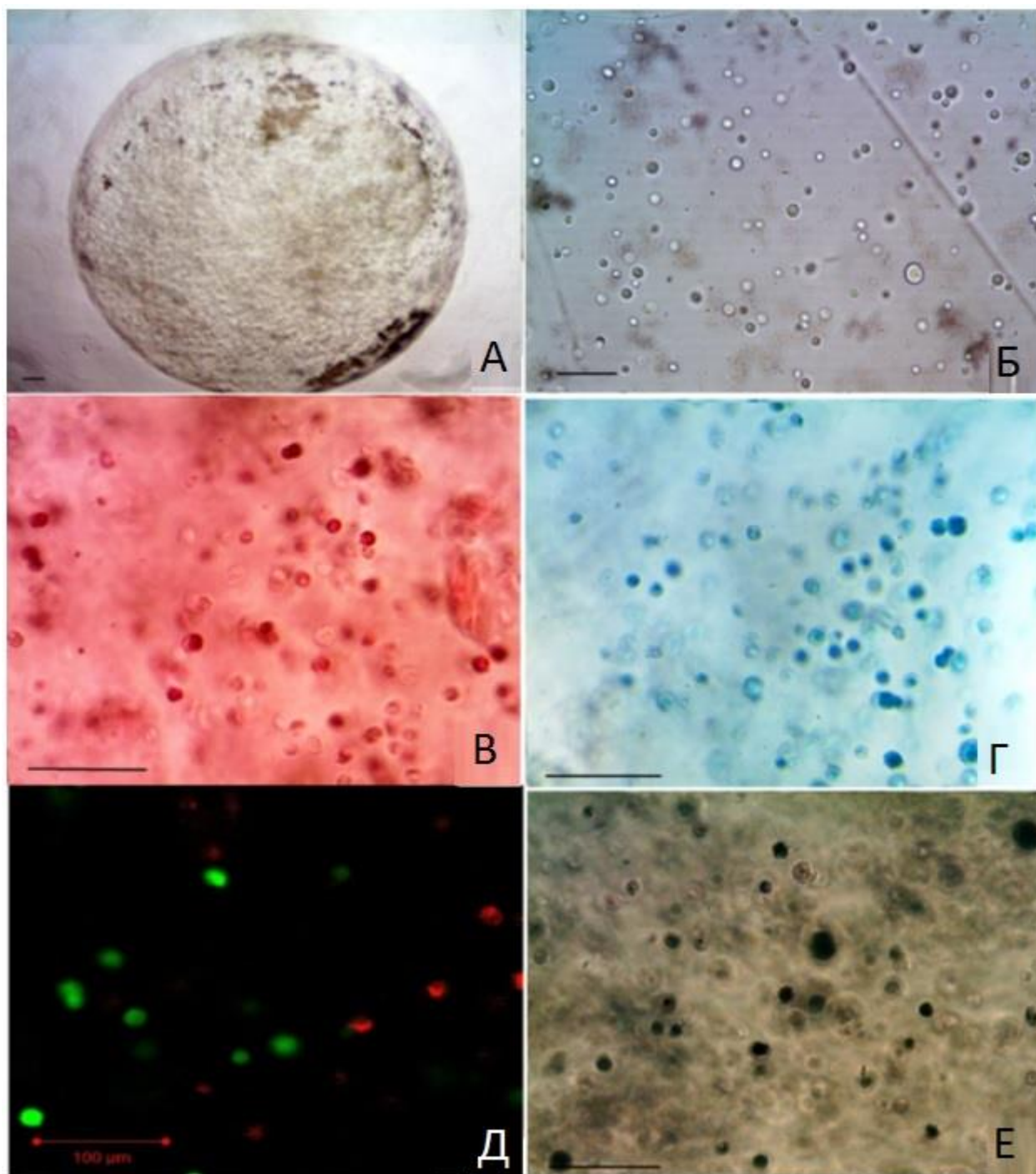


Рис. 3.50. Клітини плаценти в альгінатних сферах. А – загальний вид, Б – клітини в комірках альгінату при збільшенні, В – забарвлення нейтральним червоним, Г – забарвлення трипановим синім, Д – конфокальна мікроскопія з FDA/EB, Е – формаган в клітинах після проведення МТТ тесту. Масштабна лінійка 100 мкм.

При субнормотермічному зберіганні альгінатних мікросфер з клітинами плаценти було виявлено, що значне зниження показників

метаболическої активності знижується з 72 годин зберігання. Морфологічної різниці при дослідженні мікросфер, що зберігали при субнормотермічних умовах не виявлено (табл. 3.13.).

Таблиця 3.13

Характеристика клітин плаценти в альгінатних мікросферах після зберігання при субнормотермічних (+ 20°C) умовах (M±m)

	Тест відновлення резазурину (% зменшення абсорбції)	Тест споживання глюкози (мМоль/л)
Контроль	53,2±2,8	1,8±0,12
24 год	50,6±3,2	1,7±0,25
48 год	48,3±2,5	2,1±0,18
72 год	32,5±4,1*	2,4±0,16*
96 год	13,9±3,4*	2,5±0,08*

Примітка: *- вірогідність різниць з контролем $p < 0,05$.

При гіпотермічному зберіганні метаболічна активність вірогідно знижувалася вже після 48 годин зберігання (табл. 3.14). Відсутність морфологічних змін пов'язували з тим, що клітини знаходяться в окремих комірках та важко доступні для візуалізації.

Таблиця 3.14

Характеристика клітин плаценти в альгінатних мікросферах після зберігання при гіпотермічних (+ 4°C) умовах (M±m)

	Тест відновлення резазурину (% зменшення абсорбції)	Тест споживання глюкози (мМоль/л)
Контроль	53,2±2,8	1,8±0,12
24 год	47,3±2,4	2,0±1,5
48 год	30,2±3,8*	2,3±0,10*
72 год	12,9±2,1*	2,5±0,07*

Примітка: *- вірогідність різниць з контролем $p < 0,05$.

Після кріоконсервування за запропонованою програмою виявлено, що за тестом відновлення резазурину клітини плаценти в альгінатних мікросферах вірогідно не відрізняються від позитивного контролю, але відрізняються від негативного контролю (рис. 3.51, А). При цьому різниця

між позитивним та негативним контролем менша, ніж при дослідженні тесту відновлення резазурину для клітин, сфероїдів та експлантів, що може бути результатом погіршення дифузії через альгінат, чи зниження метаболізму. При дослідженні метаболічної активності методом МТТ тесту забарвлюються окремі клітини, але екстрагувати формаган з альгінатних мікросфер за допомогою ДМСО чи етанолу не вдається, тому данне дослідження в цьому випадку малоінформативне. При дослідженні життєздатності методом забарвлення FDA/EB виявлено, що після кріоконсервування життєздатність вірогідно падає порівняно з позитивним контролем на 20%, але значно вища, ніж в негативному контролі (рис. 3.51, Б, рис. 3.52), що співпадає з даними літератури [238].

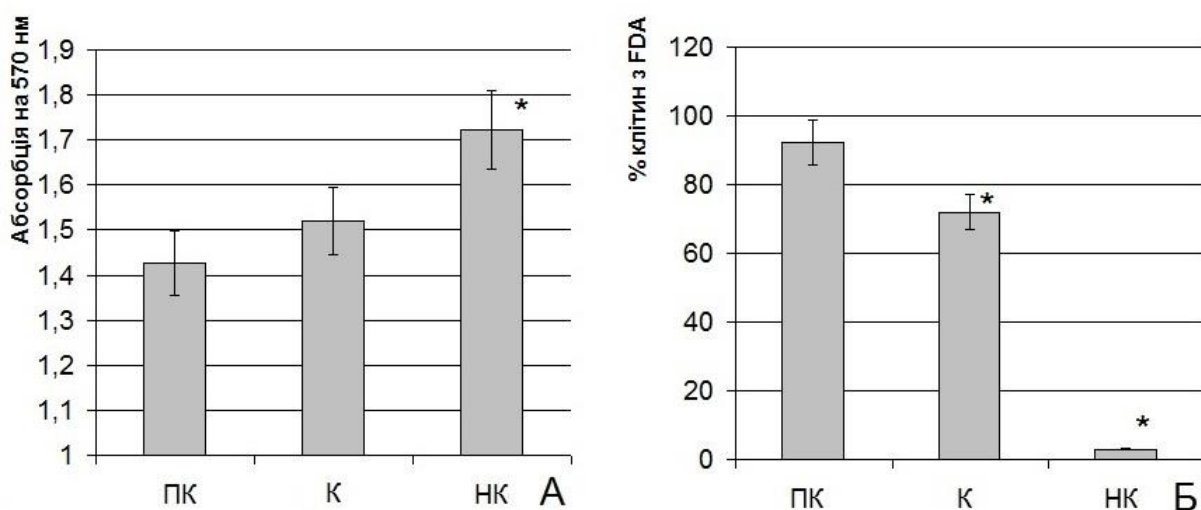


Рис. 3.51. Характеристика клітин плаценти в альгінатних мікросферах після кріоконсервування. А – тест відновлення резазурину, Б – забарвлення FDA. ПК – позитивний контроль, НК – негативний контроль, К – кріоконсервування.

Кріомікроскопічне дослідження альгінатних препаратів (рис. 3.53) продемонструвало, що при охолодженні до -10°C спостерігали початок кристалоутворення, після якого починалися явища кристалізації, з формуванням великих кристалів, процес закінчувався при температурі близько -30°C , вся площа препарату, що досліджувалася поділялася на зони з

великими кристалами розміром до $137,9 \pm 42,2$ мкм, що займали до 75 % площі та з малими кристалами, розміром до $2,6 \pm 0,38$ мкм. Плавлення починалося з температури близько -30°C , при -20°C повністю зникає лід з зон з малими кристалами. Повне плавлення спостерігається при -7°C . При порівнянні незабарвлених клітин до та після кріоконсервування найбільш ушкодженими були клітини, що залишалися на границі великих кристалів. В них спостерігали розриви, зміни розміру або скопичення детриту в комірках, що утворив альгінат. Клітини, що розташовувалися у центрі зон не мали візуальних змін.

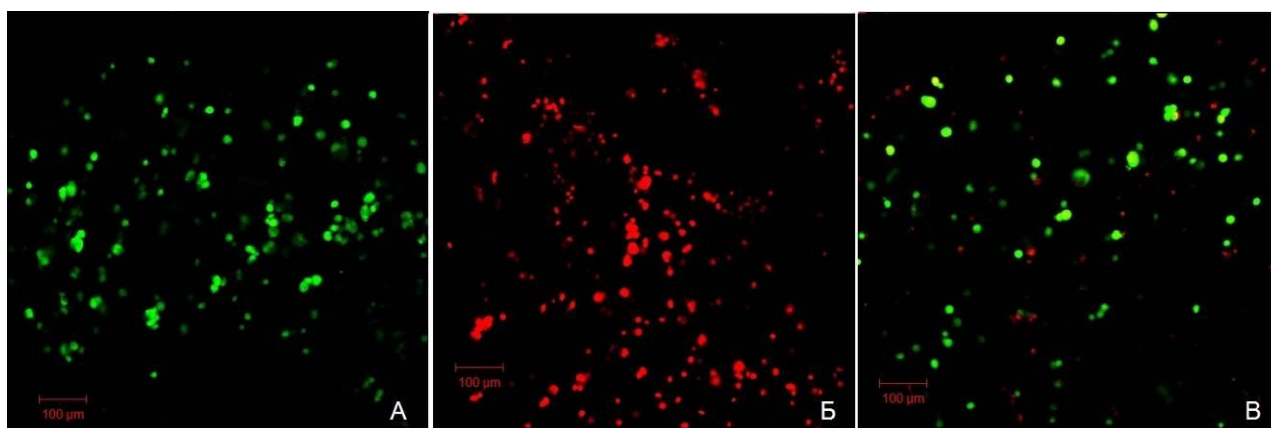


Рис. 3.52. Альгінатні мікросфери з клітинами плаценти при кріоконсервуванні. А – нативні, Б – негативний контроль, В – після кріоконсервування. Забарвлення FDA та EB, масштабні лінійки 100 мкм.

Для визначення причин появи двох різних типів кристалоутворення в альгінатних плівках було проведено кріомікроскопічне дослідження альгінатної плівки з середовищем кріоконсервування без диметилсульфоксиду (рис. 3.54). При температурі -17°C спостерігали початок кристалоутворення, яке закінчувалося при -19°C , з формуванням кристалів розміром $45,3 \pm 23,2$ мкм. На всій поверхні кристали були однотипні, в деяких місцях спостерігали скопичення газу. Плавлення кристалів починалося при температурі близько -18°C та закінчувалося при -9°C . Після розморожування клітини зменшувалися в розмірах, або їх залишки були представлені детритом у комірках альгінату.

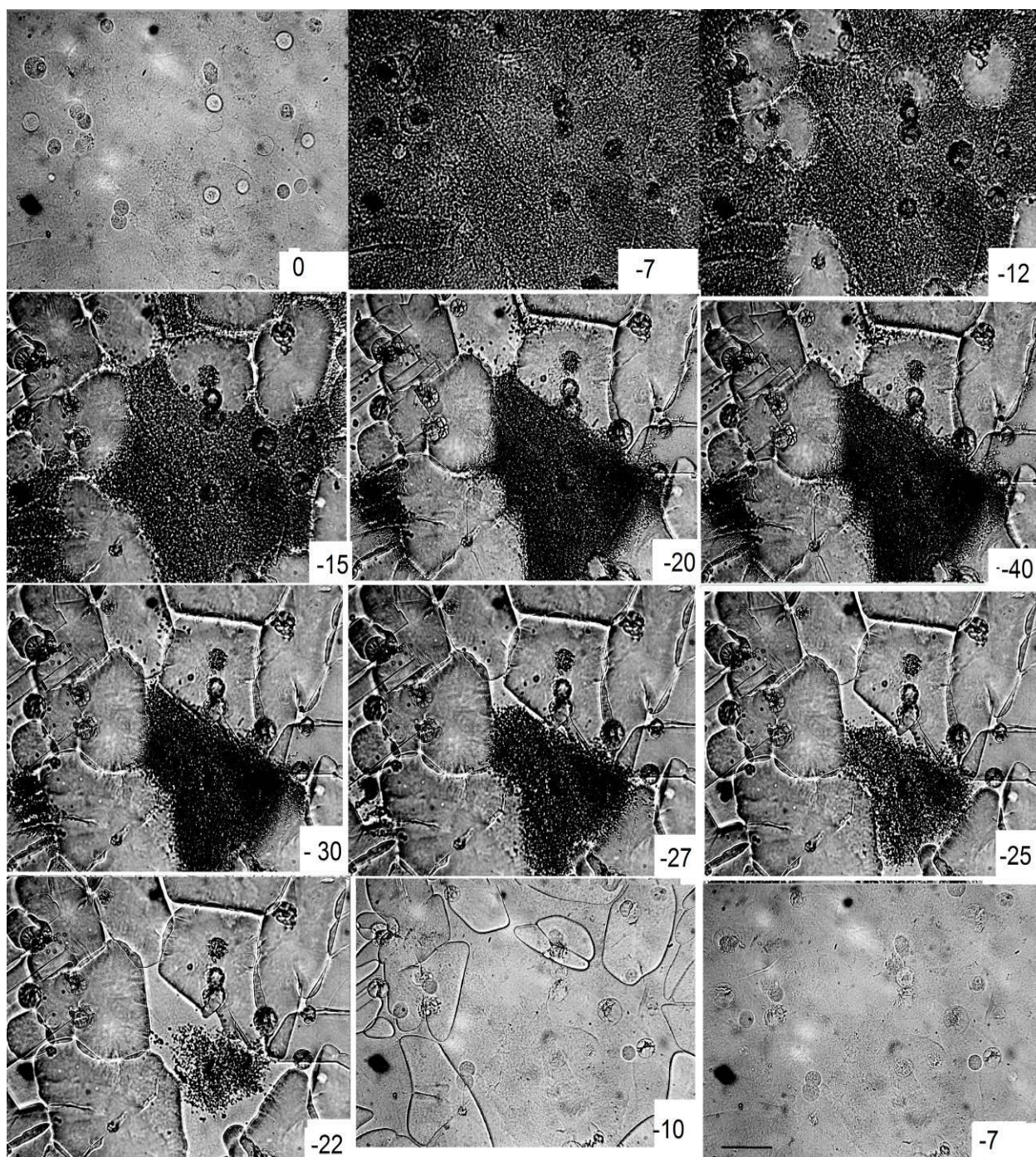


Рис. 3.53. Клітини плаценти в альгінаті при кріоконсервуванні з ДМСО, кріомікроскопічне дослідження. Верхні два рядки відображають процеси заморожування, нижні – відтаювання. Температура позначена на кожному рисунку в °С. Масштабна лінійка 50 мкм.

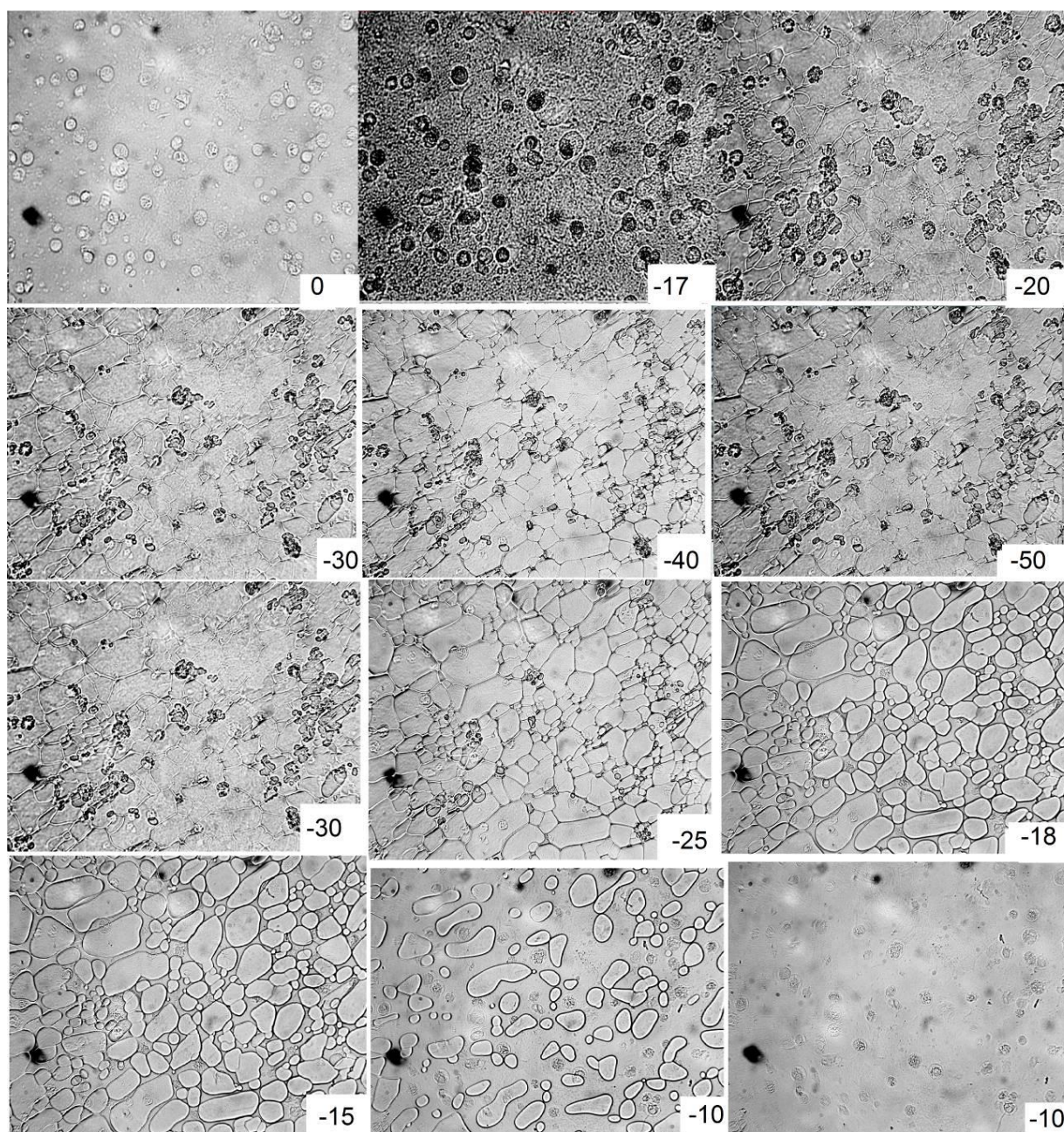


Рис. 3.54. Клітини плаценти в альгінаті при кріоконсервуванні без ДМСО, кріомікроскопічне дослідження. Верхні два рядки відображають процеси заморожування, нижні – відтаювання. Температура позначена на кожному рисунку в °С. Масштабна лінійка 50 мкм.

При додаванні 1% альгінату натрію до розчинів ДМСО виявлено, що ДМСО полімерізує альгінат натрію у концентрації 15 - 100 %, полімерізація не відбувається в присутності розчину Версену. Окрім того розчин Версену має властивості розчиняти сфери альгінату, утворені за допомогою ДМСО.

Враховуючи цю взаємодію альгілату з ДМСО та особливості кристалізації при кріоконсервуванні альгілатів з ДМСО можна зробити припущення, що під час зниження температури відбувається перерозподіл концентрацій ДМСО в різних частинах полімерізованого альгілату та кристалізація за різним типом при різних температурах.

Висновки з розділу

При дослідженні різних похідних плаценти виявлено, що експланти, клітини плаценти в суспензії та в альгілатних мікросферах зберігають структуру, життєздатність та метаболічні характеристики (за даними вітального забарвлення, тестів МТТ та відновлення резазурину) при культивуванні. Сфероїди, отримані з клітин плаценти є нестійкими, мають тенденцію до руйнування та адгезії. Клітини, виділені з ворсин плаценти, плідних оболонок мають характеристики МСК (імунофенотип CD90+, CD73+, CD105+, CD34-, здатні до індукованого диференціювання в адипогенному, хондрогенному та остеогенному напрямку).

При кріоконсервуванні клітин, тканин та штучних плацентарних структур виявлено ряд закономірностей, по яких можна судити про механізми кріоушкодження.

Короткочасне зберігання клітин при температурі 20°C забезпечує збереженість кількості клітин, їх життєздатності та культуральних властивостей протягом 48-и год, в подальшому спостерігається різка втрата як кількості клітин, так і життєздатності, максимальним строком зберігання, при якому можливе відновлення моношару є 72-и год.

При гіпотермічному зберіганні при 4°C-6°C в середовищі культивування без його додаткового модифікування проходить зниження кількості клітин, та їх культуральних властивостей протягом 24-х годин, після цього відновити культуру не вдавалося.

Оптимальними кріопротекторами для кріоконсервування МСК плаценти, що дозволяють зберегти максимальну кількість клітин,

життєздатність, метаболічні та культуральні властивості є ДМСО та пропандіол. При цьому важливим є зберігання йонного складу середовища та кислотно-лужного балансу, в той час, як додавання сироватки значно не впливає на результат кріоконсервування.

При оптимізації складу кріозахистних середовищ згідно вимог GMP можливо кріоконсервування МСК плаценти без середовища культивування при збереженні йонного складу, застосування декстрану чи полівінілпіролідону, які дозволені для клінічного застосування зі зниженням кількості та життєздатності клітин на 20-30%.

При кріоконсервуванні МСК плаценти оптимальним режимом кріоконсервування є охолодження зі швидкістю $1^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ до -40°C з наступним зануренням у рідкий азот, підвищення цієї температури призводить до різкої втрати кількості клітин, та життєздатності, максимальною температурою, що дозволяє відновити культуру перед швидким охолодженням є -30°C . Зниження температури до -80°C не призводить до вірогідних змін.

Повторне заморожування МСК плаценти без рекультивування призводить до втрати 50% кількості клітин та 20% життєздатності.

Кількість клітин, життєздатність, метаболічні показники, та апоптотичні показники МСК плаценти не відрізняються від контролю при коливанні температур в діапазоні -196°C - 100°C не більше 20 разів. При більшій кількості циклів коливань, або коливаннях до -80°C кількість клітин, життєздатність, метаболічні характеристики знижуються, а кількість апоптотичних змін зростає в залежності від кількості коливань температур.

Так при кріоконсервуванні ворсин плаценти, при зниженні температури спостерігається мінімальне кристалоутворення всередині ворсин. Кристали збільшуються при розмороженні, пошкоджуючи мезенхіму. Так розміри кристалів співпадають з розмірами розривів та розширень мезенхіми, виявлених при гістологічних дослідженнях. Кристали, що утворюються в тканині менші за розміром, ніж кристали у середовищі, що оточує клітини. При цьому більшість клітин зберігаються життєздатними,

як за даними конфокальної мікроскопії з забарвленням EB/FDA, так і за при забарвленні нейтральним червоним, трипановим синім, МТТ, тесту відновлення резазуріну та тесту утилізації глюкози. При оцінці барвників більш проникають усередину ворсин FDA та трипановий синій, EB гірше за всі інші. Шляхом до покращення результатів збереження цілісних ворсин є зниження процесів рекристалізації при відігріві. Міжклітинна рідина ворсин та кількість клітин є оптимальними для збереження. Перспективним може бути створення штучних структур зі східними властивостями. Гіпотермічне та субнормотермічне зберігання експлантів плаценти в середовищі культивування можливе протягом 1-2 діб.

При кріоконсервуванні сфероїдів, в яких клітини пов'язані між собою за рахунок міжклітинних зв'язків спостерігаються гірші результати. Найбільше руйнування спостерігається при рекристалізації на етапі відігріву препарату. Сфероїди руйнуються з двох причин. По перше – з причини рекристалізації всередині та на поверхні самого сфероїда. По-друге – під дією ДМСО ослаблюються та втрачаються адгезивні властивості клітин. Ці зміни візуалізуються при конфокальній та світловій мікроскопії: руйнуються як сфероїди, вивільнюючи окремі клітини, так і в меншому ступеню окремі клітини, особливо ті, що локалізуються на поверхні сфероїду. При цьому метаболічні характеристики кріоконсервованих культур сфероїдів в цілому мало відрізняються від характеристик окремих клітин.

Процеси, що виникають при кріоконсервуванні альгінатних мікро сфер з МСК вже досить вивчені [238], окрім кріомікроскопічного дослідження механізмів ушкодження. Отримані нами данні свідчать про неоднорідність льоду у сфероїдах при кріоконсервуванні. Так більшість препарату займають крупні кристали, а меншу частину – невеликі, що починають плавитися при більш низьких температурах. Нами була висловлена гіпотеза про взаємодію альгінату з ДМСО та перерозподіл ДМСО в препараті під час кріоконсервування. Гіпотеза була підтверджена тим, що при кріоконсервуванні альгінатів без ДМСО формування різних фракцій льоду не

відбувалося. Також експериментальним шляхом встановлено, що розчини ДМСО мають властивості полімеризувати альгінат в концентрації вище 15%. При цьому той факт, що отримані альгінатні мікро сфери розчиняються в розчині Версену, та утворення мікро сфер в присутності EDTA неможливо говорить про те, що ДМСО зв'язується з альгінатом нековалентно, як йони кальцію з утворенням хелатів. При кріомікроскопічних дослідженнях видно, що ушкоджуються клітини, що лежать між кристалами та на їх границях – при розморожуванні спостерігаються комірочки, наповнені клітинним вмістом. Попередні дослідження також свідчать про те, що збереженість клітин при культивуванні в мікро носіях нижча, за клітини, кріоконсервовані в суспензії.

Таким чином, найбільш перспективними об'єктами для низькотемпературного банку є клітини плаценти та експланти, які добре зберігаються при кріоконсервуванні та в субнормотермічних та гіпотермічних умовах. Інші представлені об'єкти доцільно формувати з клітин плаценти вже після розморожування.

Розуміння механізмів кріоушкодження цих об'єктів може дозволити моделювати більш стійкі тканинноінженерні структури, які повинні мати деякий простір між клітинами та містити міжклітинну речовину, що не взаємодіє з кріопротектором.

Результати розділу опубліковані в роботах [6, 8, 10, 11, 14, 20, 31, 32, 34-36, 40, 42, 43-46, 51, 52 57, 60-63, 66] додатку А.

РОЗДІЛ 4 ДОСЛІДЖЕННЯ ВЛАСТИВОСТЕЙ НАТИВНИХ ТА КРІОКОНСЕРВОВАНИХ ПОХІДНИХ ПЛАЦЕНТИ В СИСТЕМІ *IN VITRO*

Для всебічного розуміння механізму дії лікарського засобу чи методу лікування необхідно виявити точку впливу, конкретний орган, тканину, клітину на який діє агент, що досліджується. При постановці експерименту на цілому організмі дія може бути непрямую, опосередкованою через регуляторні системи, зміни кровообігу, метаболіти з інших тканин чи клітин. Для вирішення цієї задачі зазвичай застосовуються культуральні методи. При виділенні культури клітин чи тканин можна зрозуміти її реакцію на окремий чинник, невілюючи вплив кровоносної, ендокринної, нервової, імунної системи та інших органів та тканин.

Можливе застосування додавання в середовище окремих речовин, парне сокультивування біологічних об'єктів через напівпроникну мембрану чи культивування одного біооб'єкту в середовищі, кондиційованим іншим. Нами було обрано останній, метод, оскільки на перевагу від сокультивування він дозволяє також застосовувати метаболічні тести. При сокультивуванні МТТ та резазурин вільно проходять через напівпроникну мембрану. В цьому випадку не зрозуміло, який з об'єктів їх відновлює до відповідно формазану чи резазурфіну.

Оскільки жіноча репродуктивна система має п'ять рівнів регуляції (кора мозку, гіпоталамус, гіпофіз, яєчники та матка), а також на перебіг хвороб впливають імунна система та компоненти сполучної тканини було обрано кілька об'єктів. Фібробласти були обрані, як клітини, що формують строму органів, можуть реагувати окремо на фактори, що досліджуються, впливати на паренхіму. Нервові клітини є основою центральної регуляції оваріально-менструального циклу та можуть впливати на жіночу статеву систему опосередковано. У якості елементів імунної системи було обрано культуру спленоцитів, які є однією зі стандартних культур для дослідження реакції імунної системи [69]. Яєчники були досліджені як специфічний

ендокринний орган та орган, що продукує яйцеклітини. Органотипова культура матки була обрана як кінцевий орган-мішень в жіночій репродуктивній системі, що забезпечує розвиток вагітності.

4.1. Дослідження впливу нативних та кріоконсервованих похідних плаценти на культуру фібробластів

Фібробласти є обов'язковим компонентом сполучної тканини та строми кожного органу. Сполучна тканина, заповнює простір між клітинами, які виконують специфічну для органу функцію, впливає на них завдяки паракринним механізмам, забезпечує обмін, трофіку, видалення, синтез колагену, еластину міжклітинної речовини [166]. Відомо, що фібробласти можуть впливати на оваріальні фолкули, стимулюючи їх ріст та розвиток через систему активіну, інгібіну, стероїдні гормони та білки Sx43, Sx37, Sx32 [171]. Роль фібробластів для матки особливо важлива, оскільки значна частина сполучної тканини ендометрію оновлюється після кожного менструального циклу, а під час вагітності та пологів змін структури зазнають не тільки ендометій, що дециалізуються, а й міометрій та периметрій, що ремодулюються. Фібробласти ендометрію регулюють процеси децидуалізації, імплантаційної готовності, місцеві імунні реакції через паракринні та гормональні механізми [227].

Дослідження впливу похідних плаценти на фібробласти необхідно для розуміння як саме реагує той чи інший орган чи система на цей вплив: безпосередньо, чи через елементи сполучної тканини.

Культура фібробластів миші є класичним об'єктом клітинного культивування, який добре виділяється та пересівається, має великий проліферативний індекс та метаболічну активність. Первинна культура клітин фібробластів миші на нульовому пасажі представляла собою поліморфні клітини, які формували окремі колонії з активною проліферацією (рис. 4.1.).

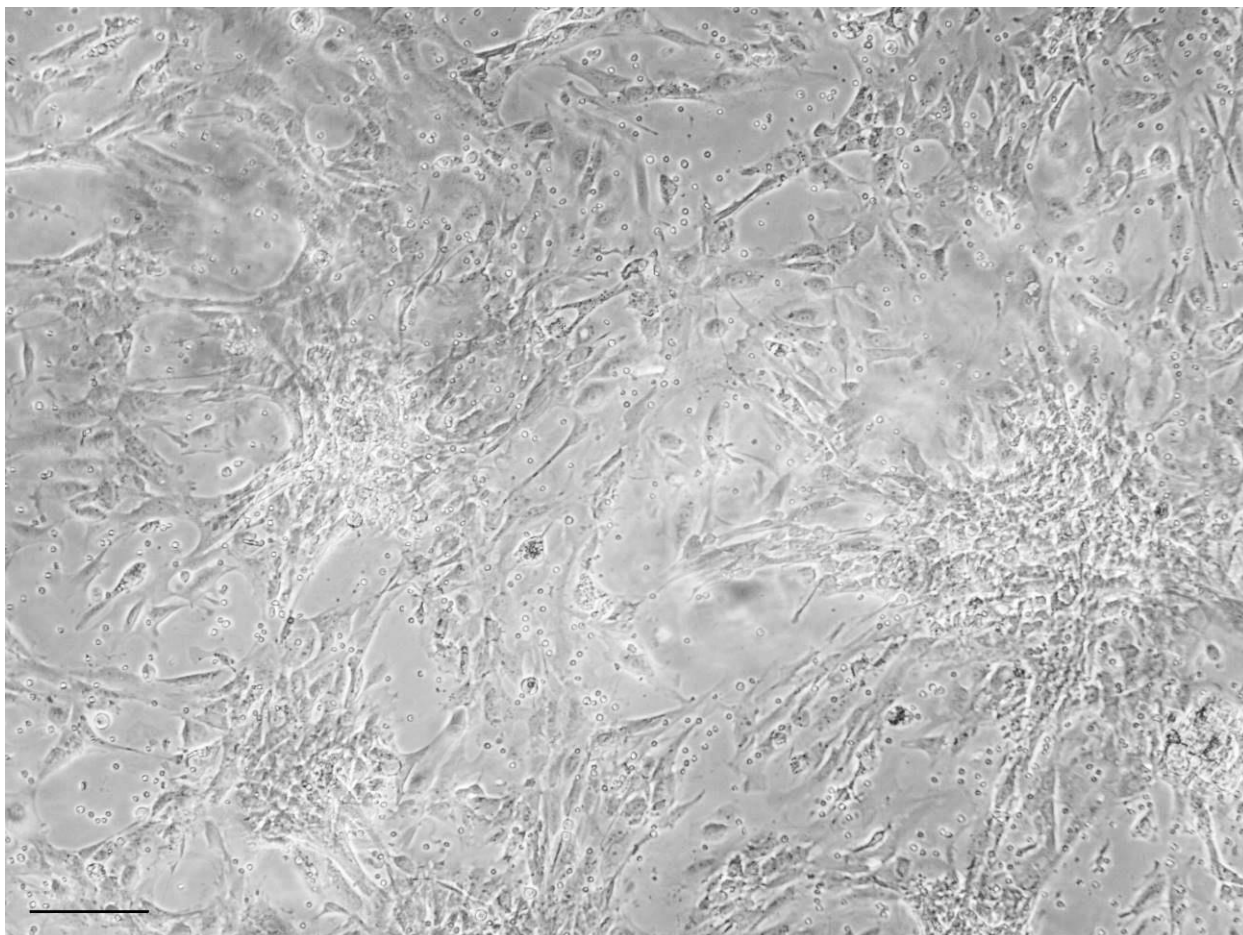


Рис. 4.1. Первинна культура фібробластів миші, пасаж 0. Між клітинами видно окремі еритроцити, які залишились після виділення клітин. Інших неадгезованих клітин немає. Фазовий контраст. Масштабна лінійка 100 мкм.

Більше 90% виділених клітин адгезували до поверхні вже в перші часи після виділення та мали веретеновидну «фібробластоподібну» форму. Окремі клітини мали зіркоподібну чи округлу форму.

На 2 - 3 пасажі всі клітини набували фібробластоподібної морфології та здатності формувати щільний моношар за 2 доби культивування при пасажуванні 1:2, зі початкової щільністю 3×10^4 до 8×10^4 клітин на 1 см^2 культурального посуду (рис. 4.2.). Розмір клітин в суспензії при знятті з поверхні дорівнював близько 15 мкм. Клітин легко знімалися з пластику за допомогою 0,25 % трипсину в розчині Версену та пасажувались.

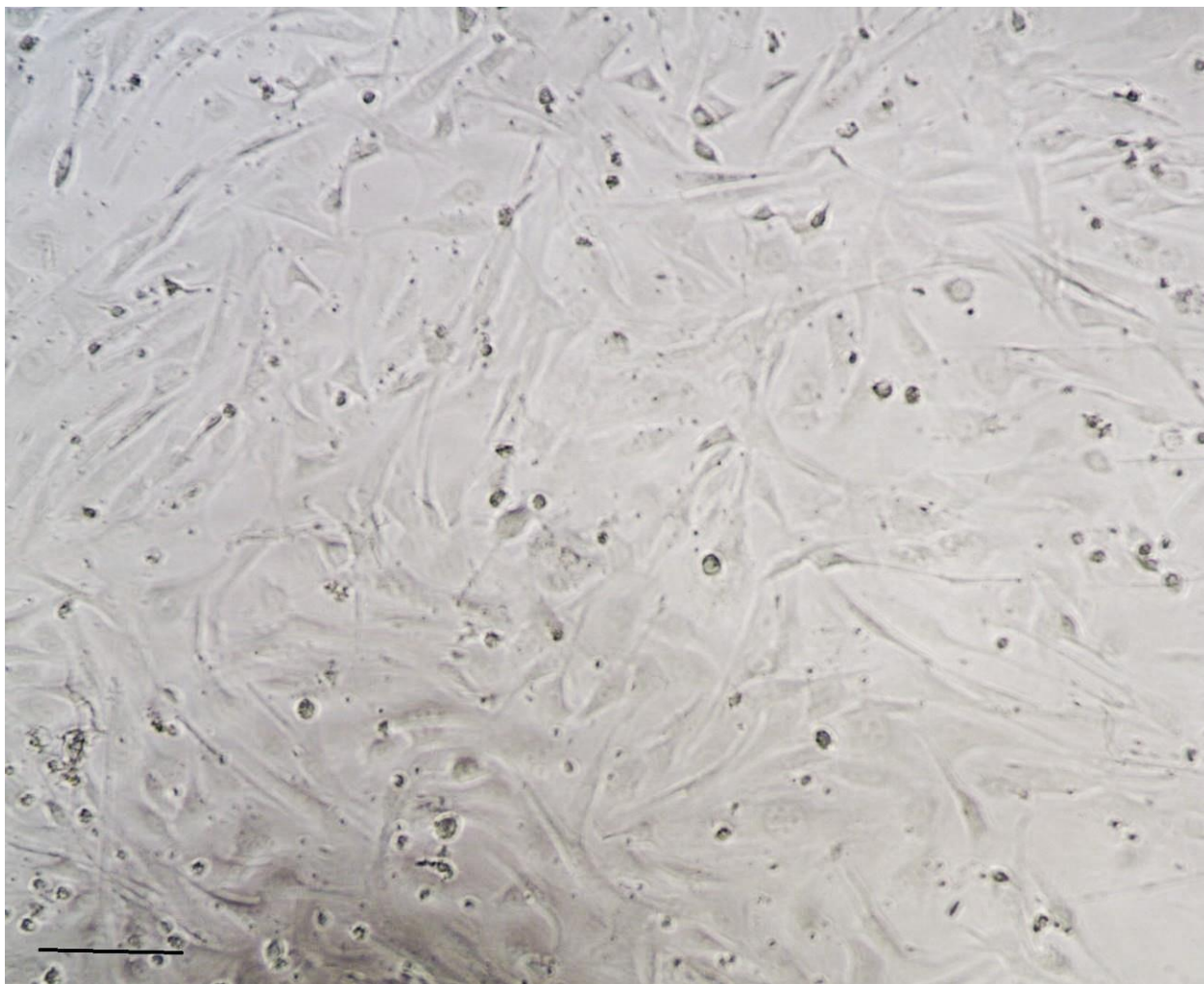


Рис. 4.2. Первинна культура фібробластів миші, пасаж 3. Фазовий контраст. Масштабна лінійка 100 мкм.

При дослідженні впливу середовищ, кондиційованих нативними та кріоконсервованими похідними плаценти на культуру фібробластів миші методом МТТ тесту виявлено, що середовища, кондиційовані нативними експлантами плаценти, клітинами плаценти, кріоконсервованими експлантами плаценти та клітинами плаценти вірогідно не змінювали показники МТТ тесту (рис. 4.3.).

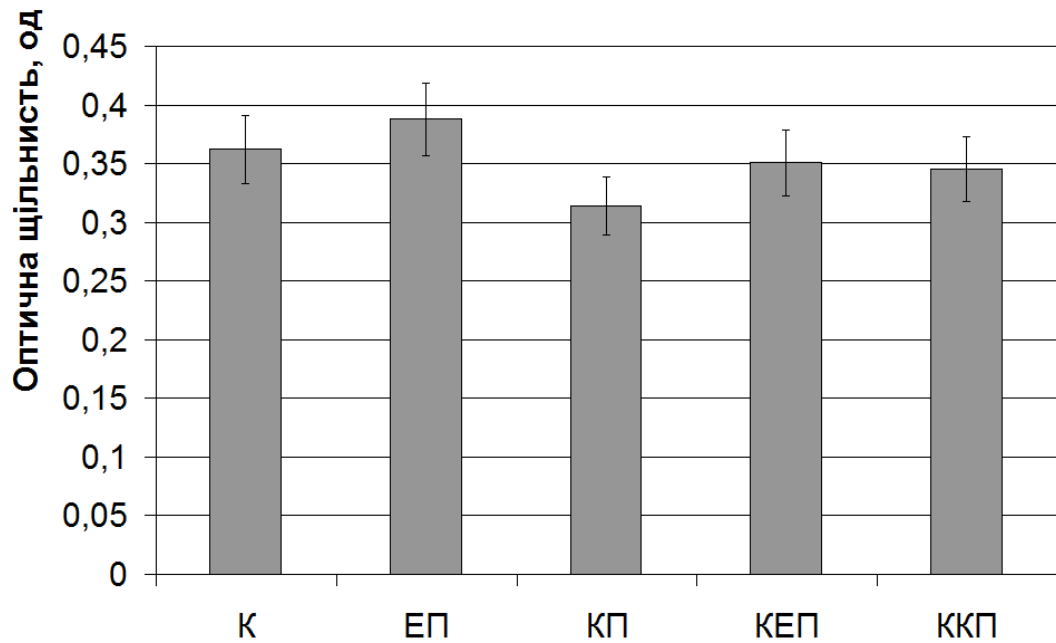


Рис. 4.3. Показники функціональної активності фібробластів при культивуванні зі середовищами, кондиційованими з похідними плаценти (одиниці оптичної щільності) за даними МТТ тесту. К – контроль (нативна культура фібробластів), ЕП – фібробласти, що культивували зі середовищем, кондиційованим з нативними ЕП, КП – фібробласти, що культивували зі середовищем, кондиційованим з нативними КП, КЕП – фібробласти, що культивували зі середовищем, кондиційованим з КЕП, ККП – фібробласти, що культивували зі середовищем, кондиційованим з ККП.

При оцінці проліферативної активності фібробласти пасажували на культуральному посуді в концентрації $3 \times 10^5 / \text{см}^2$ та знімали через дві доби, після чого підраховували кількість клітин. Виявлено, що середовища, кондиційовані з клітинами чи експлантатами плаценти, як нативними, так і кондиційованими не впливали на проліферативну активність фібробластів (рис. 4.4.).

Відсутність впливу середовищ, кондиційованих похідними плаценти може пояснюватися тим, що вони не є мішенню для біологічно активних речовин плацентарного походження та є активно проліферуючими клітинами. Таким чином подальші ефекти похідних плаценти на клітинні та

органні культури можна пояснювати саме безпосереднім гуморальним впливом, а не через елементи сполучної тканини.

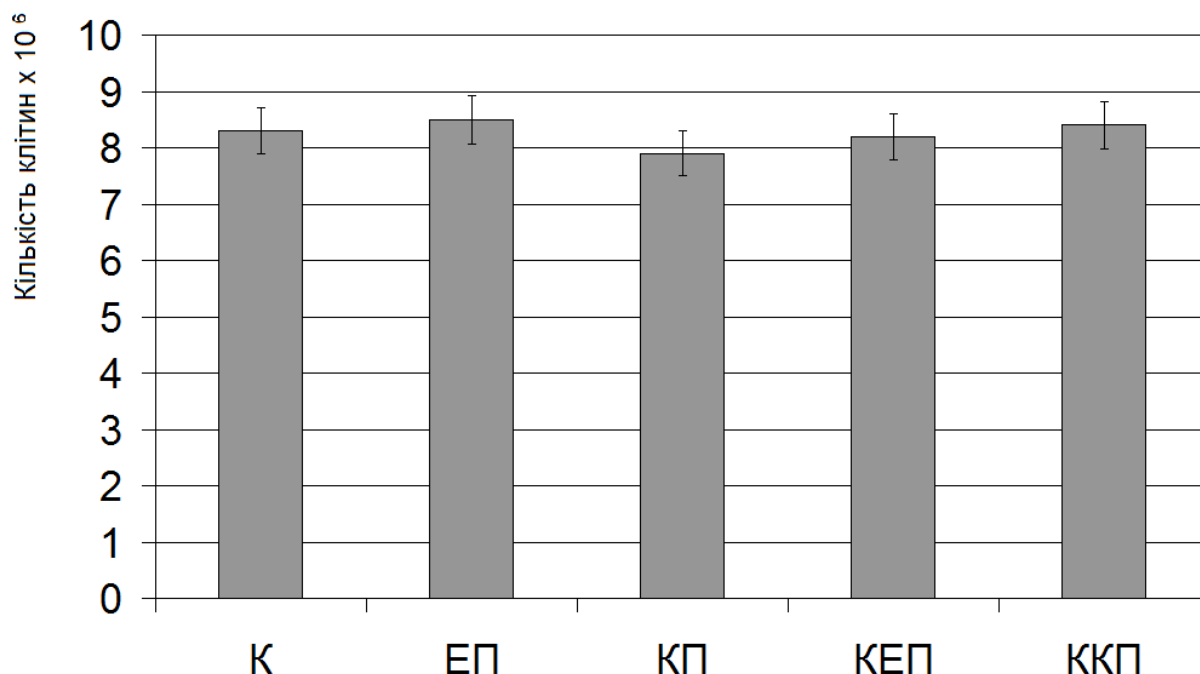


Рис. 4.4. Проліферативна активність фібробластів. К – контроль (нативна культура фібробластів), ЕП – фібробласти, що культивували зі середовищем, кондиційованим з нативними ЕП, КП – фібробласти, що культивували зі середовищем, кондиційованим з нативними КП, КЕП – фібробласти, що культивували зі середовищем, кондиційованим з КЕП, ККП – фібробласти, що культивували зі середовищем, кондиційованим з ККП.

4.2. Дослідження впливу нативних та кріоконсервованих похідних плаценти на культуру спленоцитів

При вагітності та при застосуванні стовбурових клітин описані явища змін в імунній системі. Це перехід до більш толерогенного Th2 типу, деяка імуносупресія та активація неспецифічних захисних механізмів, полегшення перебігу аутоімунних захворювань. В той же час клітини в імунній системі впливають на перебіг захворювань з інфекційним, запальним чи аутоімунним компонентом.

Селезінка є основним органом лімфопоезу дорослого організму та відіграє відповідну роль в формуванні імунітету. Культура спленоцитів застосовується як один зі стандартних об'єктів дослідження впливу тих чи інших речовин на імунну відповідь.

Отримана культура спленоцитів містила ядерні клітини та велику кількість еритроцитів. При проведенні реакції МТТ ядерні клітини переводили МТТ в фармазан, а еритроцити не реагували на реактив (рис. 4.5.).

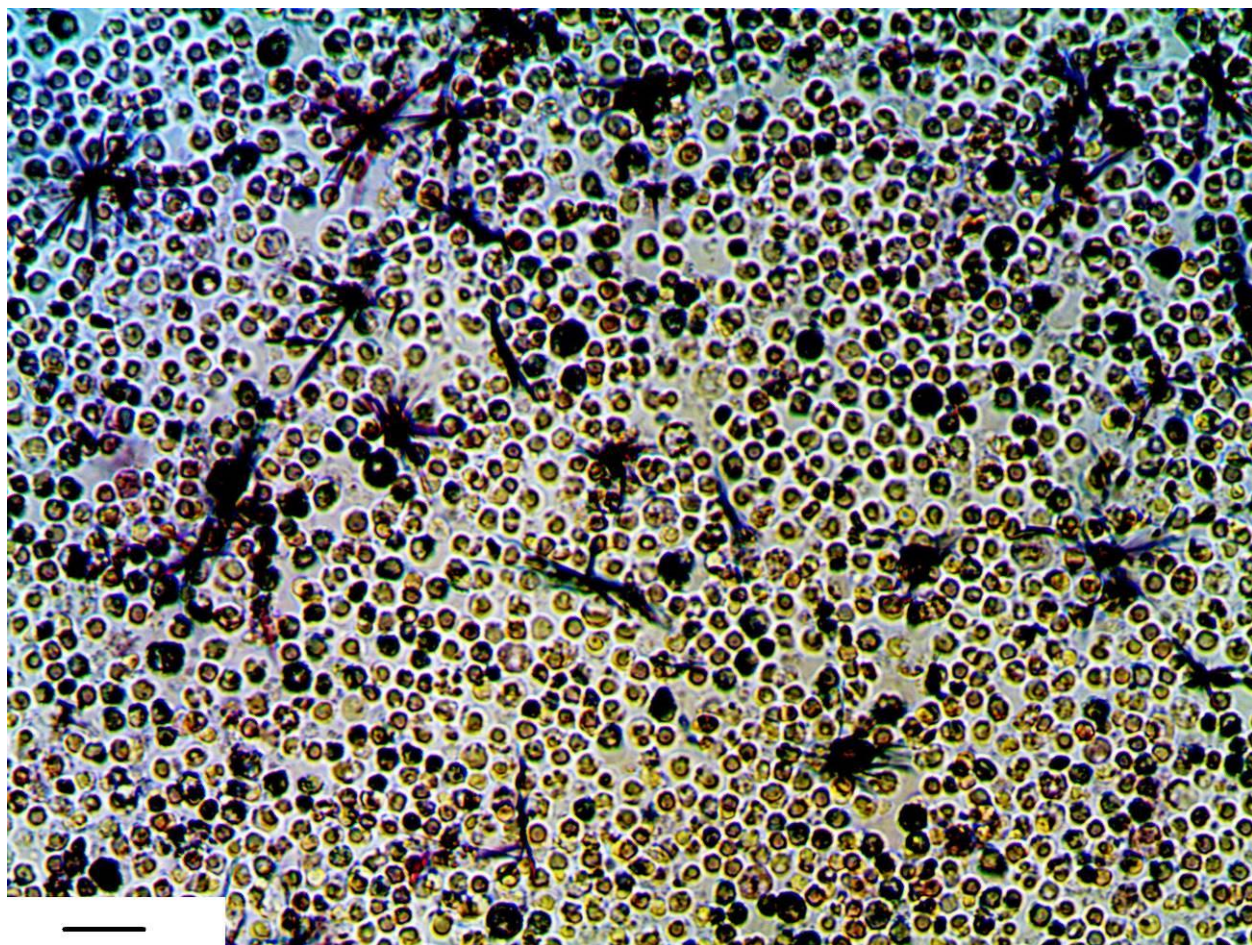


Рис. 4.5. Культура спленоцитів після реакції МТТ до розчинення фармазану. В спленоцитах візуалізуються кристали фармазану, між ними знаходяться еритроцити. Масштабна лінійка 20 мкм.

При аналізі даних отриманих при культивуванні спленоцитів з середовищами, кондиційованими з нативними та кріоконсервованими експлантами та клітинами плаценти виявлено, що всі досліджувані об'єкти

знижують метаболічну активність спленоцитів (рис. 4.6.). Супресивна дія однаково реєструється як для нативних, так і для кріоконсервованих об'єктів. При цьому дія кріоконсервованих експлантів плаценти більш виражена, ніж дія нативних.

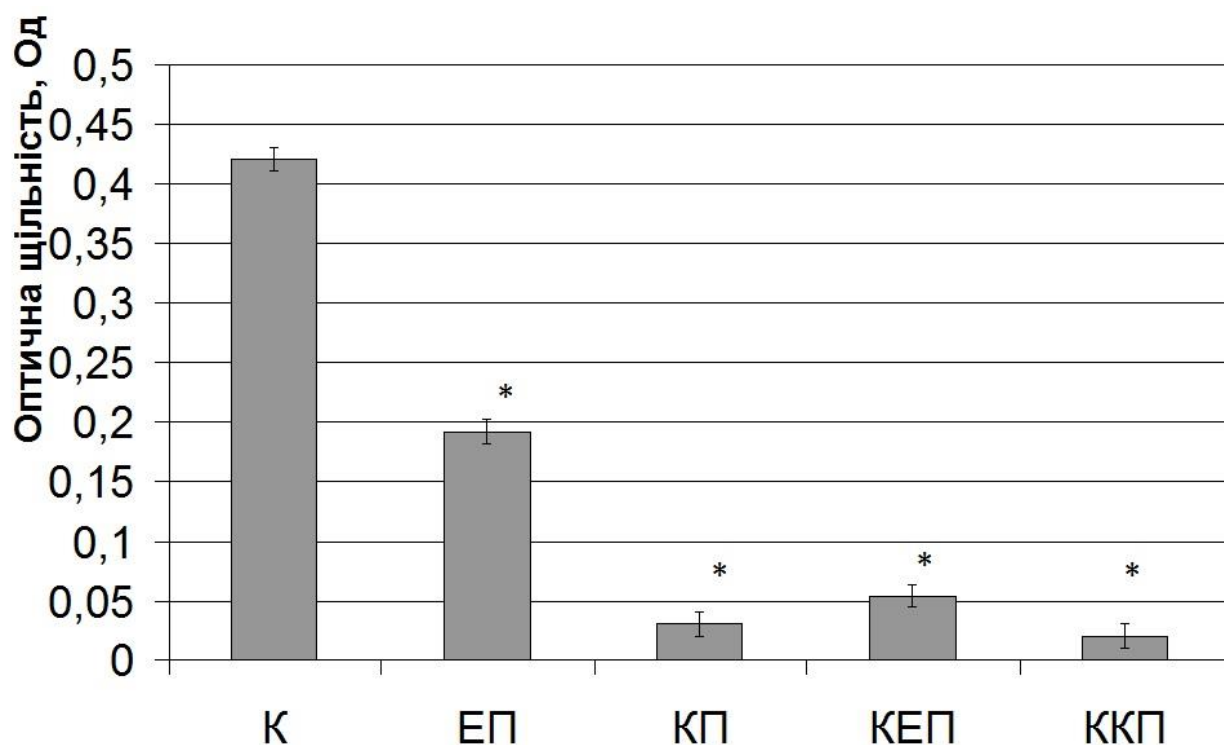


Рис. 4.6. Показники функціональної активності спленоцитів при культивуванні зі середовищами, кондіційованими з похідними плаценти (одиниці оптичної щільності) за даними МТТ тесту. К – контроль (нативна культура спленоцитів), ЕП – спленоцити, що культивували зі середовищем, кондіційованим з нативними ЕП, КП – спленоцити, що культивували зі середовищем, кондіційованим з нативними КП, КЕП – спленоцити, що культивували зі середовищем, кондіційованим з КЕП, ККП – спленоцити, що культивували зі середовищем, кондіційованим з ККП. *- вірогідність різниці з контролем $p < 0,05$.

При постановці реакції бласттрансформації РБТЛ виявлено зниження трансформації клітин в бластні форми після дії середовищ, кондіційованих похідними плаценти (рис. 4.7.).

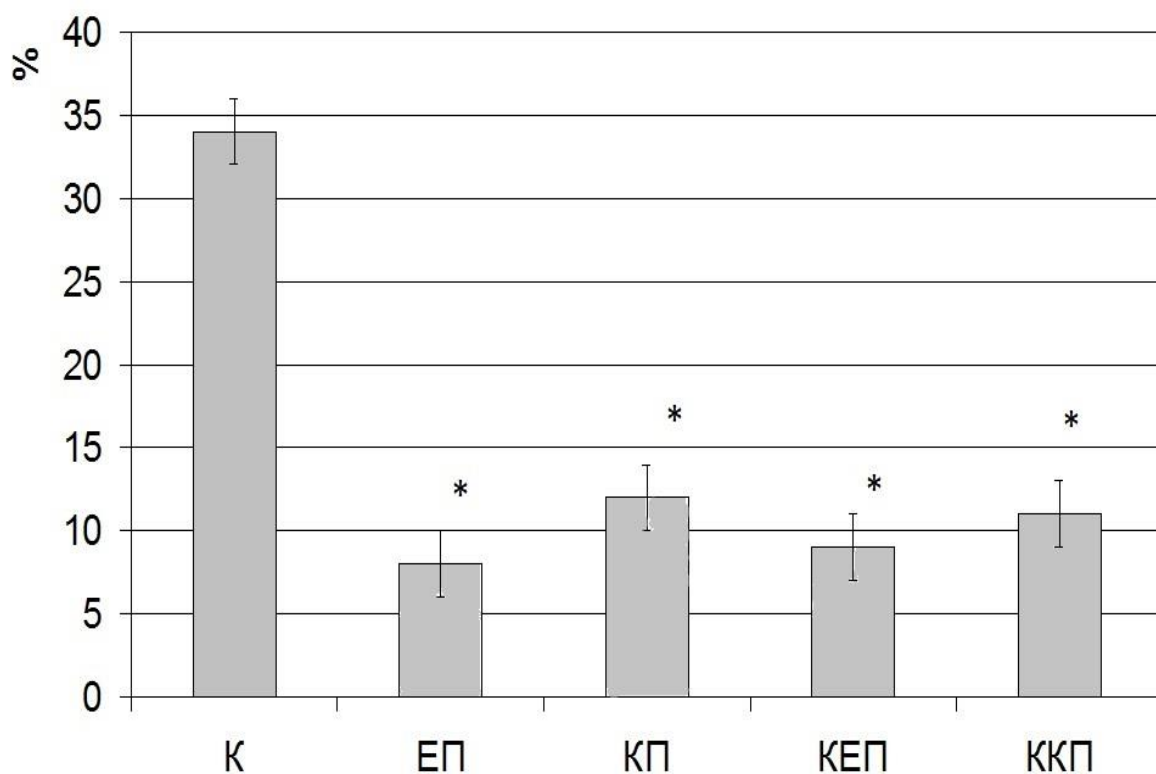


Рис. 4.7. Показники реакції бласттрансформації спленоцитів при культивуванні зі середовищами, кондційованими з похідними плаценти, %. К – контроль (нативна культура спленоцитів), ЕП – спленоцити, що культивували зі середовищем, кондційованим з нативними ЕП, КП – спленоцити, що культивували зі середовищем, кондційованим з нативними КП, КЕП – спленоцити, що культивували зі середовищем, кондційованим з КЕП, ККП – спленоцити, що культивували зі середовищем, кондційованим з ККП. *- вірогідність різниці з контролем $p < 0,05$.

Отримані результати співпадають з літературними даними про імуносупресивний та імуномодулюючий вплив як стовбурових клітин, так і плаценти та можуть бути пов'язані з паракринними та ендокринними факторами, описаними для вагітності та стовбурових клітин [108, 210, 273, 325].

4.3. Дослідження впливу нативних та кріоконсервованих похідних плаценти на культуру нейральних клітин

Нейральні клітини є важливою ланкою центральної регуляції репродуктивної функції [92], через яку можливий вплив похідних плаценти [271, 106, 173]. Оскільки вплив кріоконсервованих експлантів плаценти на нейроклітини вже описаний в іншому дослідженні [246] та не входить до цілей дослідження, вивчали нейропротекторний потенціал нативних та кріоконсервованих клітин плаценти. Враховуючи функційну лабільність нервової системи необхідним є вивчення не тільки метаболічних характеристик нервових клітин, а функційних, для чого було вибрано стандартизовану модель глутаматної токсичності.

При виділені нейроклітин вищеописаним методом отримували суспензію клітин, розміром до 7 мкм, які в перші дві доби формували агрегати, які не адгезували до культурального посуду. Згідно з літературними даними [285] агрегати формуються з життєздатних нейральних клітин. Загиблі клітини спостерігали окремо. Невелика кількість клітин адгезувала в першу добу (рис. 4.8.).

Протягом 5 діб обережно міняли середовище та клітини адгезували. На шосту добу сфери та клітини, що не адгезували змивали PBS. Залишались клітини, що формували моношар (рис. 4.9.). Всі клітини вважали життєздатними, їх знімали з культурального пластику та застосовували для подальших експериментів.

Клітини пасажували на 96 лунковий планшет в концентрації 20000 на лунку. Ця концентрація була обрана емпіричним шляхом для проведення МТТ тесту. Клітини формували моношар з конфлюентністю більше 80%. Клітини мали характерну морфологію. Більшість з них були полігональної форми з численними відростками, які поєднувалися між собою. Частина клітин мала фібробластоподібну веретеноподібну форму (рис. 4.10.). Оскільки при подальшому культивуванні та пасажуванні морфологія моношару різко

змінювалась та клітини набували фібробластоподібної морфології дослідження проліферативної активності не проводили.

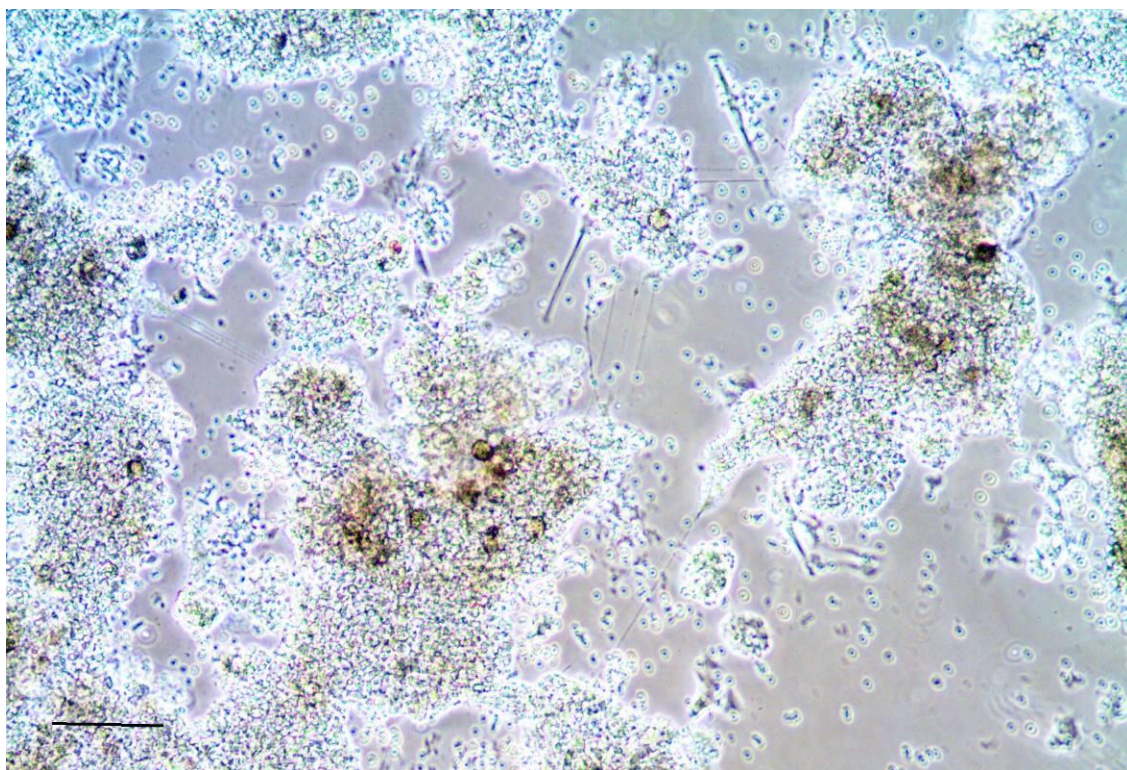


Рис. 4.8. Агрегати, сформовані з нейральних клітин миші Фазовий контраст. Масштабна лінійка 100 мкм.

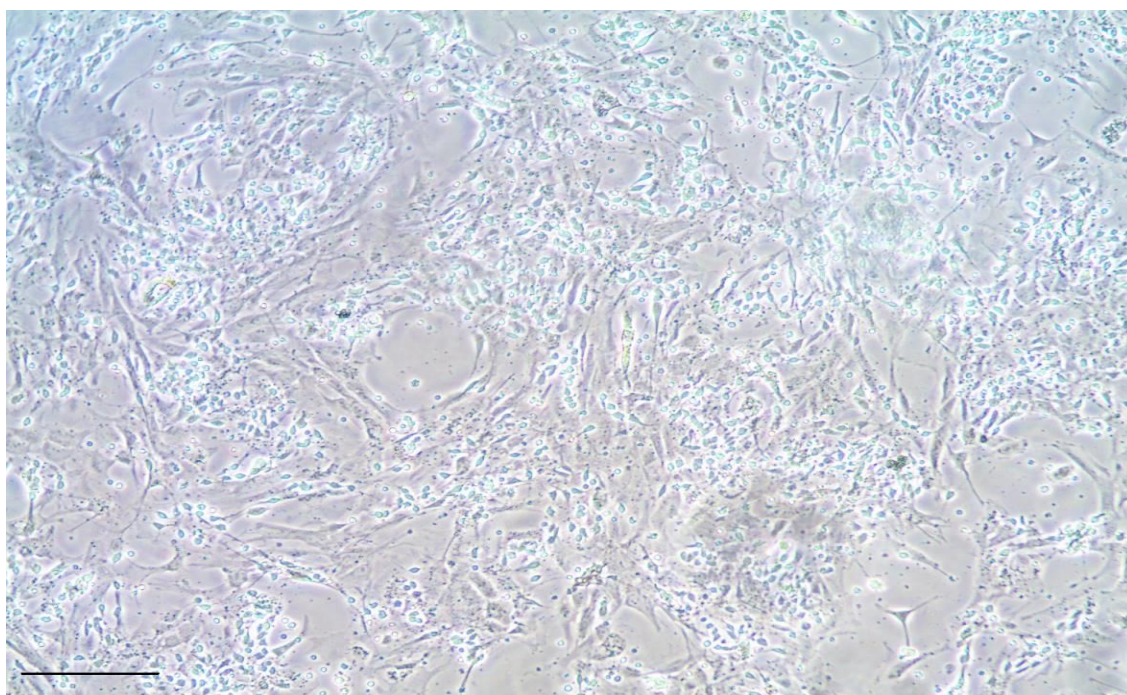


Рис. 4.9. Первинна культура нейральних клітин миші. Фазовий контраст. Масштабна лінійка 100 мкм.

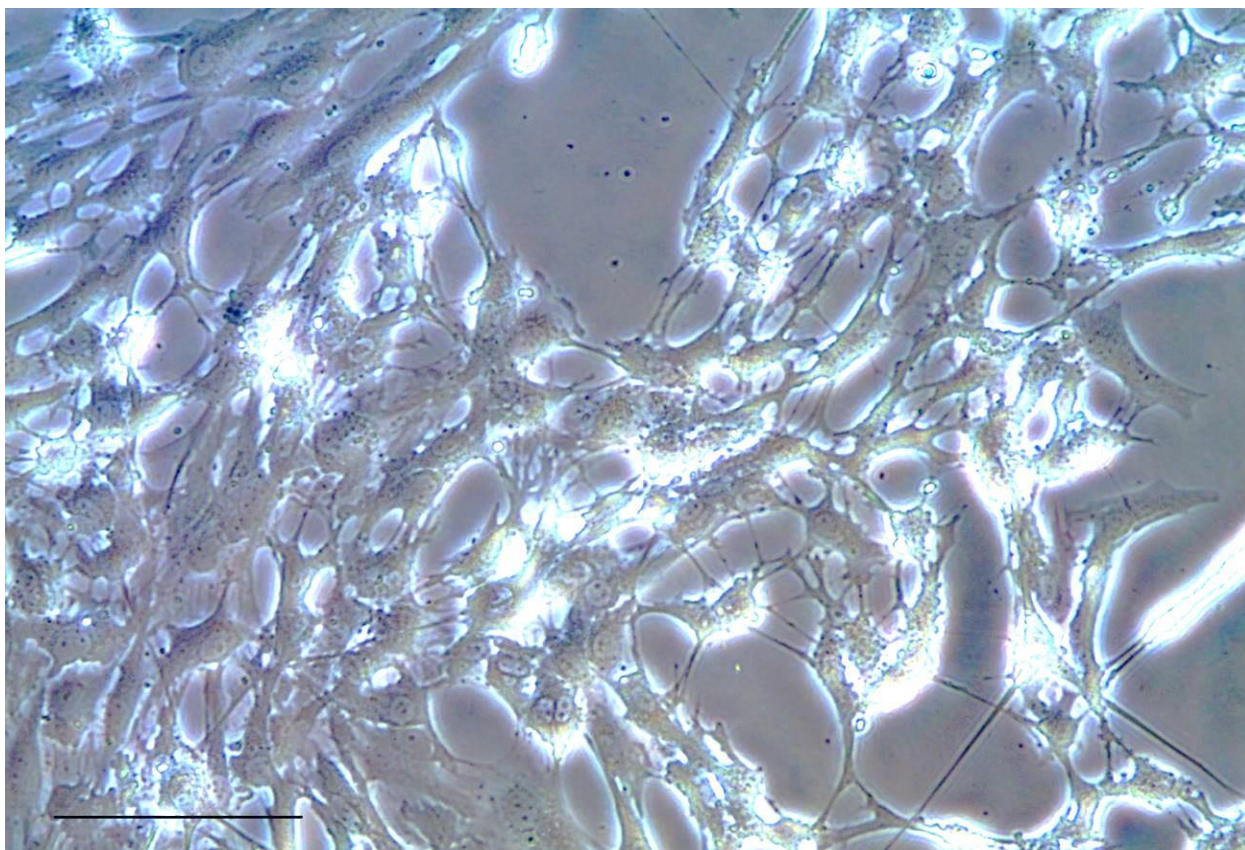


Рис. 4.10. Культура нейральних клітин миші після субкультивування. Фазовий контраст. Масштабна лінійка 100 мкм.

При дії глутамату різних концентрацій змінювалась морфологія моношару нейроклітин. Концентрації глутамату 0,5 – 5 мМоль мало впливали на морфологію культури клітин та результати МТТ тесту. При концентрації глутамату 10 мМоль клітини зморщуються, спостерігається загибель та відшарування окремих клітин (рис. 4.11, А). При концентрації глутамату 20 мМоль спостерігається загибель всієї популяції клітин (рис. 4.11, Б).

Одночасно для підтвердження специфічності моделі перевіряли токсичність глутамату для фібробластів миші. Виявлено, що 10 мМоль глутамату не змінює морфологію моношару фібробластів миші (рис. 4.12, А), а токсична дія починається при концентрації більше 20 мМоль (рис. 4.12, Б).

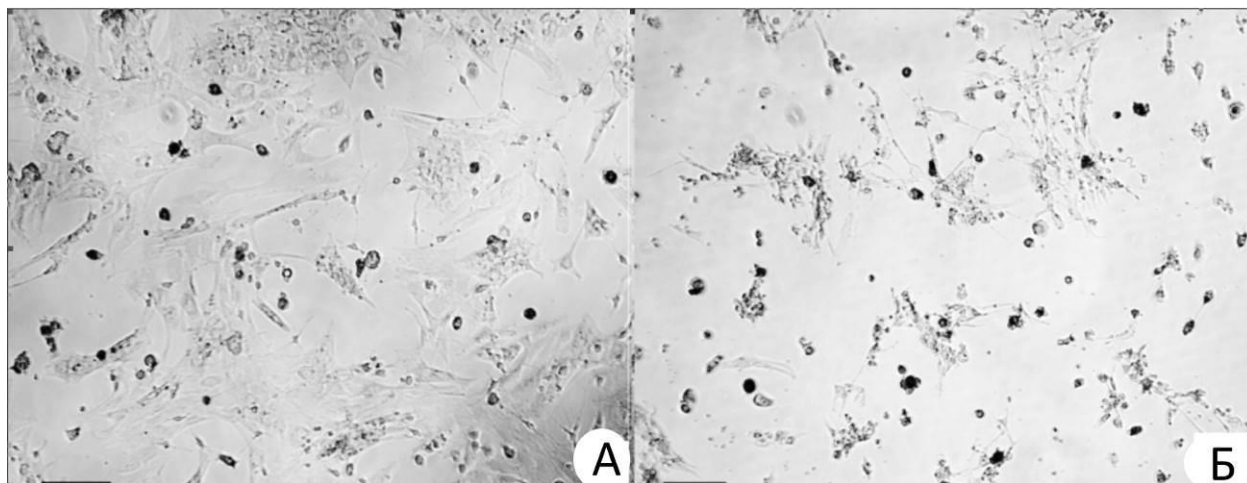


Рис. 4.11. Токсична дія глутамату на нейральні клітини миші. А – через добу інкубування 10 мМоль глутамату, Б – через добу інкубування 20 мМоль глутамату. Масштабні лінійки 100 мкм.

Досліджуючи обидві культури після дії глутамату протягом доби виявлено, що концентрація глутамату 10 мМоль знижує показник МТТ нейральних клітин на 80%, а фібробластів – лише на 15-20%, до меншої концентрації клітини мало чутливі, а при концентрація більше 20 мМоль виживають поодинокі клітини (рис. 4.13.).

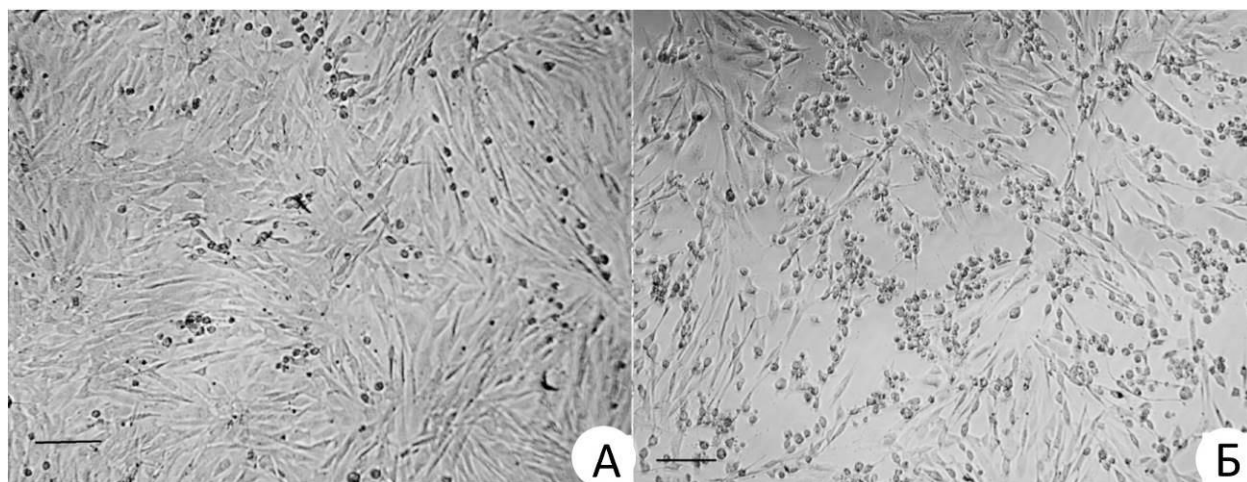


Рис. 4.12. Токсична дія глутамату на фібробласти миші. А – через добу інкубування 10 мМоль глутамату, Б – через добу інкубування 20 мМоль глутамату. Масштабні лінійки 100 мкм.

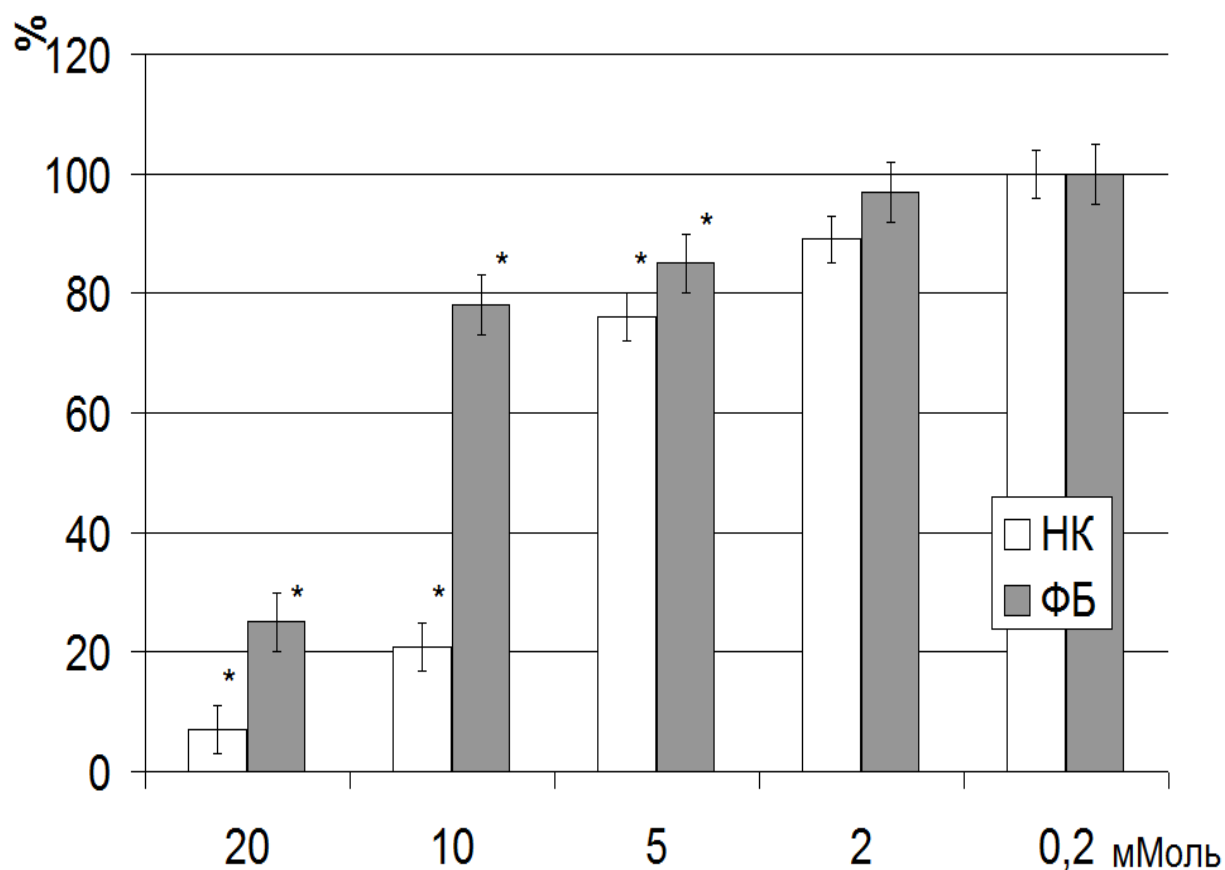


Рис. 4.13. Вплив різних концентрацій глутамату на культуру нейральних клітин та фібробластів. НК – нейральні клітини, ФБ – фібробласти. Примітка: *- вірогідність різниць з позитивним контролем $p < 0,05$.

При дослідженні впливу середовищ, кондиційованих нативними та кріоконсервованими клітинами плаценти показники МТТ тесту підвищувались на 20 – 23 % та вірогідно відрізнялись від контролю (рис. 4.14.). При культивуванні нейральних клітин з цими ж середовищами, інактивованими нагріванням відмінностей не виявлено.

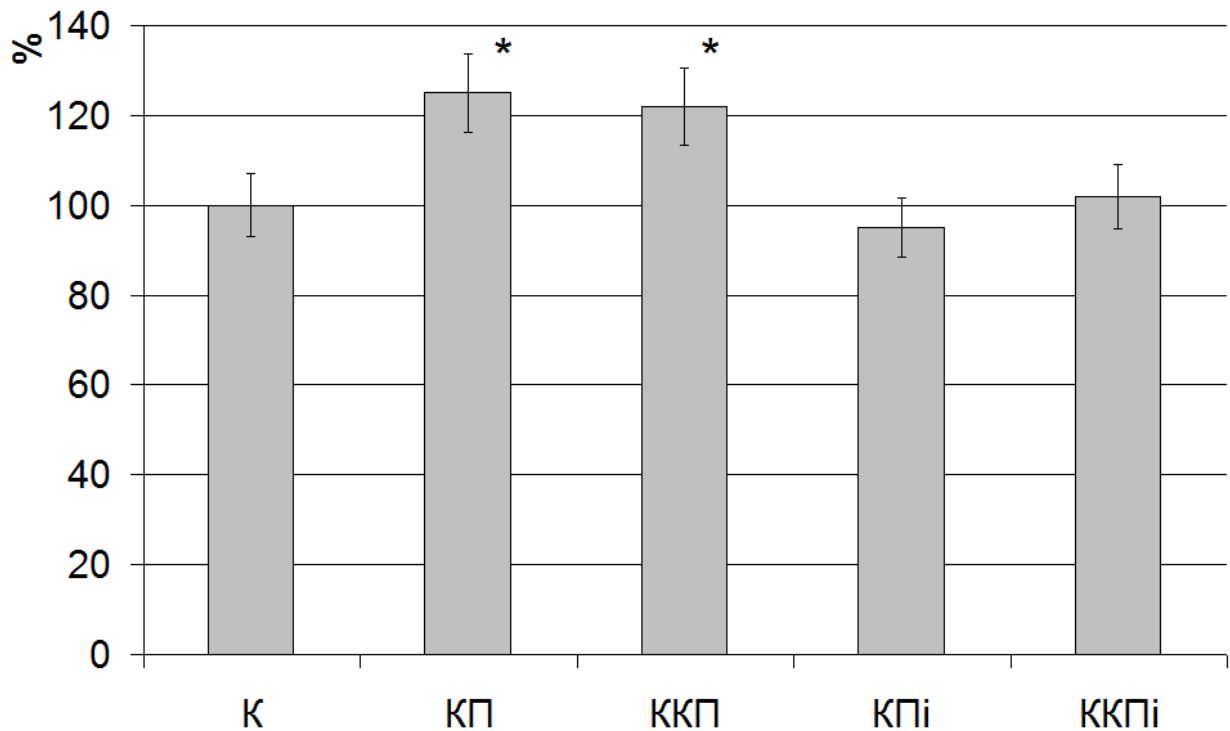


Рис. 4.14. Показники функціональної нейроклітин при культивуванні зі середовищами, кондційованими з клітинами плаценти (одиниці оптичної щільності) за даними МТТ тесту, % від контролю. К – контроль, КП – середовище, кондційоване з нативними клітинами плаценти, ККП – середовище, кондційоване з кріоконсервованими клітинами плаценти, КПі – інактивоване середовище, кондційоване з нативними клітинами плаценти, ККПі – інактивоване середовище, кондційоване з кріоконсервованими клітинами плаценти. Примітка: *- вірогідність різниць з позитивним контролем $p < 0,05$.

Після впливу глутамату на культуру нейральних клітин показник МТТ тесту склав близько 21%. Культури клітин, які перед інкубацією з глутаматом інкубували 24 години зі середовищами, кодифікованими з нативними або кріоконсервованими клітинами плаценти за показниками МТТ тесту не відрізнялися від контролю та вірогідно відрізнялися від клітин після дії лише глутамату. Середовища, інактивовані нагріванням не мали такого ефекту та вірогідно не відрізнялись від контролю (рис. 4.15.).

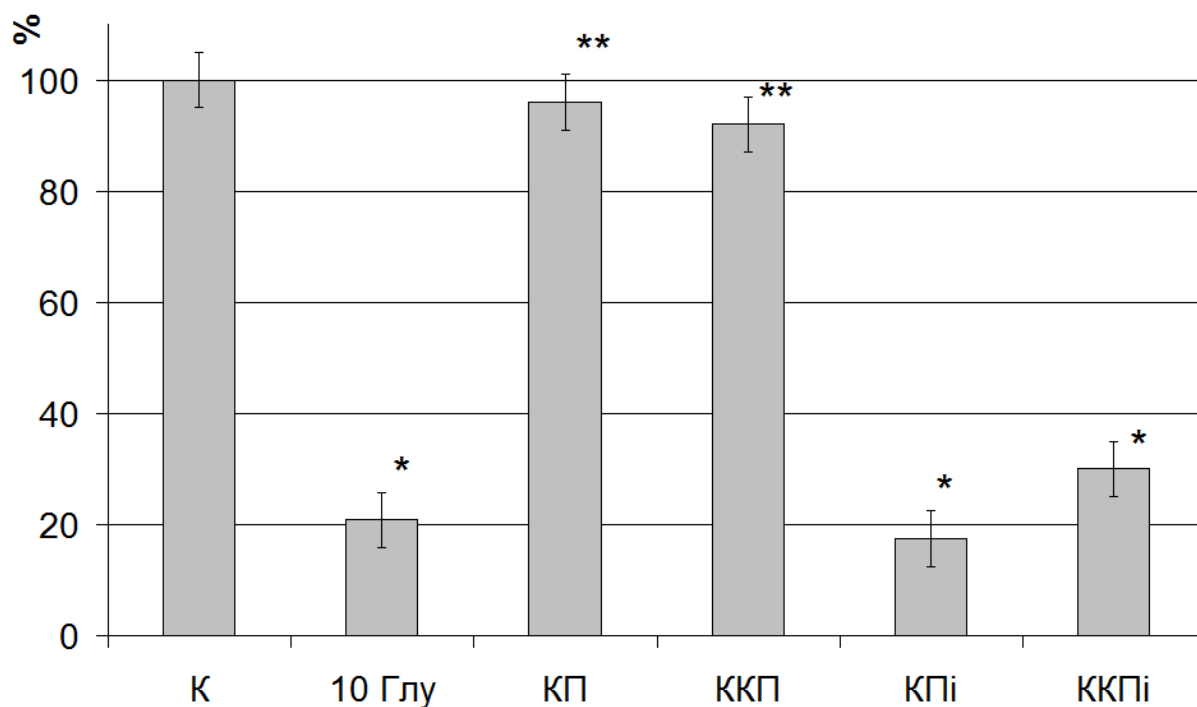


Рис. 4.15. Показники функціональної нейроклітин при культивуванні зі середовищами, кондційованими з клітинами плаценти до глутамату (одиниці оптичної щільності) за даними МТТ тесту, % від контролю. К – контроль, 10 Глу – клітини після інкубації з 10 мМоль глутамату (негативний контроль), КП – середовище, кондційоване з нативними клітинами плаценти, ККП – середовище, кондційоване з кріоконсервованими клітинами плаценти, КПі – інактивоване середовище, кондційоване з нативними клітинами плаценти, ККПі – інактивоване середовище, кондційоване з кріоконсервованими клітинами плаценти. Примітка: *- вірогідність різниць з позитивним контролем $p < 0,05$, ** - вірогідність різниць з негативним контролем $p < 0,05$.

Культури клітин, які після інкубацією з глутаматом інкубували 24 години зі середовищами, кондційованими з нативними або кріоконсервованими клітинами плаценти за показниками МТТ тесту були значно менш активні, ніж контрольні, але в той же час вірогідно відрізнялись від клітин, на які діяли лише глутаматом. Середовища, інактивовані нагріванням не мали такого ефекту та вірогідно не відрізнялись від контролю (рис. 4.16.)

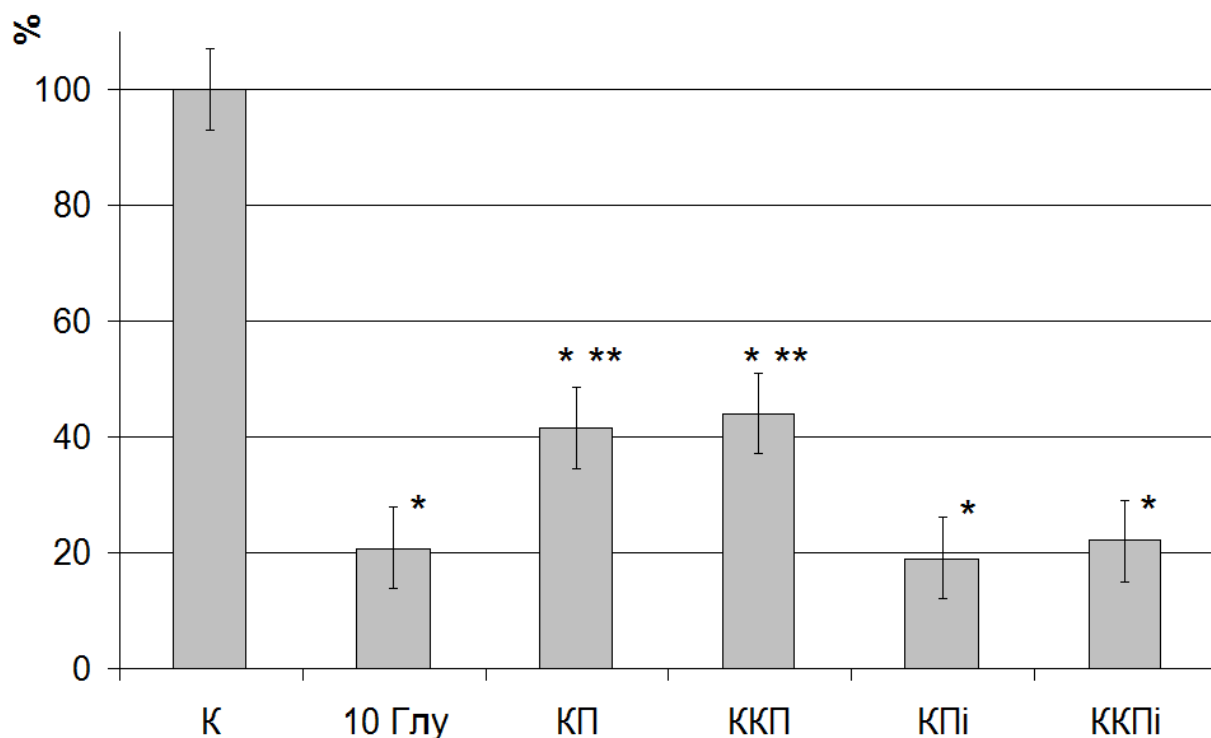


Рис. 4.16. Показники функціональної нейроклітин при культивуванні зі середовищами, кондційованими з клітинами плаценти після глутамату (одиниці оптичної щільності) за даними МТТ тесту, % від контролю. К – контроль, 10 Глу – клітини після інкубації з 10 мМоль глутамату (негативний контроль), КП – середовище, кондційоване з нативними клітинами плаценти, ККП – середовище, кондційоване з кріоконсервованими клітинами плаценти, КПі – інактивоване середовище, кондційоване з нативними клітинами плаценти, ККПі – інактивоване середовище, кондційоване з кріоконсервованими клітинами плаценти. Примітка: * - вірогідність різниць з позитивним контролем $p < 0,05$, ** - вірогідність різниць з негативним контролем $p < 0,05$.

Таким чином, продемонстровано, що середовища, кондційовані з нативними або кріоконсервованими клітинами плаценти мають позитивний трофічний ефект на нейральні клітини, оказують нейропротекторний ефект після токсичної дії глутамату та сприяють регенерації клітин після ушкодження. Зниження ефектів після інактивації нагріванням може свідчити про білково-пептидну природу речовин, що здійснюють цей ефект. В

літературі описано ряд факторів, через які може бути здійснено цей ефект, які з одного боку стимулюють метаболічні ефекти в нейроклітинах (bFGF, HGF, TGF β , EGF, VEGF), з іншого боку – пригнічують прозапальні явища в глії, які можуть пошкоджувати нейроклітини (IL-4, IL-5, IL-9, IL-10) [129, 280, 223].

4.4. Дослідження впливу нативних та кріоконсервованих похідних плаценти на органотипову культуру матки

Під час вагітності матка забезпечує ріст та розвиток плоду. Після імплантації та розвитку плаценти можливий нормальний розвиток вагітності навіть при відсутності яєчників. Багато патологічних станів в репродуктології пов'язані з патологією матки та ендометрію. Матка є органом, що найбільш сильно реагує на гуморальні фактори, що продукуються плацентою [273, 113, 155]. Для визначення механізму впливу похідних плаценти на жіночу репродуктивну систему важлива оцінка їх впливу на ізольовану матку, що дозволить виключити вплив імунної та ендокринної систем.

Після видалення з організму тварин матки мали типову структуру (рис.4.17.). Внутрішній шар ендометрію складався з циліндричних великих клітин з гетерохромними ядрами. В ендометрії була велика кількість залоз між клітинами сполучної тканини. М'язовий шар був вираженим, переходив у серозний, зовнішній шар з кровоносними судинами, елементами жирової тканини.

При короткочасному культивуванні матки за запропонованим методом [317], без додавання середовища, кондиційованого похідними плаценти структура органу зазнавала деяких змін. Загальна структура зберігалася. розміри органу, співвідношення ендометрію, міометрію та серози (рис. 4.18 А, Б). В той же при час спостерігали гіпергідратацію всіх шарів, міжклітинний простір насичувався рідиною, втрачав еозинофілію. Клітини набували більш округлої форми, ядра клітин зменшувалися, спостерігалася гіперхромія. Найбільші зміни зазнавав внутрішній шар ендометрію, який

практично не диференціювався окремо від нижчих шарів та залоз ендометрію (рис. 4.18. В, Г). Ці зміни пояснювали існуванням тканини в гіпотонічному середовищі, та живленням з живільного середовища, а не з судинного русла, зменшенню дифузії до внутрішніх шарів матки. Оскільки найбільш метаболічно активними клітинами матки є клітини ендометрію та залоз ендометрію, їх зникнення можна трактувати, як початок некрозу.

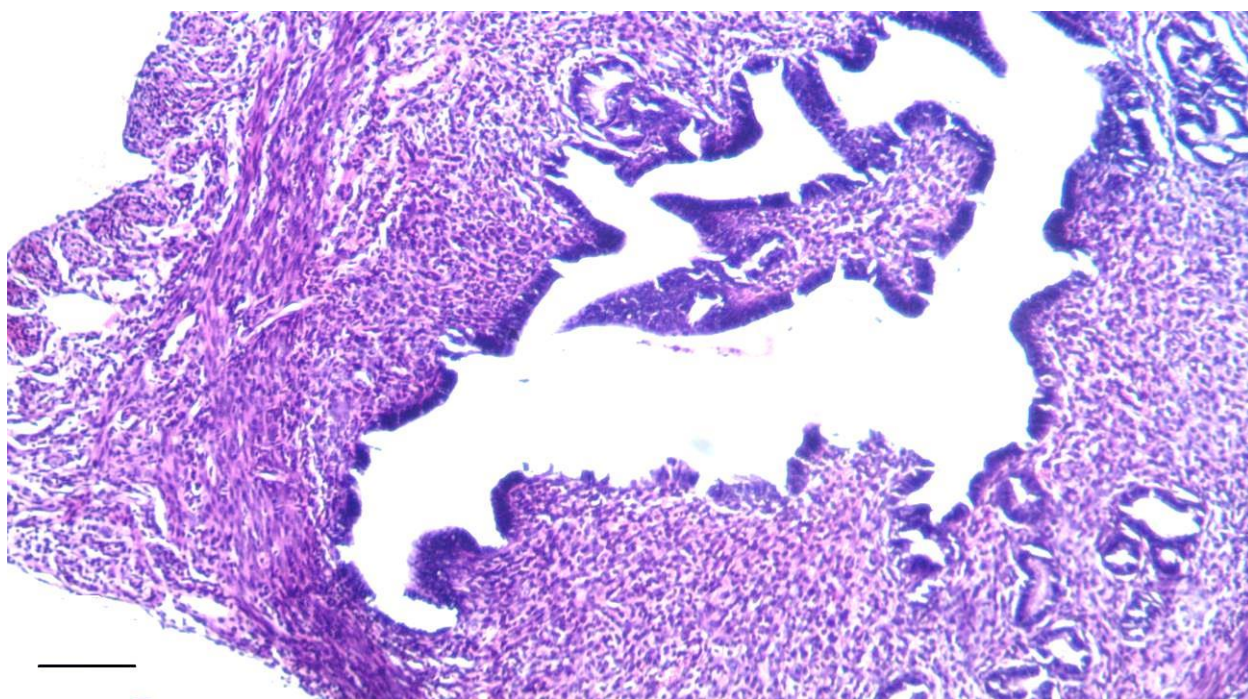


Рис. 4.17. Структура матки піддослідних тварин до культивування. Масштабні лінійки 100 мкм.

При культивуванні маток з середовищами, кондиційованими кріоконсервованими експлантатами плаценти (рис 4.19.) спостерігали ті ж зміни, але більш виражені. Загальна структура органу була збережена, спостерігали гпергідратацію міжклітинного середовища, гіперхромію ядер. Внутрішні шари матки чітко не відокремлювалися один від одного. Більш всього змінювалась структура ендометрію та залоз, які чітко не візуалізувались, в просвіті маткі явища центрального некрозу зі злуццванням клітин. Структура м'язового та серозного шарів залишалась більш збереженою, вони чітко диференціювалися.

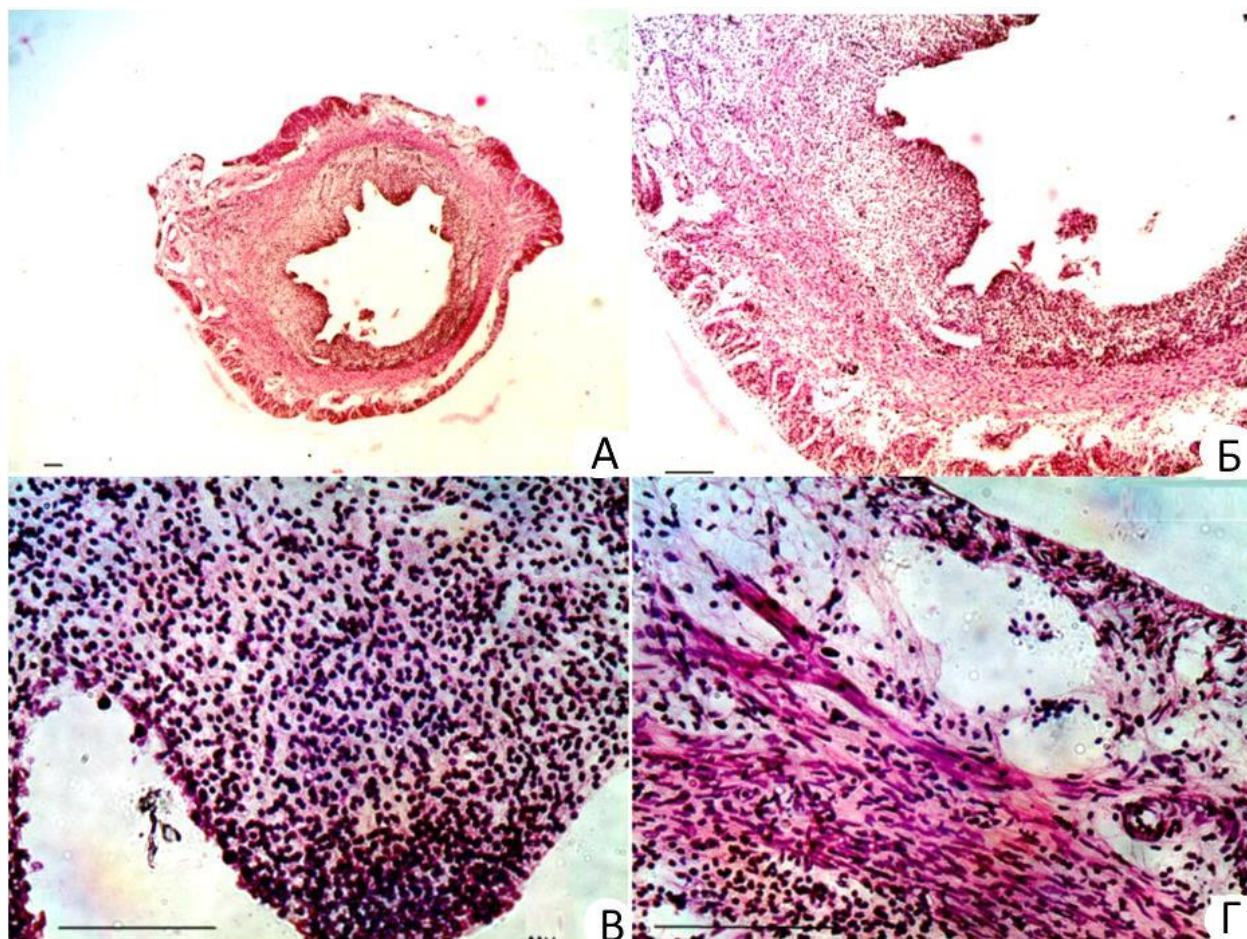


Рис. 4.18. Матка миші після короточасного культивування без додавання кондиційованих середовищ. А – збереження загальної структури органу, Б – зменшення відмінності між шарами органу, В – внутрішні шари ендометрію, Г – зовнішні шари м'язових волокон. Масштабні лінійки 100 мкм.

При культивуванні маток з середовищами, кондиційованими кріоконсервованими клітинами плаценти спостерігали спостерігали збереження загальної структури органу, гіпергідратацію тканини, окремі клітини в просвіті, відсутність чіткого розділення шарів матки (рис 4.20.). Також спостерігали явища некрозу ендометрію та залоз ендометрію, наявність детриту в просвіті матки.

Більш виражені зміни в зразках після культивування зі середовищами, кондиційованими похідними плаценти можна пояснити більш активним метаболізмом в тканині матки, яка призводить до більших змін в умовах короточасного культивування за методикою, що застосовувалася.

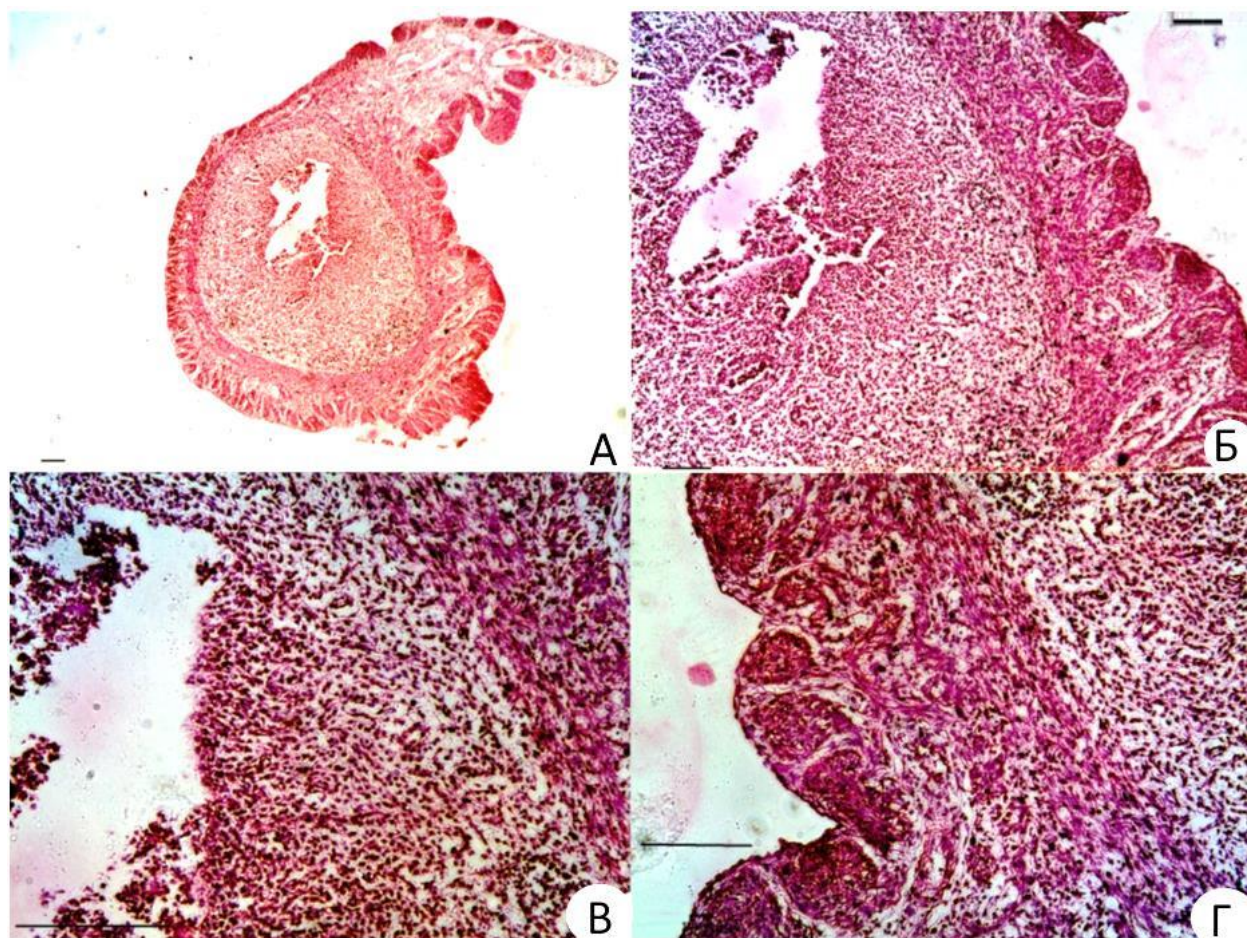


Рис. 4.19. Матка миші після короточасного культивування з додаванням середовищ кондиційованих кріоконсервованими експлантами плаценти. А – збереження загальної структури органу, Б – зменшення відмінності між шарами органу, В – внутрішні шари ендометрію, відокремлення окремих клітин, Г – зовнішні шари м'язових волокон. Масштабні лінійки 100 мкм.

При дослідженні метаболічної активності маток за тестом відновлення резазурину, було виявлено, що нативний контроль значно відрізнявся від негативного. Так показник середовища дорівнював $1,665 \pm 0,04$ одиниць оптичної щільності, тоді як контроль – $1,022 \pm 0,03$, що говорить про значну активність органотипової культури. Показники тесту відновлення резазурину для маток, що культивувалися з середовищами, кондиційованими з нативними та кріоконсервованими експлантами плаценти вірогідно

відрізнялися від контролю, продемонструвавши більшу метаболічну активність. Показники тесту відновлення резазуріну для маток, що культивувалися з середовищами, кондиційованими з нативними та кріоконсервованими клітинами плаценти також мали вірогідно більшу метаболічну активність (рис. 4.21).

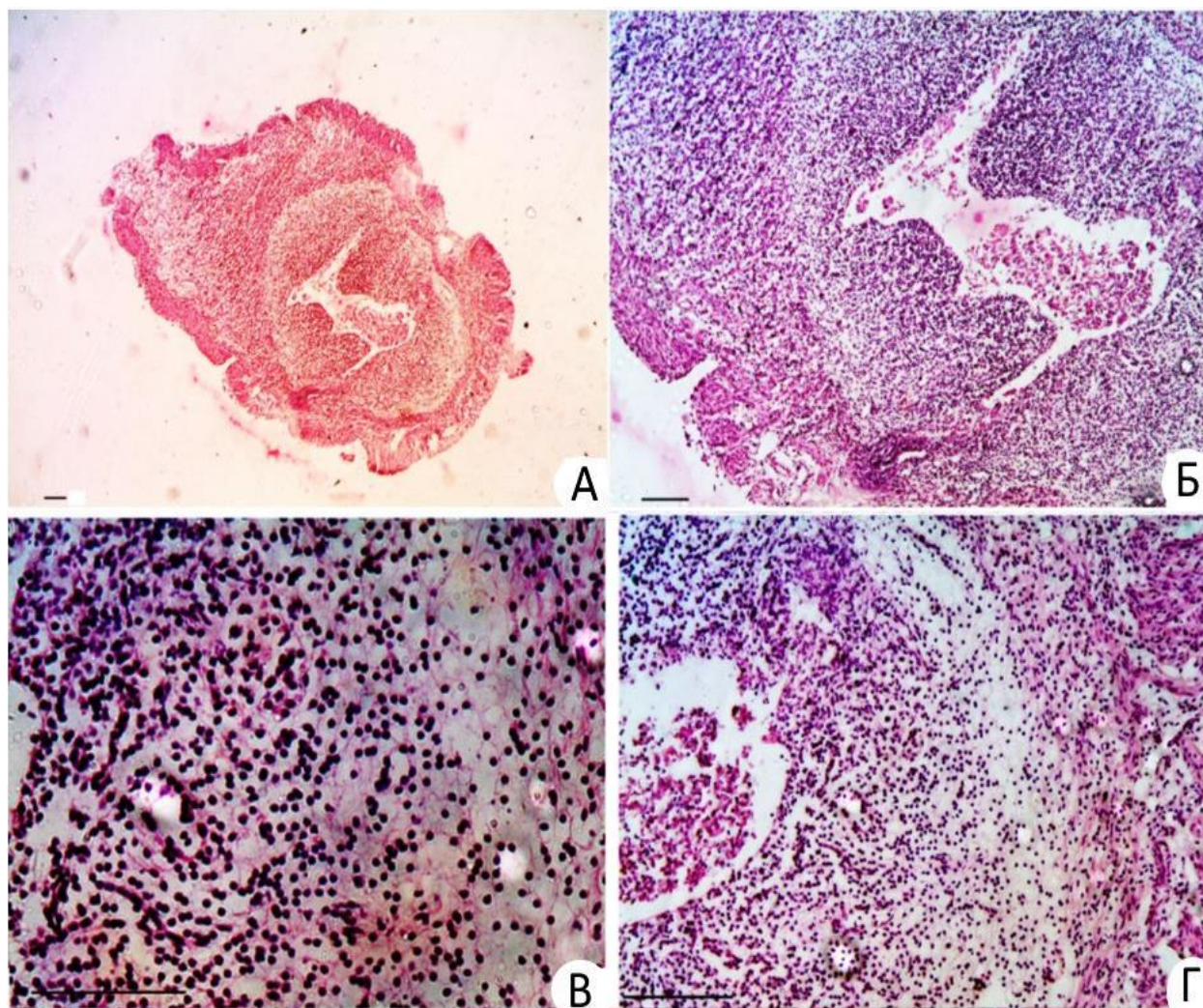


Рис. 4.20. Матка миші після короткочасного культивування з додаванням середовищ кондиційованих кріоконсервованими клітинами плаценти. А – збереження загальної структури органу, Б – зменшення відмінності між шарами органу, В – внутрішні шари ендометрію, відокремлення окремих клітин, Г – зовнішні шари м'язових волокон. Масштабні лінійки 100 мкм.

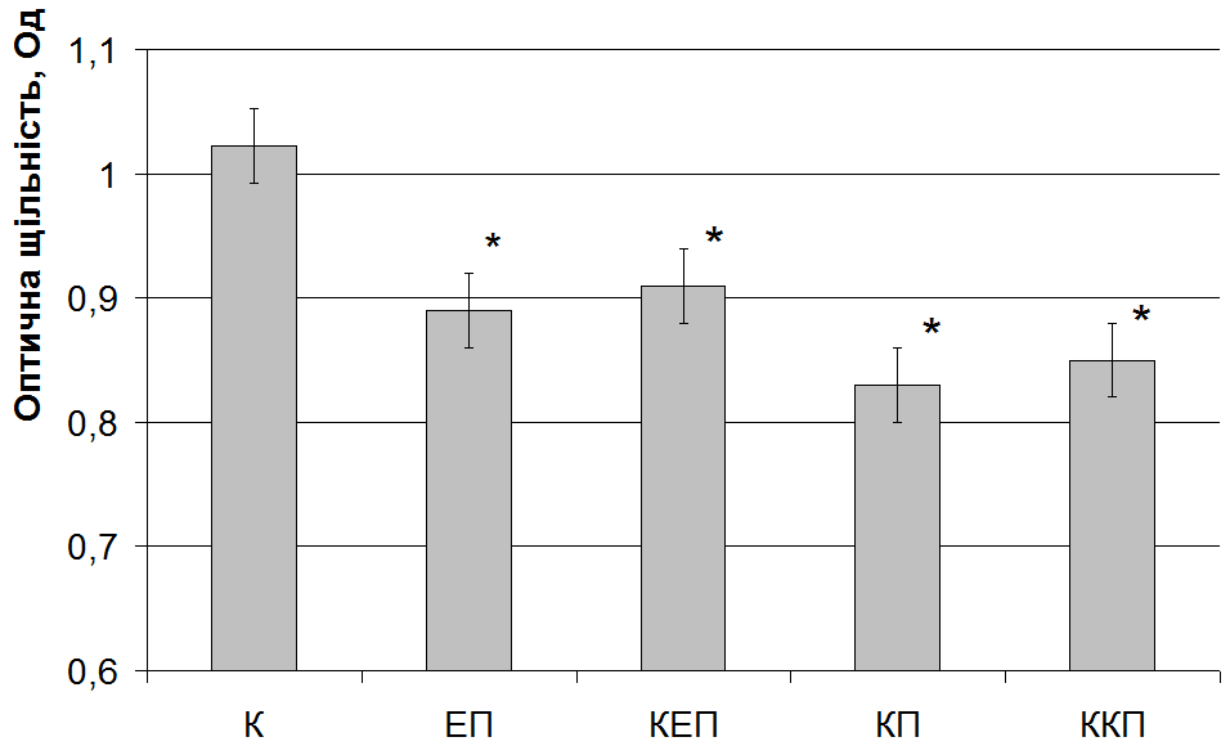


Рис. 4.21. Показники метаболічної активності маток мишей за даними тесту відновлення резазурину. К – позитивний контроль, ЕП – культивування з середовищами, кондиційованими нативними експлантами плаценти, КЕП – культивування з середовищами, кондиційованими кріоконсервованими експлантами плаценти, КП – культивування з середовищами, кондиційованими нативними клітинами плаценти, ККП – культивування з середовищами, кондиційованими кріоконсервованими клітинами плаценти. Показник середовища без маток дорівнював $1,655 \pm 0,03$.

Примітка: * - вірогідність різниць з позитивним контролем $p < 0,05$.

Отримані данні по-перше співпадають з даними морфологічного дослідження – матки, які культивували з середовищами, кондиційованими з похідними плаценти мають більші морфологічні зміни та більшу метаболічну активність. По-друге стимуляція похідними плаценти маток типова для процесів, що проходять при вагітності. По-третє вірогідної різниці між різними похідними плаценти як нативних, так і кріоконсервованих не виявлено.

4.5. Дослідження впливу нативних та кріоконсервованих похідних плаценти на органотипову культуру яєчників

Яєчник є основною залогою жіночої статеві системи та джерелом яйцеклітин. Його гормональна активність тісно пов'язана з овуляторним циклом та созріванням яйцеклітин. Але при настанні вагітності його функції пригнічуються в основному за рахунок хоріонічного гонадотропіну. В той же час мається достатня кількість досліджень, що демонструють активацію яєчничкової функції після застосування похідних плаценти. Для з'ясування характеру прямого впливу клітин та експлантів плаценти на яєчник було проведено дослідження методом парного культивування.

Яєчники тварин до культивування мали типову структуру (рис. 4.22). Ворота яєчників складались зі сполучної тканини з судинами. Основну частину складали генеративні елементи на різних стадіях розвитку: примордіальні фолікули, первинні, вторинні, атрофічні, жовті тіла. В фолікулах чітко візуалізувались ооцити, клітини теки та гранульози.

При морфологічному дослідженні яєчників, що короткочасно культивували в середовищі, не кондиційованому похідними плаценти відмічали збереженість загальної структури органу зі всіма елементами – строною, наявністю жовтих тіл, фолікулів на різних стадіях созрівання. Явища гіпергідратації та розривів тканини яєчника спостерігали в стромі та воротах яєчника (рис. 4.23, А, Б). Найбільш збереженими були жовті тіла та примордіальні фолікули, структура яких мало змінювалась. Найбільші зміни зазнавали вторинні та третинні фолікули – яйцеклітини зазнавали руйнування, клітини гранульози віддалялися від теки. Текальні клітини мало змінювалися. Ядра клітин були гіперхромні (рис. 4.23, В, Г).

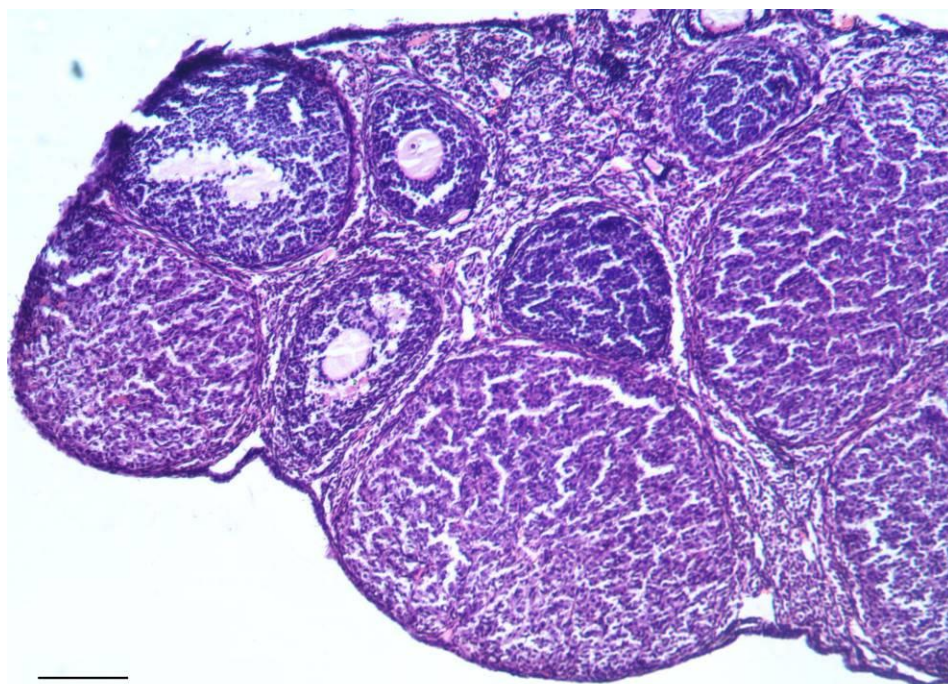


Рис. 4.22. Структура яєчників піддослідних тварин до культивування. Масштаба лінійка 100 мкм.

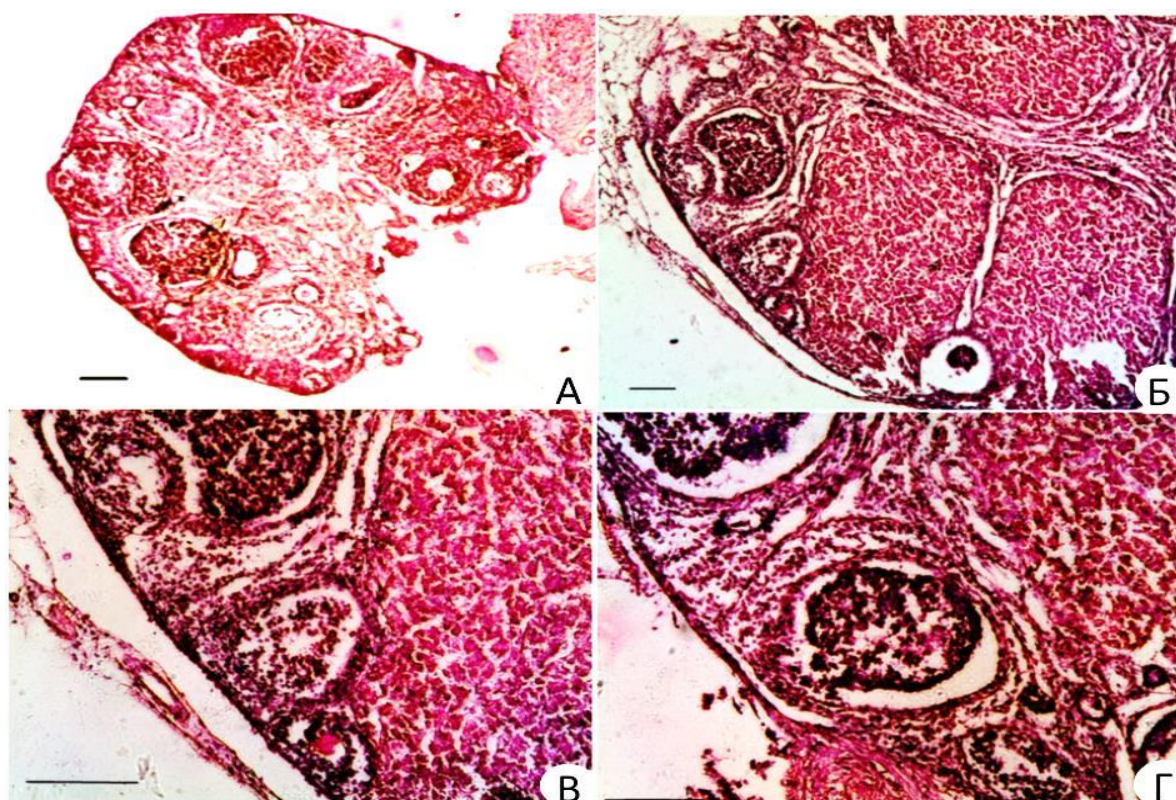


Рис. 4.23. Яєчник миші після короточасного культивування без додавання кондиційованих середовищ. А – загальна структури органу, Б, В – структура жовтих тіл, Г – структура окремих фолікулів. Масштабні лінійки 100 мкм. Зabarвлення гематоксилін – еозин.

Морфологічне дослідження яєчників, які культивували в середовищі, кондиційованому з кріокнсервованими, або нативними експлантами плаценти були більш збережені – без розривів в стромі, явища гіпергідратації не помітні (рис. 4.24, А). Ядра клітин більш гіперхромні, ніж в яєчниках без культивування. Структура фолікулів збережена. Клітини теки та гранульози розташовані правильно. Втім, частина яйцеклітин в третинних фолікулах зруйнована (рис. 4.24, Б, В). Жовті тіла збережені (рис. 4.24, Г).

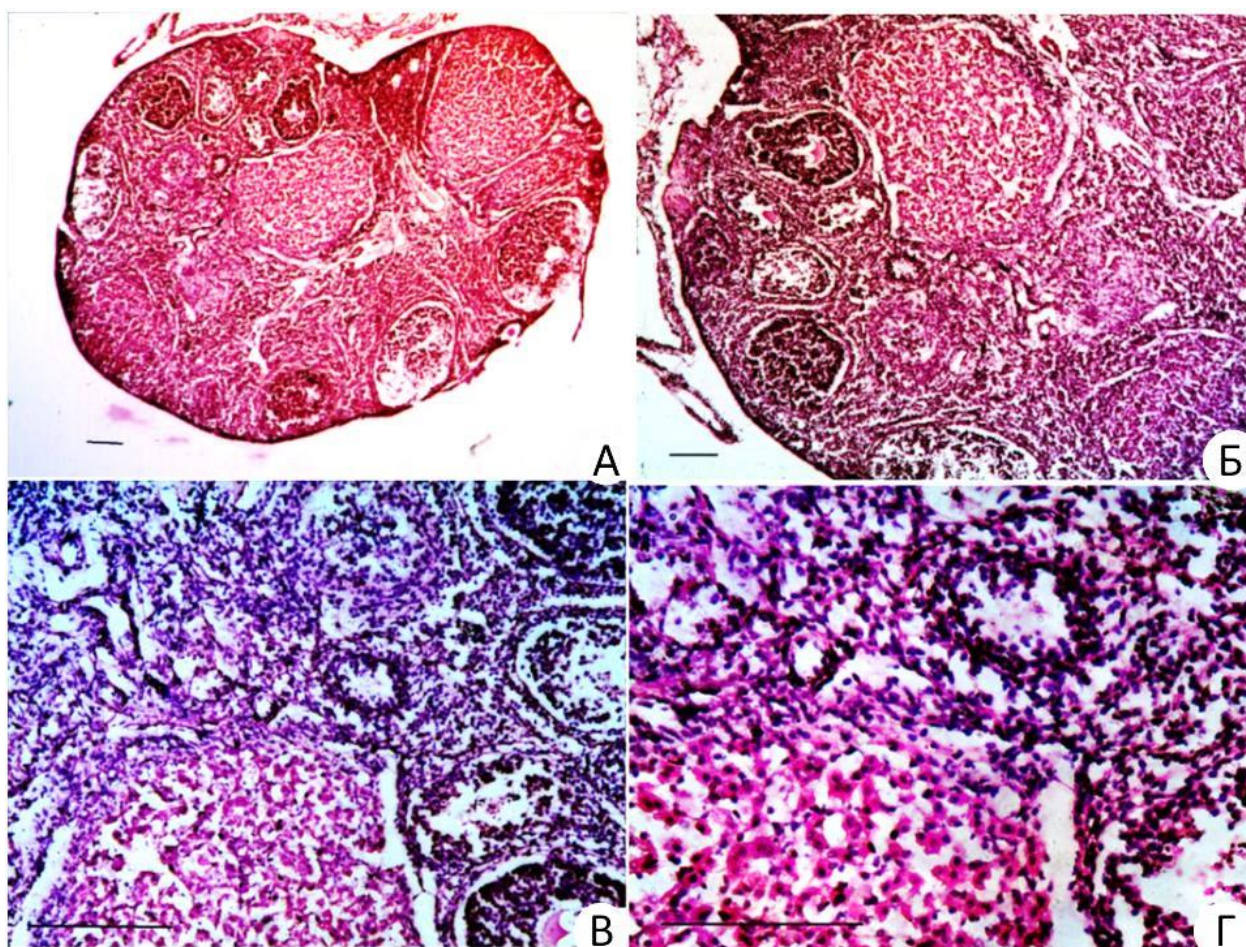


Рис. 4.24. Яєчник миші після короткочасного культивування з додаванням середовища, кондиційованого КЕП. А – загальна структури органу, В, С – структура окремих фолікулів, D – структура жовтих тіл. Масштабні лінійки 100 мкм. Забарвлення гематоксилін – еозин.

При морфологічному дослідженні яєчників тварин, що культивували з додаванням середовищ, кондиційованих ККП структура органу була збережена, з незначною гіпергідратацією, без розривів тканини (рис. 4.25, А).

В фолікулах нормальне розташування теки та гранульози, частина яйцеклітин не визначалась (рис. 4.25, Б, В). Жовті тіла збережені, клітин з гіперхромією ядер (рис. 4.25, Г).

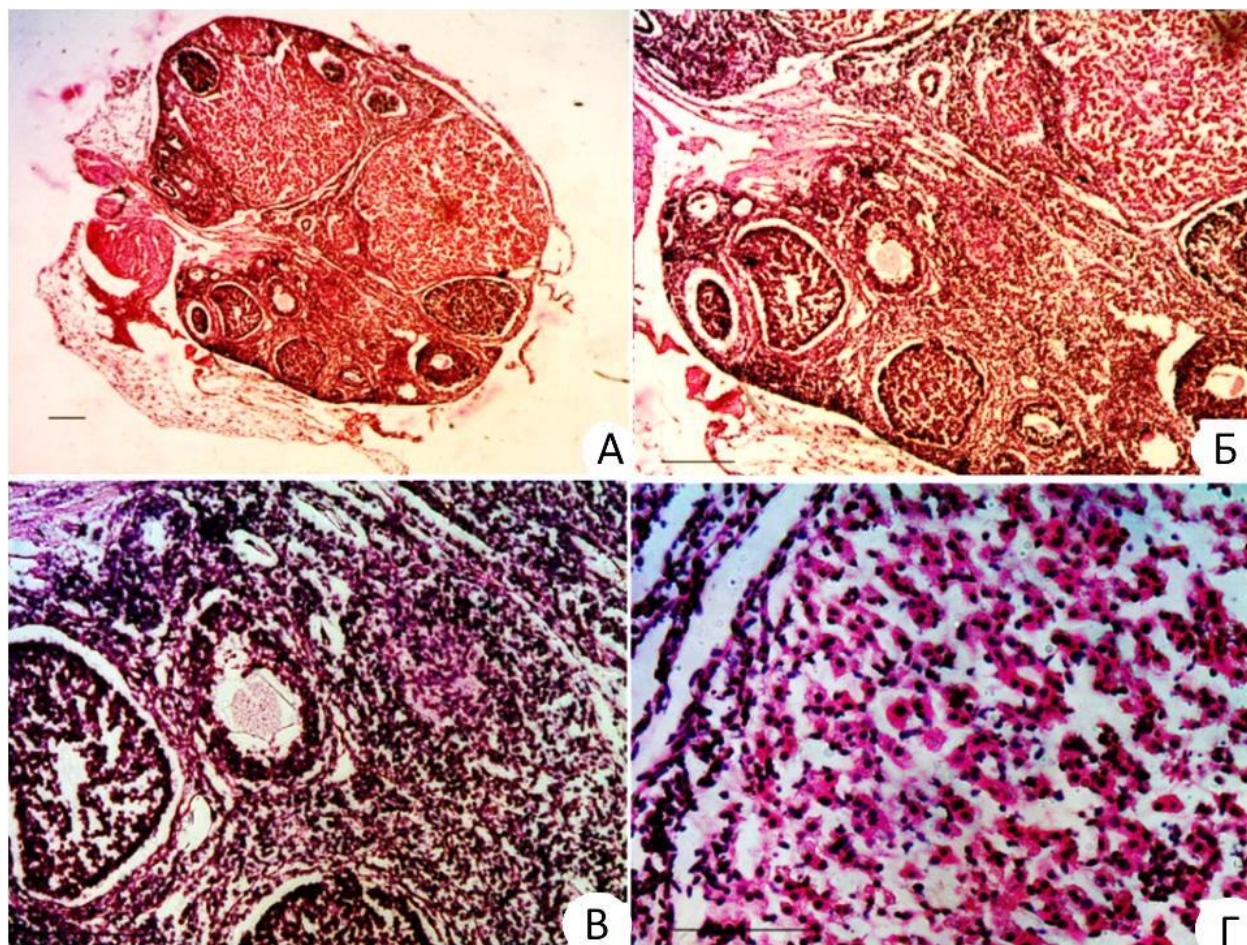


Рис. 4.25. Яєчник миші після короточасного культивування з додаванням середовища, кондиційованого ККП. А – загальна структури органу, Б, В – структура окремих фолікулів, Г – структура жовтих тіл. Масштабні лінійки 100 мкм. Забарвлення гематоксилін – еозин.

При дослідженні метаболічної активності органотипової культури яєчників методом відновлення резаурину виявлено, що всі культури незалежно від середовища культивування мають вірогідну відмінність від негативного контролю. Оптична щільність, якого дорівнювала $1,667 \pm 0,03$. Оптична щільність позитивного контролю дорівнювала $0,947 \pm 0,012$. Показники метаболічної активності яєчників, що культивували з середовищами, кондиційованими як нативними, так і кріоконсервованими

експлантами плаценти були вірогідно відмінні від позитивного контролю та свідчили про зниження метаболічної активності яєчників. Такі ж зміни спостерігали при культивуванні яєчників з середовищами, кондиційованими з нативними та кріоконсервованими клітинами плаценти: метаболічна активність знижувалась. Різниці між впливом різних похідних плаценти, як нативних, так і кріоконсервованих на культуру яєчників не виявлено (рис. 4.26.).

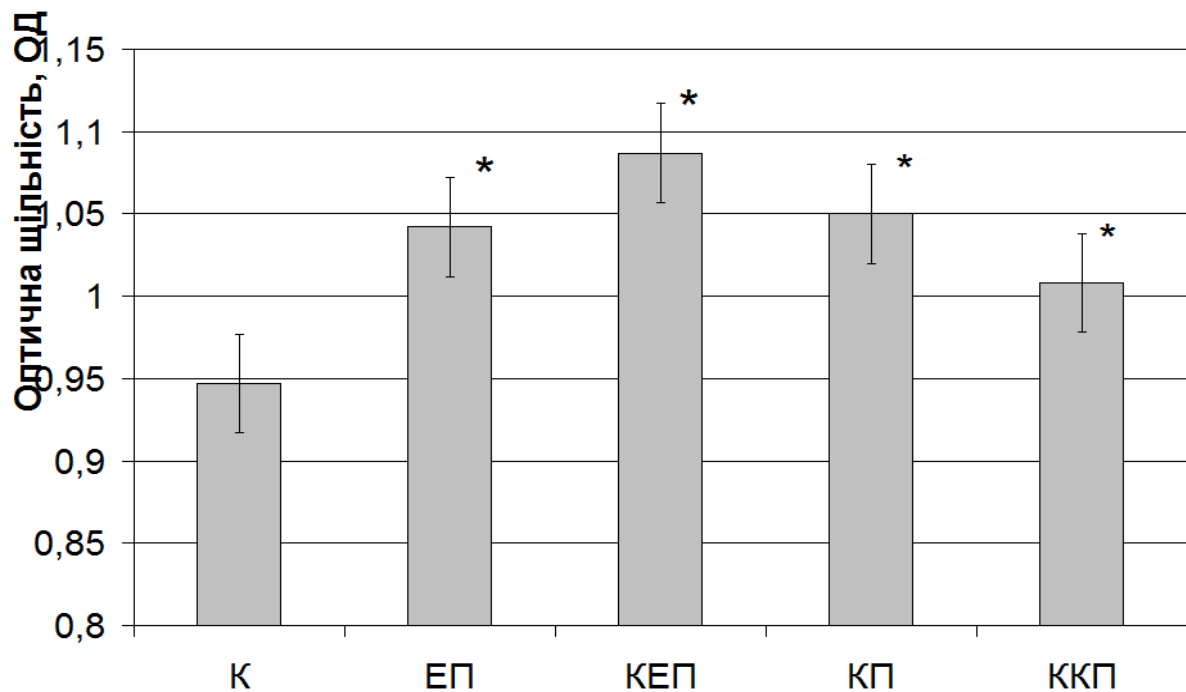


Рис. 4.26. Показники метаболічної активності яєчників мишей за даними тесту відновлення резазурину. К – позитивний контроль, ЕП – культивування з середовищами, кондиційованими нативними експлантами плаценти, КЕП – культивування з середовищами, кондиційованими кріоконсервованими експлантами плаценти, КП – культивування з середовищами, кондиційованими нативними клітинами плаценти, ККП – культивування з середовищами, кондиційованими кріоконсервованими клітинами плаценти. Показник середовища без маток дорівнював $1,678 \pm 0,03$.

Примітка: *- вірогідність різниць з позитивним контролем $p < 0,05$.

Отримані данні співпадають з даними морфологічного аналізу: структура яєчників, що культивували з середовищами, кондиційованими похідними плаценти є більш збереженою. Такий вплив похідних плаценти на

яєчники співпадає з тим, що відбувається при вагітності. Так функція яєчників при вагітності пригнічена, фолікулогенез відсутній, вся гормональна функція здійснюється завдяки плаценті. Це можна пояснити дією хоріонічного гонадотропіну, який продукується похідними плаценти. Вплив кріоконсервованих та нативних похідних плаценти на тканини яєчників при органотиповому культивуванні не відрізняється. Різниця між впливом клітин та експлантів плаценти на яєчники також не була статистично вираженою.

Висновки до розділу

При дослідженні впливу похідних плаценти в ізольованих системах *in vitro* виявлено ряд закономірностей. Важливим є те, що вплив нативних та кріоконсервованих похідних плаценти не відрізняється між собою при дії на всі об'єкти, які були досліджені. Це підтверджує висновки попереднього розділу про можливість ефективного кріоконсервування та довгострокового зберігання похідних плаценти без значної зміни властивостей.

Середовища, кондиційовані похідними плаценти по-різному впливають на різні клітини та тканини репродуктивної системи. Їх вплив має властивості гуморальних факторів, що продукуються стовбуровими клітинами і плацентою при нормальній вагітності.

Відсутність впливу середовищ, кондиційованих похідними плаценти на фібробласти може пояснюватися тим, що вони не є специфічною мішенню для біологічно активних речовин плацентарного походження. Дані літератури щодо фібробластів є досить суперечливими. Описані явища стимуляції фібробластів шкіри плацентарними факторами [300] і попередження фіброзу за допомогою похідних плаценти [100, 258, 277]. При вагітності спостерігається перерозподіл рідини в компонентах сполучної тканини, але не її проліферація [17]. Отримані дані дозволяють при подальшому органотиповому культивуванні яєчників та маток виключити властивості сполучної тканини цих органів.

Вплив середовищ, кондиційованих ККП та КЕП на нейроклітини є очікуваним, враховуючи ефективність похідних плаценти та стовбурових клітин в лікуванні нейродегенеративних захворювань та їх нейропротекторні властивості [106, 173, 194].

Реакція спленоцитів співпадає з літературними даними про імуносупресивний та імуномодулюючий вплив, стовбурових клітин [204], плаценти при вагітності [113, 273] та даними по експериментальному застосуванню похідних плаценти при лікуванні аутоімунної патології [144]. Описані зміни реалізуються через підвищення синтезу IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 та IL-13, TGF-beta, VEGF, hepato-cyte growth factor, prostaglandin E2, indoleamine 2,3-dioxygenase enzyme та зниження IL-2, IL-6, TNF, IF-gamma [83, 196, 302].

Вплив похідних плаценти на клітини яєчників та матки подібний до того, що спостерігається при вагітності [154]. Так функція яєчників при вагітності пригнічена, фолікулогенез відсутній, вся гормональна функція здійснюється завдяки плаценті. В матці навпаки спостерігається гіперплазія ендометрію, збільшення розміру, кровообігу. Це можна пояснити дією хоріонічного гонадотропіну, який продукується похідними плаценти [113]. При імплантації похідних плаценти здоровим тваринам в попередніх дослідженнях також спостерігається пригнічення фолікулогенезу та затримку виникнення вагітності, інші дослідники довели зниження ароматазної активності яєчників та подовження існування жовтих тіл під дією плацентарних факторів [85, 122].

Отримані данні дозволяють припустити, що механізми впливу похідних плаценти реалізуються через елементи нервові, імунної та репродуктивної системи, та їх застосування може бути доцільним при патології репродукції.

Результати розділу опубліковані в роботах [9, 24, 26, 30, 33, 53, 56, 59] додатку А.

РОЗДІЛ 5. ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ КРІОКОНСЕРВОВАНИХ ПОХІДНИХ ПЛАЦЕНТИ НА ПЕРЕБІГ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ГІНЕКОЛОГІЧНОЇ ПАТОЛОГІЇ

Плацента та її похідні в силу своїх фізіологічних функцій мають тропізм до органів репродуктивної системи та можуть бути ефективними в лікуванні саме репродуктивної патології. Відомо, що перебіг ряду захворювань змінюється під час вагітності та після її закінчення. Для виявлення цих механізмів необхідно по-перше з'ясувати вплив похідних плаценти на репродуктивну систему в фізіологічних умовах, а по-друге на репродуктивну систему при патологічному процесі.

5.1. Дослідження впливу кріоконсервованих похідних плаценти на репродуктивну систему інтактних тварин

Основними процесами, що характеризують функціонування жіночої репродуктивної системи є естральний цикл та фертильність. Естральний цикл залежить від розвитку фолікулів в яєчниках, та відображаються на змінах в органах мішенях – матці та піхві. Фертильність характеризується можливістю завагітніти, часом від спарювання до настання вагітності, кількістю, масою, зрілістю та здоров'ям плодів. Оскільки за даними літератури та попередніх розділів найбільш збереженими та активними похідними плаценти є КЕП, властивості яких не відрізняються від нативних зразків саме вони були застосовані в дослідженні.

5.1.1. Дослідження впливу кріоконсервованих похідних плаценти на естральний цикл та морфологію репродуктивних органів

Досліджуючи вплив КЕП на оваріальний цикл та загальний стан тварин було виявлено, що протягом 2-х тижнів до лікування, регулярний чотириденний цикл у групі 1 – був у 7, у групі 2 – у 8 тварин. Вага мишей

дорівнювала $20,6 \pm 1,2$ г та $20,2 \pm 0,9$ г середній бал загального стану – $4,8 \pm 0,2$ та $4,7 \pm 0,3$ відповідно.

Після лікування та спостереження протягом 2-х місяців регулярний естральний цикл був у всіх тварин групи 1 (що отримала КЕП) та у 7-ми тварин групи 2 (без лікування). Середній бал загального стану складав $4,7 \pm 0,7$ та $4,8 \pm 0,3$, вага – $23,3 \pm 1,1$ та $22,5 \pm 0,9$ г відповідно, що є фізіологічною нормою у цьому віці. Статистично достовірної різниці між групами не знайдено.

При вивченні статеві функції за методом вагінальних пробок було встановлено, що застосування КЕП не впливає на кількість статевих контактів. Протягом естрального циклу у всіх самиць обох груп виявляли вагінальні пробки.

Гістологічне дослідження яєчників у обох групах показало збереження фолікулярного апарата, строми та кровообігу, спостерігали деяке збільшення розмірів яєчників у групі з КЕП та зменшення кількості зріючих фолікулів (табл. 5.1, рис. 5.1).

Таблиця 5.1

**Кількість генеративних елементів в яєчниках самиць мишей
досліджуваних груп ($M \pm m$)**

Показники	Контроль	КЕП
Примордіальні фолікули	$3,7 \pm 1,4$	$4,4 \pm 1,0$
Первинні фолікули	$2,1 \pm 0,6$	$2,7 \pm 0,9$
Вторинні фолікули	$8,7 \pm 0,6$	$4,1 \pm 0,9^*$
Третинні фолікули	$0,3 \pm 0,2$	$0,6 \pm 0,7$
Атретичні фолікули	$2,7 \pm 1,0$	$3,8 \pm 1,8$
Жовті тіла	$2,2 \pm 0,7$	$2,7 \pm 0,7$

Примітки: * – вірогідність різниці з контролем, $p < 0,05$.

Під час дослідження матки тварин із КЕП спостерігали різку гіпертрофію як матки в цілому, так і ендометрію зокрема, підвищення кількості залоз (рис. 5.1, табл. 5.2).

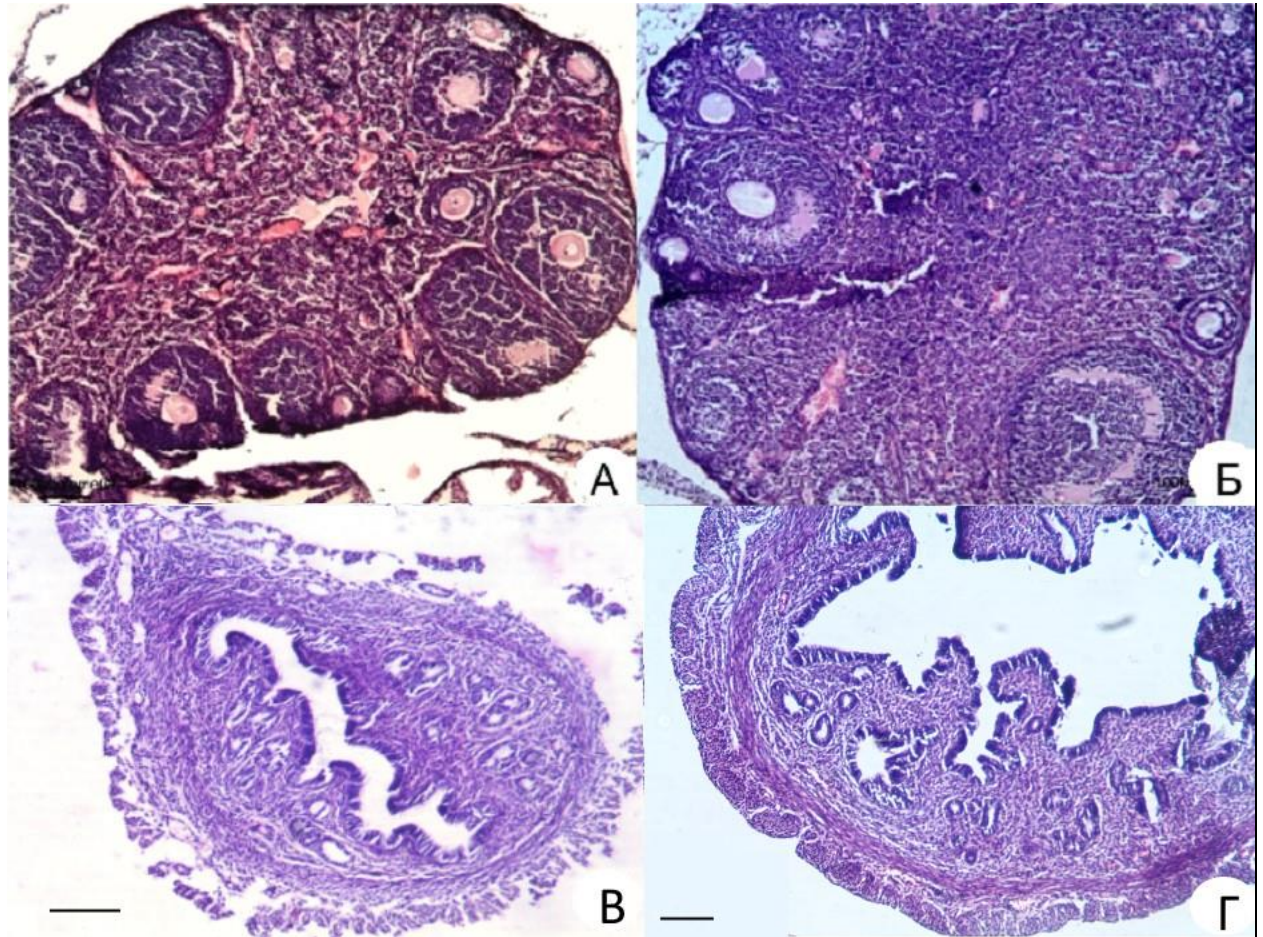


Рис. 5.1. Структура яєчників та матки інтактної групи та групи після застосування КЕП: А – яєчник інтактної миші, Б – яєчник після КЕП, В – матка інтактної миші, Г – матка тварини після застосування КЕП. Забарвлення гематоксилін-еозином. Масштабні лінійки 100 мкм.

З цього слідує, що КЕП чинять позитивний трофічний ефект на органи репродуктивної системи. Застосування похідних плаценти можливе при патологічних станах з атрофічними явищами, що було показано на моделі яєчничкової недостатності після хіміотерапії [314]. Ці зміни можуть бути обумовлені дією хоріонічного гонадотропіну людини, описаною L.A. Cole

[113]. В той же час вони статистично не впливають на загальні показники здорових тварин репродуктивного віку.

Таблиця 5.2

Морфометричні показники маток самиць щурів досліджуваних груп ($M \pm m$)

Показники	Контроль	КЕП
Кількість поодиноких залоз ендометрію на зрізі	$4,1 \pm 1,2$	$12,5 \pm 1,8^*$
Кількість груп залоз на зрізі	$4,1 \pm 0,5$	$3,8 \pm 2,1$
Діаметр залоз, мкм	$22,1 \pm 3,9$	$48,5 \pm 8,5^*$
Товщина ендометрію, мкм	$63,2 \pm 8,3$	$115,5 \pm 9,8^*$
Товщина міометрію, мкм	$20,3 \pm 3,2$	$52,3 \pm 6,1^*$

Примітки: * – вірогідність різниці з контролем, $p < 0,05$.

5.1.2. Дослідження впливу кріоконсервованих похідних плаценти на фертильність

При дослідженні репродуктивних показників тварин після застосування КЕП продемонстровано, що незважаючи на нормалізацію естрального циклу у тварин після застосування КЕП, вагітність настає вірогідно пізніше (табл. 5.3). Це може бути пов'язане з інгібуванням овуляції хоріонічним гонадотропіном людини. Спостерігалось збільшення кількості та маси плодів у основній групі, однак ці дані не мали значущих відмінностей від контролю.

Отримані данні по впливу КЕП на репродуктивну систему здорових тварин співпадають з даними, з попереднього розділу, в якому було продемонстровано, що середовища, кондиційовані похідними плаценти чинять позитивний трофічний ефект на матку, стимулюючи її метаболічну активність та пригнічують метаболічну активність яєчників.

Таблиця 5.3

Вплив КЕП на репродуктивні показники ($M \pm m$)

Група тварин	Час від спарювання до пологів, діб	Кількість плодів	Середня вага плодів, г
Введення КЕП	$38,2 \pm 3,5^*$	$8,1 \pm 1,4$	$1,3 \pm 0,2$
Інтактні (контроль)	$25,3 \pm 1,2$	$6,2 \pm 1,1$	$1,1 \pm 0,1$

Примітка: * – різниця статистично значуща порівняно з контролем, $p < 0,05$

5.2. Дослідження впливу кріоконсервованих похідних плаценти на перебіг експериментальної гінекологічної патології

Більшість патологічних процесів, що уражують жіночу репродуктивну систему належать до інфекційних, аутоімунних, ендокринних, ішемічних патологічних процесів, або післяопераційних ускладнень. Виявлення показань та протипоказань до застосування похідних плаценти при цих патологічних станах є першочерговою задачею. Наявність різних кріоконсервованих похідних плаценти з різним періодом функціонування та можливістю введення дозволяють застосовувати їх в відповідності до патологічного процесу.

5.2.1. Дослідження впливу кріоконсервованих похідних плаценти на перебіг запальних процесів

Після моделювання інфекційного процесу відмічали, що у групі із застосуванням КЕП кількість тварин, які завагітніли, була значуще меншою, ніж у контрольній групі та групі запалення без лікування (табл. 5.4). Вагітність після лікування також наставала вірогідно пізніше, що може бути пов'язано як з пригніченням функції яєчників, продемонстрованою в попередніх розділах, так і з проявами та ускладненнями інфекційного

процесу. Кількість плодів після застосування КЕП значуще зменшувалася при порівнянні з хибнооперованими та нелікованими тваринами. Враховуючи те, що при дії КЕП на здорових тварин кількість плодів не зменшувалась, це можна пов'язати з активізацією інфекційного процесу. Середня маса плодів вірогідно не відрізнялася у всіх групах дослідження.

Таблиця 5.4

**Репродуктивні показники у досліджуваних групах при
моделюванні інфекційного процесу**

Група тварин	Кількість тварин, які завагітніли, %	Час від спарювання до пологів, дів	Кількість плодів	Середня маса плодів, г
Запалення + КЕП	40,0*	62,3 ± 5,4*,**	5,0 ± 0,2*,**	1,2 ± 0,2
Запалення	80,0	25,4 ± 2,2	6,1 ± 0,3*	1,3 ± 0,5
Хибнооперовані	90,0	26,4 ± 2,1	7,9 ± 0,4	1,1 ± 0,2

Примітка: * - різниця статистично значуща у порівнянні з контролем (хибнооперовані тварини), ** - різниця статистично значуща у порівнянні групою з запаленням без застосуванням КЕП, $p < 0,05$.

Після закінчення експеримента під час аутопсії виявлено поодинокі спайки I – II ступеня у хибнооперованих тварин. Ці спайки не перекривали кінцеві відділи маткових труб, не закривали яєчники. У мишей групи з запаленням без лікування спайки спостерігали практично в усіх випадках, але частіше це були спайки II-III ступеню, без утворення конгломератів, залишків запалення та міжпетльових абсцесів. У тварин групи з запаленням та введення КЕП важкість спайкового процесу прогресувала, часто з включенням у конгломерат яєчників, матки, печінки (рис. 5.2.). У більшості

тварин спостерігали спайковий процес II-IV ступеню (табл. 5.5.). У трьох тварин відмічали міжпетлеві абсцеси.

Морфологічне дослідження органів у тварин з міжпетльовими абсцесами показало наявність септичних явищ. Так, у матці визначали різку атрофію, зближення клітин, зморщення сполучної тканини, гіперхромію ядер, звуження судин, лейкоцитарну інфільтрацію, спадіння кровоносних судин (рис. 5.3, А). При дослідженні яєчників спостерігали атрофічні явища, лейкоцитарну інфільтрацію, відсутність фолікулів, які розвиваються (рис. 5.3, Б), Втім візуалізувались яйцеклітини, що свідчить про можливість відтворення фолікулярного апарату після реконвалісценції.

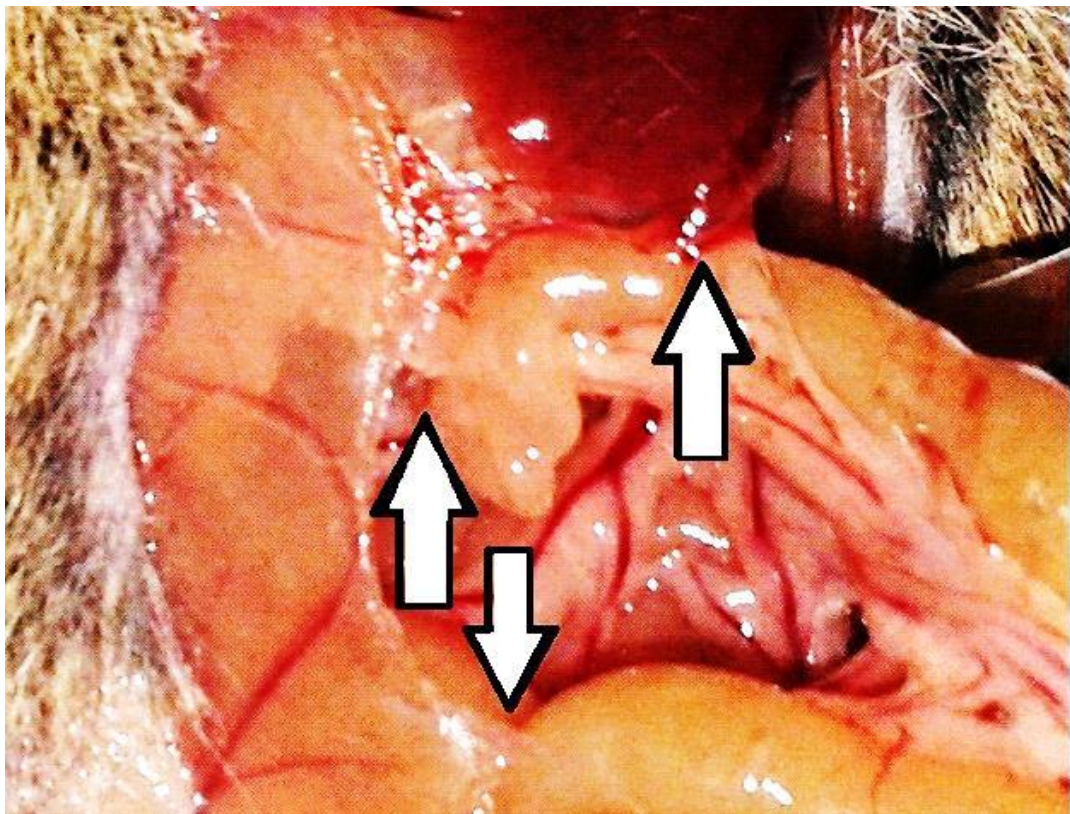


Рис. 5.2. Спайки між кишковиком, печінкою та червеною стінкою в групі тварин з моделюванням інфекційного процесу після застосування КЕП. Стрілками показано спайки між кишечником, печінкою та червеною стінкою. Яєчник та матка закрити в конгломераті кишечнику.

Також були досліджені внутрішні органи цих тварин. Клубочки та каналці нирок були значно набряклими, з крововиливами у тканину (рис.

5.4, А), у селезінці відзначалося значне зростання білої пульпи (рис. 5.4, Б). В печінці спостерігали порушення балочної структури, набряк, гетерохромію ядер (рис. 5.4, В). В міокарді – явища лейкоцитарної інфільтрації та крововиливів (рис. 5.4, Г). Ці зміни, характерні для септичного процесу, який моделюється методом перев'язки та пункції, підтверджують вплив даної моделі на репродуктивні органи. У внутрішніх органах морфологічну картину можна трактувати як поліорганну недостатність, що характерна для сепсису.

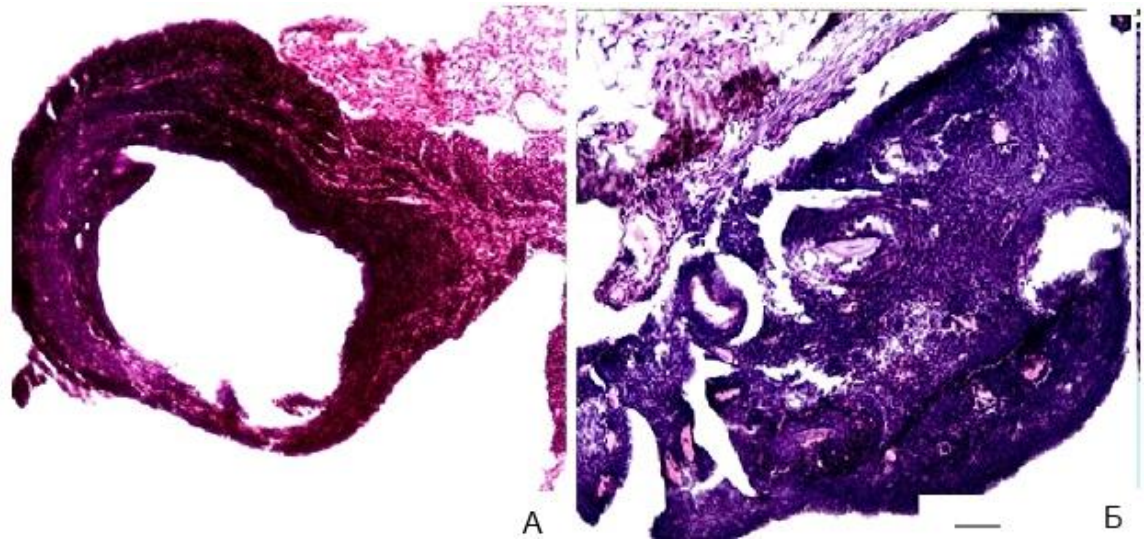


Рис. 5.3. Структура репродуктивних органів мишей з інфекційним процесом. А – матка, Б – яєчник. Забарвлення гематоксилін-еозином. Масштабні лінійки 100 мкм.

Таблиця 5.5

Ступінь спайкового процесу в досліджуваних групах при моделюванні інфекційного процесу, %

Група тварин	I (поодинокі спайки)	II (спайки біля матки та яєчників)	III (спайки з кишковником)	IV (конгломерат у черевній порожнині)
Запалення + КЕП	0	60	10	30
Запалення	20	50	20	0
Хибнооперовані	20	20	0	0

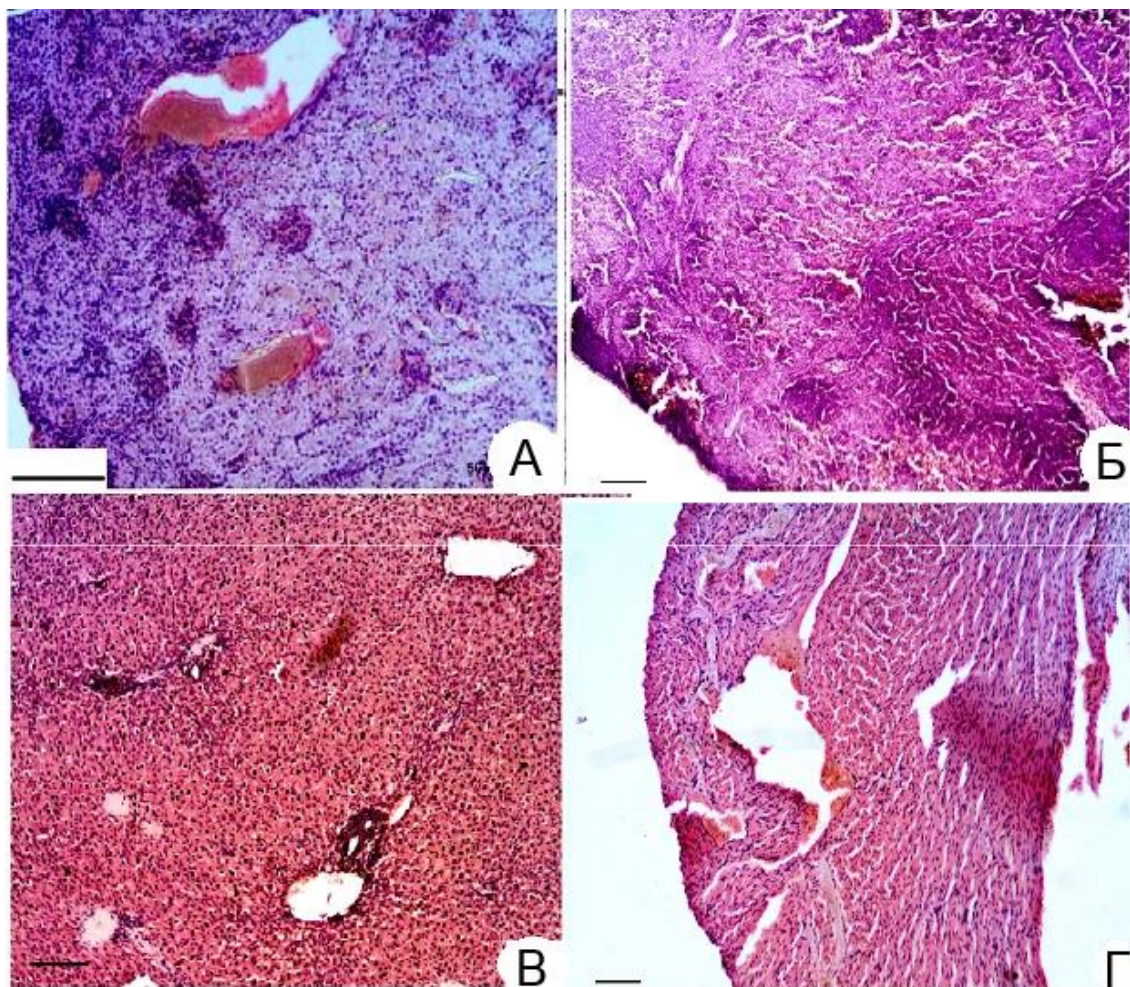


Рисунок 5.4. Структура внутрішніх органів мишей з інфекційним процесом. А – нирка, Б – селезінка, В – печінка, Г - міокард. Забарвлення гематоксилін-еозином. Масштабні лінійки 100 мкм.

Такий негативний вплив КЕП на перебіг інфекційного процесу можна пояснити тим, що час вагітності спостерігається перебудова імунної відповіді за Th2-типом, більш толерогенним варіантом та можливе загострення хронічних інфекційних захворювань. Подібний імуносупресивний ефект мають стовбурові клітини, виділені з плацентарного матеріалу. Ці дані пояснюють загострення та пролонгування інфекційного процесу у тварин із КЕП. Таким чином, наявність гострого чи несанованого інфекційного процесу в організмі, на наш погляд, може бути протипоказанням до застосування плацентарного матеріалу.

5.2.2. Дослідження впливу кріоконсервованих похідних плаценти на перебіг аутоімунної патології (антифосфоліпідний синдром)

АФС є аутоімунним синдромом, при якому проходить продукція антитіл до власних фосфоліпідів. Частіше всього це проходить після інфекційного процесу, оскільки деякі фосфоліпіди, як кардіоліпін, що у людини знаходяться в мітохондріях або замасковані глікопротеїдами у бактерій експресуються на поверхні та входять до складу бактеріальних антигенів. Виробка антитіл до фосфоліпідів, яких багато в тромбоцитах та ендотелії призводить до коагулопатичних порушень, що при вагітності призводить до репродуктивних втрат [87, 272]. Тому терапія АФС повинна включати як десенсибілізацію, так і антикоагулянтну терапію.

В досліджуваних групах через 1 тиждень після моделювання патології та початку лікування спостерігали характерні для АФС зміни. Швидкість згортання крові в групах з АФС як з лікуванням, так і без лікування вірогідно підвищувалася, достовірної різниці між групами не було (табл. 5.6.).

Таблиця 5.6

Показники згортання крові, кількості тромбоцитів та реакції бласттрансформації лімфоцитів у експериментальних тварин через тиждень після лікування ($M \pm m$)

Група тварин	Згортання крові за Морвіцем, хв	Тромбоцити $\times 10^3/\text{мл}$	Реакція бласттрансформації лімфоцитів спонтанна, %
АФС	$3,4 \pm 0,6^*$	$91,9 \pm 19,6^*$	$20,1 \pm 0,9^*$
АФС+КЕП	$5,7 \pm 0,8^*$	$185,2 \pm 19,3^{*,**}$	$10,2 \pm 0,7$
Інтактні	$7,8 \pm 1,5$	$241,2 \pm 15,9$	$11,3 \pm 1,1$

Примітка: * - різниця статистично значуща у порівнянні з інтактними тваринами, ** - різниця статистично значуща у порівнянні з групою з АФС без введення КЕП, $p < 0,05$.

Тромбоцитопенія, характерна для АФС також спостерігалась в обох групах, де моделювали патологію, але вона була значно менша в групі з лікуванням. Спонтанна реакція бласттрансформації лімфоцитів була вище лише в групі з моделюванням АФС без лікування. Через три тижні після лікування швидкість згортання крові в групі з АФС та лікуванням КЕП вже вірогідно відрізнялась від показника тварин без лікування, але не досягала нормального рівня (табл. 5.7.). Різниця в показниках кількості тромбоцитів та реакції бласттрансформації між групами залишилась такою, як біла на першому тижні після лікування.

При гістологічному дослідженні маток визначали деяку атрофію в групі з АФС без лікування. Стоншувалися всі шари маток, насамперед ендометрій, зменшення кількості залоз ендометрію (рис. 5.5.). Матки тварин після АФС та лікування КЕП навпаки, були гіпертрофованими, мали підвищену кількість залоз ендометрію та складок внутрішнього шару.

Яєчники тварин груп з АФС мало відрізнялися між собою та від яєчників інтактних мишей (рис. 5.6.). Всі вони мали достатню кількість генеративних елементів на різних стадіях розвитку. Розміри яєчників також мало відрізнялися між собою.

Таблиця 5.7

**Показники згортання крові, кількості тромбоцитів та реакції
бласттрансформації лімфоцитів у експериментальних тварин через три
тижні після лікування ($M \pm m$)**

Група тварин	Згортання крові за Морвіцем, хв	Тромбоцити $\times 10^3/\text{мл}$	Реакція бласттрансформації лімфоцитів спонтанна, %
АФС	$4,1 \pm 0,7^*$	$86,5 \pm 13,7^*$	$15,3 \pm 1,2^*$
АФС+КЕП	$5,9 \pm 0,9^{*,**}$	$168,2 \pm 17,0^{*,**}$	$7,2 \pm 1,1$
Інтактні	$8,1 \pm 0,5$	$236,3 \pm 17,2$	$9,8 \pm 0,7$

Примітка: * - різниця статистично значуща у порівнянні з інтактними

тваринами, ** - різниця статистично значуща у порівнянні з групою з АФС без введення КЕП, $p < 0,05$.

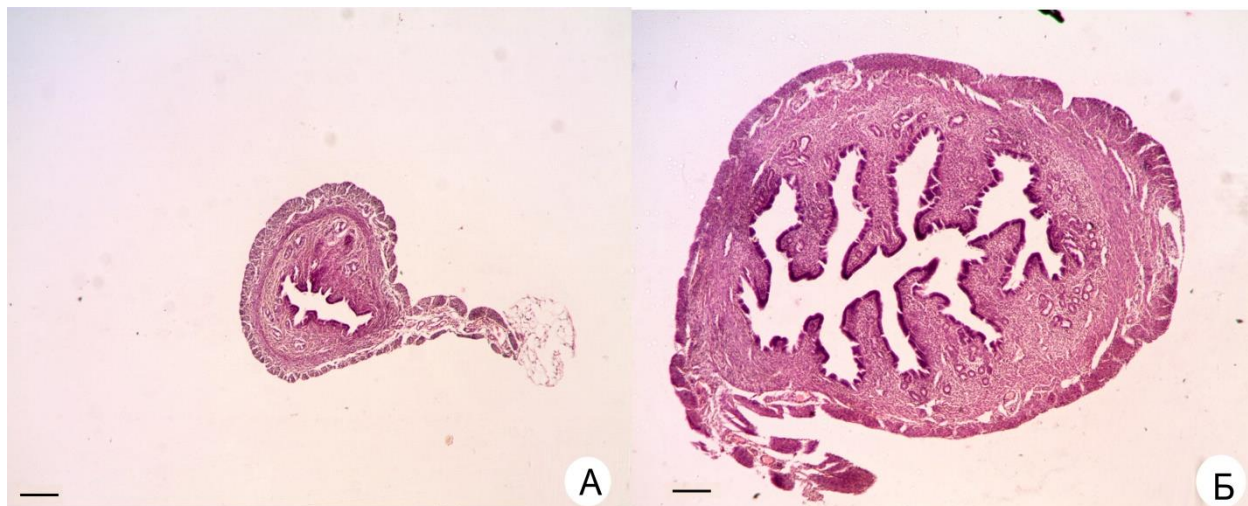


Рис. 5.5. Структура маток мишей із АФС: А – матка тварини з АФС, Б – матка тварини з АФС та лікуванням КЕП. Зabarвлення гематоксилін-еозином. Масштабні лінійки 200 мкм.

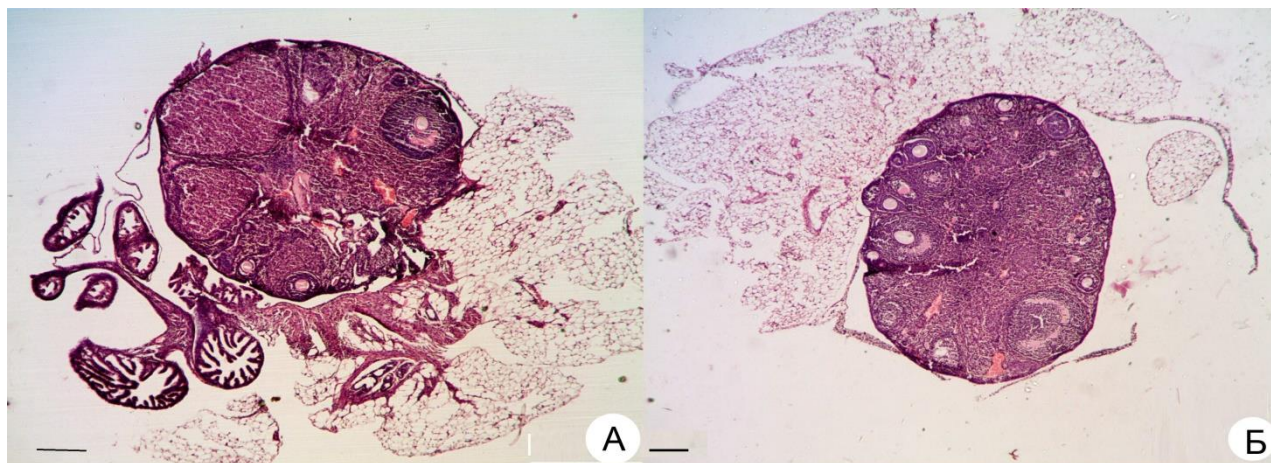


Рис. 5.6. Структура яєчників мишей із АФС: А - яєчник тварини з АФС, Б – яєчник тварини з АФС та лікуванням КЕП. Зabarвлення гематоксилін-еозином. Масштабні лінійки 200 мкм.

При дослідженні селезінок тварин з АФС як без лікування так і після лікування, їх структура мало відрізнялась кількість білої та червоної пульпи та її розташування була такою ж самою (рис. 5.7.). При цьому константували

збільшення площі білої пульпи є порівнянні з контролем.

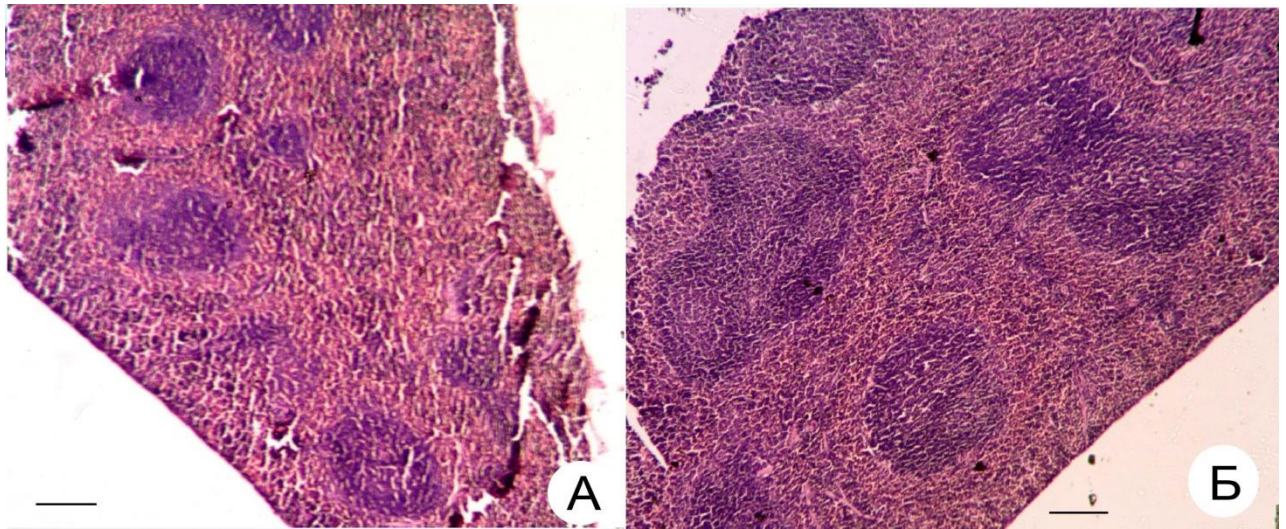


Рис. 5.7. Структура селезінок мишей із АФС: А - селезінка тварини з АФС, Б – селезінка тварини з АФС та лікуванням КЕП. Забарвлення гематоксилін-еозином. Масштабні лінійки 200 мкм.

Під час дослідження репродуктивних показників (табл. 5.8) виявлено, що у тварин групи з АФС вірогідно знижується кількість плодів, а в групі 3 АФС після лікування кількість плодів вірогідно не зменшувалась. В групі контролю репродуктивних втрат не виявлено. Половина тварин з АФС мали резорбції, які є аналогом переривання вагітності на ранніх строках гестації. В інших групах таких змін не спостерігали. Втім в групі тварин після лікування спостерігали мертвих плодів, навіть в більшій кількості, ніж в групі з АФС без лікування. З цього можна зробити висновок, що декомпенсовані дисциркуляторні порушення у цих тварин наступали пізніше, були менш виражені та плоди встигали дорости практично до пологів. Середня маса плодів була вірогідно знижена в обох експериментальних групах, що також свідчить про декомпенсовані трофічні порушення. Маса плацент вірогідно не змінювалися у всіх групах. Але для розуміння процесів плацентарної дисфункції більш важливим є структурні зміни, оскільки маса плацент може підвищуватися як за рахунок нормальної структури лабіринту, так і за рахунок тромбів, чи сполучної тканини.

При морфологічному дослідженні плацент тварин з АФС (рис. 5.7. А, Б) спостерігали тромбози, крововиливи, відкладення фібриноідноподібної субстанції та розростання сполучної тканини.

Таблиця 5.8

Показники репродуктивної функції у експериментальних тварин з АФС ($M \pm m$)

Показники	Група тварин		
	АФС+КЕП	АФС	Інтактні
Кількість плодів	$6,8 \pm 0,5$	$5,2 \pm 0,3^*$	$8,3 \pm 0,7$
Тварин з резорбцією, %	0	50*	0
Тварин з мертвими плодами, %	40*	20*	0
Середня маса плоду, г	$0,7^* \pm 0,05$	$0,7^* \pm 0,04$	$1,06 \pm 0,03$
Середня маса плаценти, г	$0,19 \pm 0,003$	$0,18 \pm 0,007$	$0,22 \pm 0,02$

Примітка:* – різниця статистично значуща у порівнянні з інтактними тваринами, $p < 0,05$.

В плацентах загиблих плодів (рис. 5.7. В, Г) кровообіг був зменшений, лабіринт спадався, велика площа плацент була замінена сполучною тканиною. Вірогідно загибель плодів відбулася через недостатнє кровопостачання через тромбози та сполучнотканинну трансформацію плацент.

При дослідженні плацент мишей з АФС після лікування КЕП спостерігали невелику кількість тромбозів по периферії плацент (рис. 5.8.) порожнини лабіринту не звужені, розростання сполучної тканини не спостерігали.

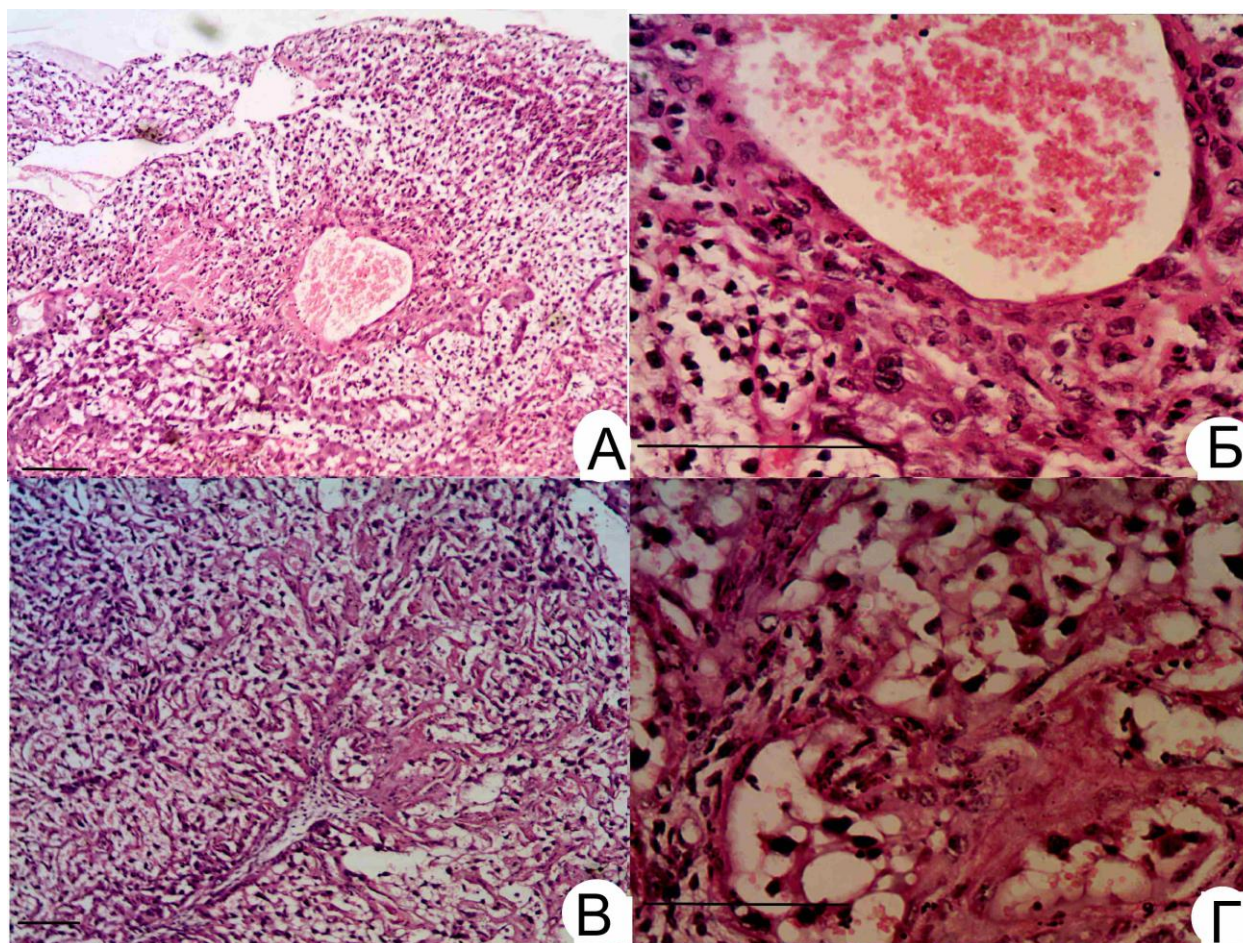


Рис. 5.7. Структура плацент мишей із АФС без лікування: А, Б - плацента тварини з АФС, В, Г - плацента тварини з АФС від загиблого плоду. Забарвлення гематоксилін-еозином. Масштабні лінійки 100 мкм.

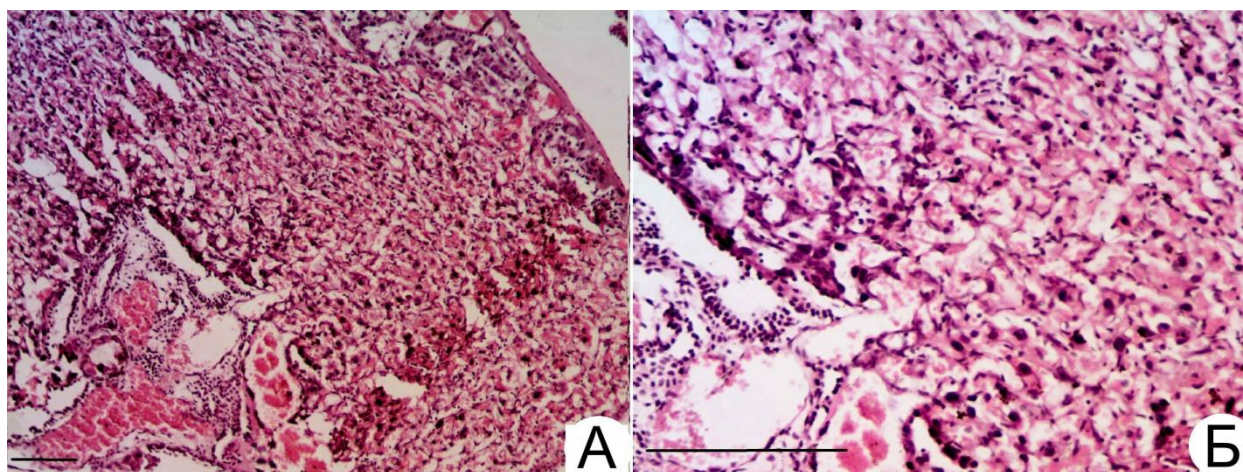


Рис. 5.8. Структура плацент мишей із АФС з КЕП. Забарвлення гематоксилін-еозином. Масштабні лінійки 100 мкм.

Таким чином в даній моделі АФС спостерігаються активація імунної

відповіді, яка веде до коагулопатії, атрофічних змін в матці, вірогідніше всього без участі яєчників. Репродуктивні втрати відбуваються вже на ранніх етапах вагітності за рахунок дисциркуляторних змін та тромбозів. Застосування КЕП частково пригнічує імунну відповідь, компенсує коагулопатію та атрофічні зміни в матці. Реологічні порушення при АФС без лікування більш виражені, та призводять до переривання вагітності вже на ранніх етапах. Тоді, як після лікування декомпенсація настає перед пологами – на межі напруження плацентарного кровообігу. Це свідчить про те, що при АФС необхідно проводити антикоагулянтну терапію, оскільки прегравідарної підготовки з КЕП не вистачає для подолання аутоімунної відповіді та реологічних порушень. Застосування похідних плаценти при ураженні репродуктивної системи за рахунок аутоімунних та реологічних механізмів є доцільним.

5.2.3. Дослідження впливу кріоконсервованих похідних плаценти на перебіг ендокринної патології (синдром полікістозних яєчників)

СПКЯ є однією з найроповсюджених ендокринних патологій, що впливає на репродуктивну систему, призводить до порушення оваріально-менструального циклу, непліддя та загальних змін в організмі. Механізми розвитку СПКЯ можуть бути різними, але вони призводять до однакової клінічної картини – аменореї, гіперестрогенії, кіст яєчників та порушення співвідношення генеративних елементів яєчників.

В дослідженні була застосована модель СПКЯ, заснована на блокуванні прогестеронових рецепторів.

У всіх щурів, що застосовували в експерименті спостерігали нормальний естральний цикл за даними цитологічного дослідження мазків. При гістологічному дослідженні яєчників вони мали типову структуру (рис. 5.9, А). В воротах яєчників знаходили судини та сполучна тканина. В зовнішніх шарах знаходились генеративні елементи яєчників на всіх стадіях

розвитку: примордіальні, первинні, вторинні фолікули та жовті тіла. В фолікулах знаходились ооцити нормальною морфологією (рис. 5.9, Б). Матки також мали типову структуру (рис. 5.9, В) з розвинутими м'язовим та серозним шарами. Шаром ендометрію був також добре розвинутим, вкритий великими циліндричними клітинами (рис. 5.9, Г), в стромі знаходили достатню кількість залоз ендометрію. Після спарювання з самцями 90% тварин завагітніло та народило в середньому через 25 діб (табл. 5.7.).

Після моделювання СПКЯ у щурів групи без лікування спостерігали різке збільшення яєчників, масовий коефіцієнт яких майже удвічі перевищував нормальні показники (табл. 5.6.). Масовий коефіцієнт матки статистично не відрізнявся від норми. У всіх тварин протягом місяця реєстрували естральний тип вагінального мазка, через місяць у половини тварин спостерігали відновлення циклу, але він не був регулярним. При подальшому спостереженні жодна тварина не завагітніла.

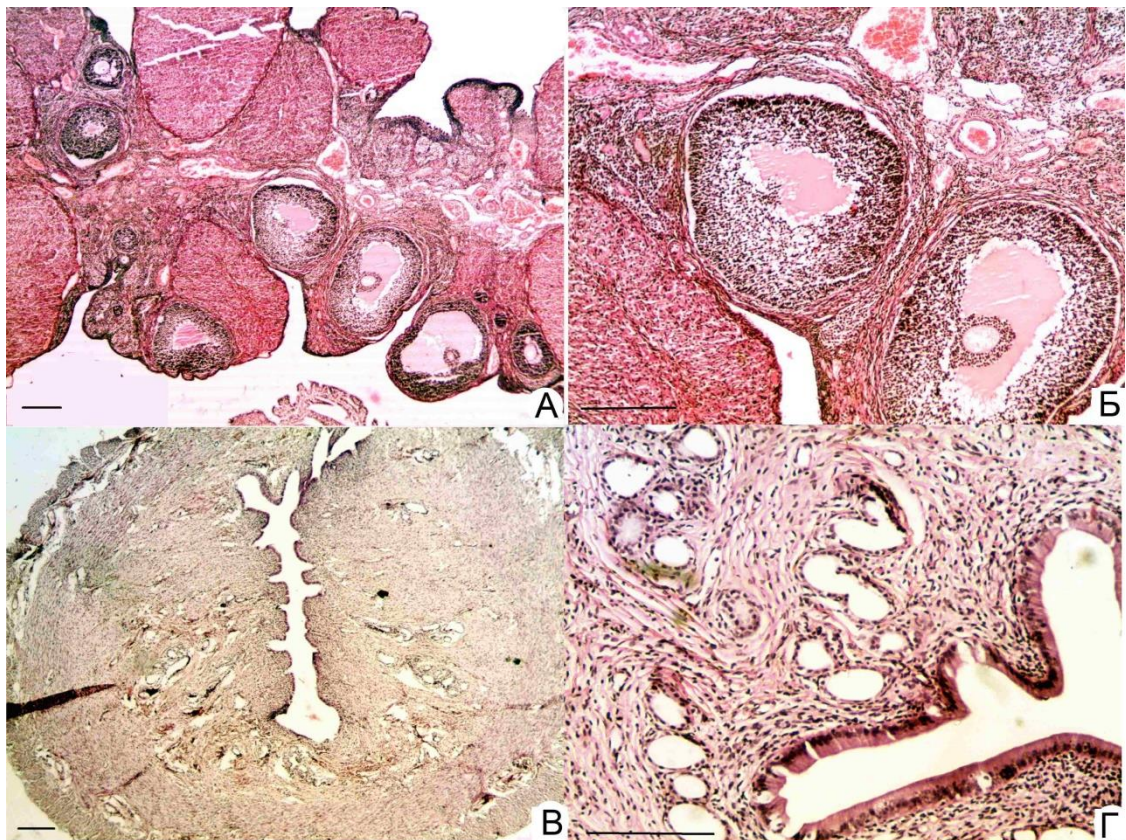


Рис. 5.9. Структура внутрішніх статевих органів щурів: А, Б – яєчники; В, Г – матки. Забарвлення гематоксилін-еозином. Масштабні лінійки 100 мкм.

Таблиця 5.9

Репродуктивні показники тварин з моделлю СПКЯ

Група тварин	Масовий коефіцієнт яєчників	Масовий коефіцієнт матки	Регулярний цикл через місяць, %	Кількість вагітних тварин, %	Час до пологів, доба	Кількість плодів
СПКЯ+КЕП	0,045	0,28	90	40*	32	3,2
СПКЯ	0,078*	0,24	50	0	-	-
Інтактні тварини	0,042	0,23	100	90	25	7,2

Примітка: * – різниця статистично значуща у порівнянні з інтактними тваринами, $p < 0,05$.

Гістологічне дослідження статеві системи тварин показало наявність кістозних змін у яєчниках (рис. 5.10, А), зменшення кількості генеративних елементів в основному за рахунок нормальних фолікулів, жовті тіла спостерігались також у великій кількості, подекуди спостерігали кістозні зміни з крововиливами (рис. 5.10, Б). Матки були дещо зменшені (рис. 5.10, В), поверхневий шар ендометрію був дещо стоншений, клітини зменшені (рис. 5.10, Г). Ці зміни типові для СПКЯ, коли відносна чи абсолютна гіперестрогенія призводить до порушення фолікулогенезу, овуляції, естрального циклу та стоншення ендометрію.

У тварин, яким проводили терапію КЕП через місяць реєстрували регулярні зміни естрального циклу у більшості тварин. Масові коефіцієнти яєчників та матки статистично не відрізнялись від контрольної групи. 40% тварин завагітніло, але час до пологів був значно довший, ніж у самиць інтактної групи, кількість плодів була значно меншою (табл.5.7.).

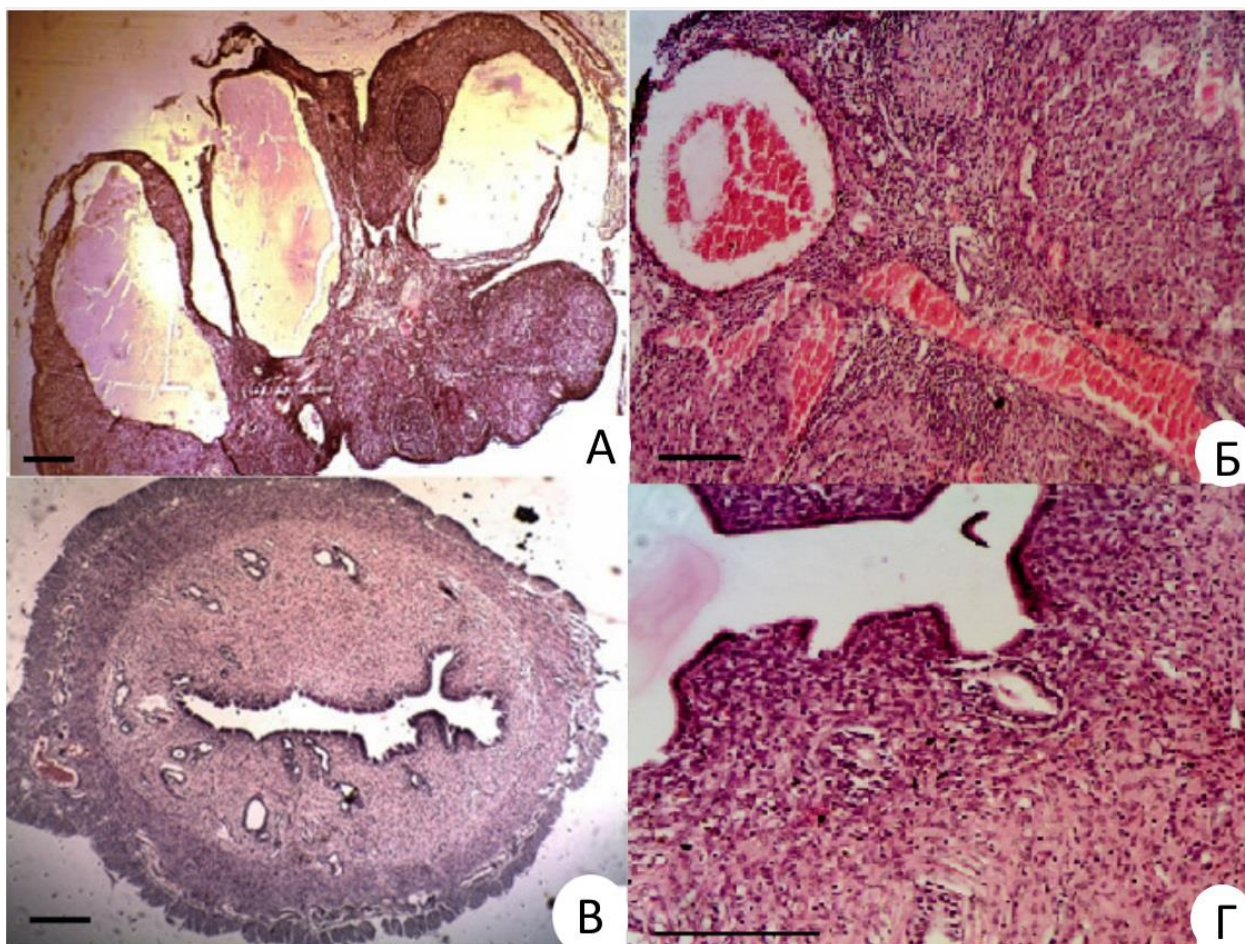


Рис. 5.10. Структура внутрішніх статевих органів щурів із СПКЯ без лікування: А, Б – яєчник тварин з СПКЯ без лікування; В, Г – матка тварин з СПКЯ без лікування. Забарвлення гематоксилін-еозином. Масштабні лінійки 100 мкм.

При морфологічному дослідженні яєчників виявлено зниження кількості генеративних елементів за рахунок зріючих фолікулів, але на відміну від нелікованої групи не зустрічали кіст та крововиливів (рис. 5.11, А).

При дослідженні маток атрофія вже не була так виражена, як у тварин з СПКЯ без лікування (рис. 5.11, Б). Клітини верхнього шару ендометрію набували циліндричної та кубічної форми (рис. 5.11, В), ядра були більш гетерохромні. Залози та судини ендометрію були більш виражені (рис. 5.11, Г).

Репродуктивна система після застосування КЕП при СПКЯ відновлюється частково. Залишається зменшення кількості фолікулів,

атрофічні явища в ендометрії. Як результат відновлення естрального циклу спостерігається не у всіх тварин, а вагітність настає менше, ніж у половини тварин.

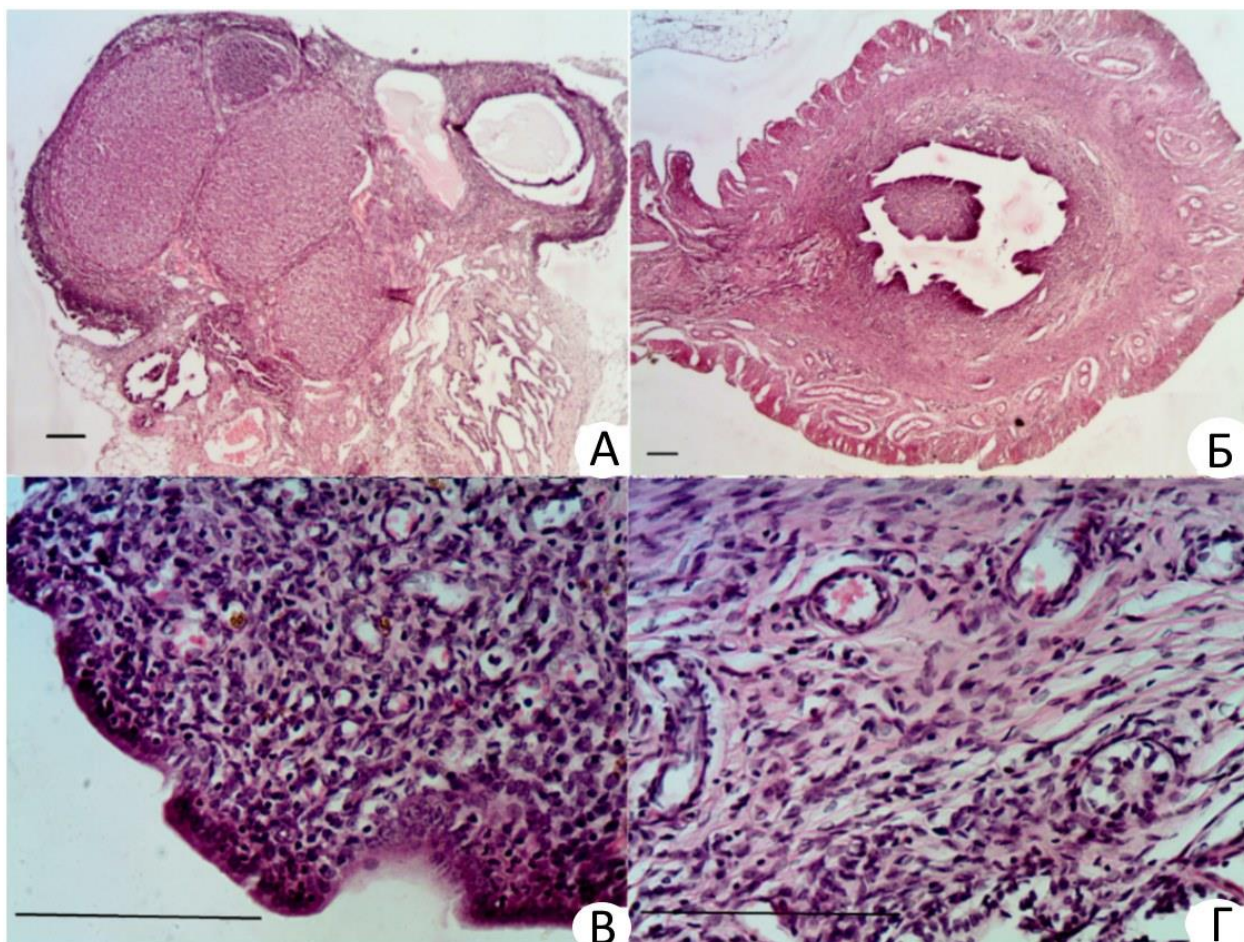


Рис. 5.11. Структура внутрішніх статевих органів щурів із СПКЯ після лікування КЕП: А – яєчник, Б, В, Г – матки. Забарвлення гематоксилін-еозином. Масштабні лінійки 100 мкм.

Таким чином, застосування КЕП є ефективним при лікуванні СПКЯ. У даному випадку патологія моделюється блокуванням прогестеронових рецепторів матки та яєчників мефіпристоном. Дія КЕП може бути обумовлена трофічним впливом на репродуктивну систему, відновленням рецепторів, а також центральним механізмом впливу.

5.2.4. Дослідження впливу кріоконсервованих похідних плаценти на перебіг травми та ішемії (перекрут яєчників)

Перекрут яєчника є не досить частою патологією, але в його патогенезі є гостре порушення кровообігу, ішемія та асептичне запалення, які присутні при багатьох захворюваннях жіночої статеві системи.

При моделюванні перекруту яєчників на момент повторної лапаротомії у тварин спостерігали крововиливи у яєчники, матку, мезоваріум, мезосальпінгс, мезоваріум та оточуючу жирову тканину дистальніше місця лігування. Крововиливи досягали розмірів 10–15 мм (рис. 5.12, А) та були обумовлені припиненням венозного відтоку при збереженні артеріального притоку, що викликало підвищення тиску в капілярах та вихід елементів крові в паренхіму тканини.

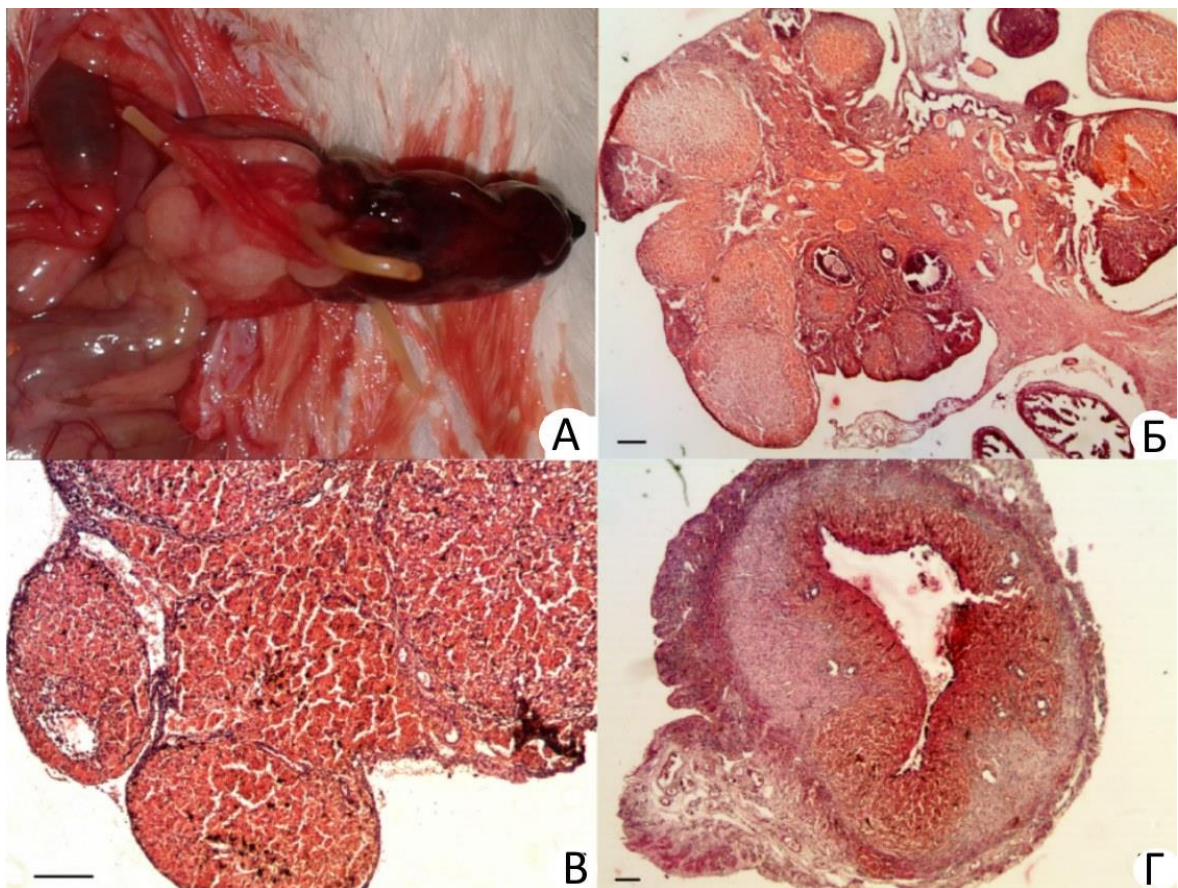


Рис. 5.12. Структура органів щурів із перекрутом яєчників: А – згальний вид крововиливу, Б, В – яєчник тварин із перекрутом; Г – матка тварин з перекрутом яєчників. Б - Г – забарвлення гематоксилін-еозином. Масштабні лінійки 100 мкм.

При гістологічному дослідженні виявляли масивні крововиливи у паренхімі, жовтих тілах та воротах яєчника (рис. 5.12, Б, В). Фолікули були відносно збереженими, крововиливів в порожнину не спостерігали. Це можна пояснити активною васкуляризацією жовтих тіл та меншою васкуляризацією фолікулів. У матці спостерігали крововиливи у внутрішніх шарах – ближче до ендометрію (рис. 5.12, Г), що пояснювали більш рихлою сполучною тканиною та активною васкуляризацією. Втім, на відміну від жовтих тіл, які утворюються кожен раз заново ендометрій повинен відновлюватись.

Важливою відмінністю моделі від патології людини є те, що у жінок перекручуються не матки з яєчниками, а матки з трубами, в яких не проходить імплантації. Маткові труби забезпечують процес переносу гамет та ембріону до матки та запліднення. Структура маткової труби є більш вразливою, але за розмірами наближається до матки щура.

Під час повторного дослідження наприкінці експерименту яєчники всіх груп не мали слідів крововиливів, але кількість фолікулів була зменшена, збільшилася кількість атретичних фолікулів (рис. 5.13, А), що можна пов'язати з впливом ішемії та асептичного запалення.

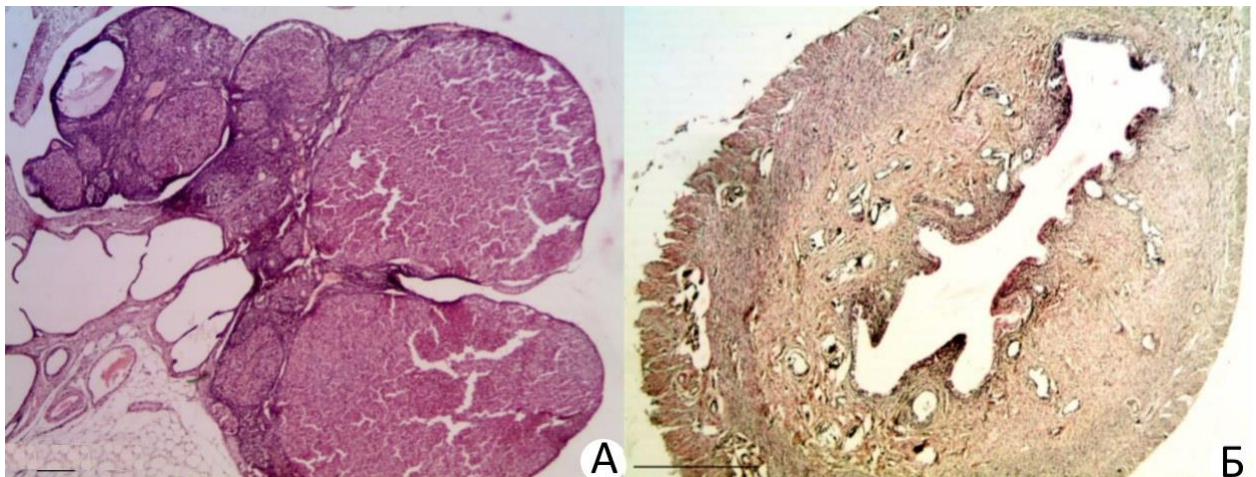


Рис. 5.13. Структура органів щурів із перекрутом яєчників наприкінці експерименту: А – яєчник тварин із перекрутом; Б – матка тварин з перекрутом. Масштабні лінійки 200 мкм.

Структура маток була відновлена та мало відрізнялась від контрольних показників (рис. 5.13, Б).

Наприкінці експерименту під час аутопсії було виявлено, що у тварин після перекруту без лікування в яєчнику на боці перекруту була вірогідно зменшена кількість жовтих тіл, місць імплантації та живих плодів (табл. 5.10). Оскільки зменшувалися всі вищезгадані показники, можна зробити висновок, що репродуктивні показники зменшені не в результаті порушення імплантації, а через брак фолікулогенезу. Середня маса плаценти та плоду вірогідно не відрізнялася від контрольних показників, що також свідчить про достатнє відновлення маток. Спайки спостерігали рідко, не перекривали яєчник, були тонкими, легко видалялися.

Таблиця 5.10

Репродуктивні показники у піддослідних тварин на боці перекруту

Група тварин	Кількість жовтих тіл	Кількість місць імплантації	Кількість плодів	Середня вага плоду	Середня маса плаценти	Кількість тварин зі спайками, %
Перекрут яєчників та введення КЕП	$6,2 \pm 0,5$	$5,1 \pm 0,5$	$4,8 \pm 0,8$	$2,3 \pm 0,3$	$0,7 \pm 0,06$	60*
Перекрут яєчників	$3,5 \pm 0,2^*$	$3,3 \pm 0,3^*$	$3,5 \pm 0,2^*$	$2,2 \pm 0,5$	$0,8 \pm 0,09$	20
Хибно-оперовані	$7,5 \pm 0,6$	$6,9 \pm 0,7$	$6,2 \pm 0,6$	$2,3 \pm 0,8$	$0,7 \pm 0,1$	20

Примітка:* – різниця статистично значуща у порівнянні з хибнооперованими тваринами, $p < 0,05$.

У самиць, які отримували після перекруту лікування з застосуванням КЕП кількість жовтих тіл, живих плодів, місць імплантації, а також маса плодів та плаценти не відрізнялися від групи хибнооперованих тварини. Спостерігали збільшену кількість спайок у черевній порожнині порівняно з

хибнооперованими тваринами та тваринами з перекрутом яєчників без лікування (табл. 5.10). Спайки не були виражені, не перекривали яєчників, та судячи з репродуктивних показників не впливало на овуляцію та потрапляння яйцеклітин до матки.

Таким чином, моделювання перекруту шляхом тимчасового лігування товстим кетгутом призводить до масивних крововиливів в матку, яєчник, оточуючи тканини, втрату частини фолікулярного апарату, репродуктивних втрат та спайкоутворення. Застосування КЕП у тварин із моделлю ішемії на прикладі перекруту яєчників дозволяє зберегти функцію яєчників, про що свідчить збільшення кількості жовтих тіл та живих плодів, але сприяє підвищеному утворенню спайок. Для цього лікування перекруту доцільно також доповнювати протиспайковою та протизапальною терапією.

5.2.5. Дослідження впливу кріоконсервованих похідних плаценти при синдромі передчасного виснаження яєчників після хіміотерапії

Недостатність яєчників є досить розповсюдженим явищем. До неї відносять фізіологічне згасання у віці 50-52 роки, первинну недостатність, яка розвивається з пубертатного періоду та передчасне згасання, яке є результатом перенесеного захворювання, чи ятрогенними факторами. Модель хіміотерапевтично-індукованої передчасної недостатності функції яєчників є найбільш стандартизованою та відтворюваною. На відміну від оваріоектомічних моделей вона дозволяє відновити функції власних яєчників. Більш близькою моделлю є для ятрогенної недостатності яєчників, яка найбільш розповсюджена після хіміопроменевого лікування онкопатології та супроводжується також ушкодженням органів детоксикації – печінки та нирок. Інші патологічні варіанти яєчничової недостатності, також мають в своєму патогенезі передчасне виснаження оваріального резерву та зазвичай моделюються на тваринах подібним методом.

При дослідженні динаміки ваги тварин протягом 8 тижнів вага контрольної групи підвищувався з 19,8 до 22,2 г, що характерно для мишей

цього віку. У всіх груп після хіміотерапії вага різко знижувався до 17,5 г з подальшим повільним відновленням (рис. 5.13). Одночасно в цей же час відзначали зміна загального стан - гіподинамію, зваленість вовни, мутність очей.

У групі без лікування миші відновлювали вагу до групи інтактних протягом 8 тижнів. Група, якій вводили експланти плаценти відновлювала вагу на 5 тиждень після хіміотерапії, а групи після введення клітин - на 7 тиждень (рис. 5.14). Одночасно з відновленням ваги поліпшувався загальний стан і вид тварин.

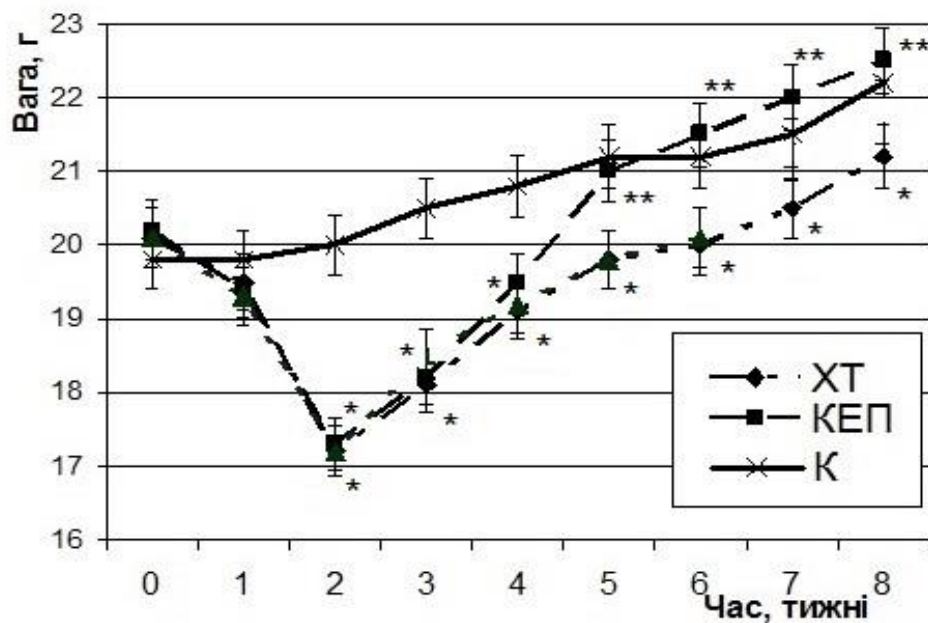


Рис. 5.14. Динаміка зміни ваги тварин. ХТ – група після хіміотерапії без лікування, КЕП – група після хіміотерапії, що отримувала КЕП, К – позитивний контроль. Примітка: * – різниця статистично значуща у порівнянні з контролем, ** – різниця статистично значуща у порівнянні з ХТ, $p < 0,05$.

При вивченні наявності естрального циклу методом вагінальних мазків в контрольній групі у всіх тварин спостерігали регулярний цикл (рис. 5.15). Всі фази циклу (проєструс, еструс, метаєструс, дієструс) чітко

відокремлювалися, іноді спостерігали зміну тривалості фаз циклу, але не більше ніж на 1-2 доби.

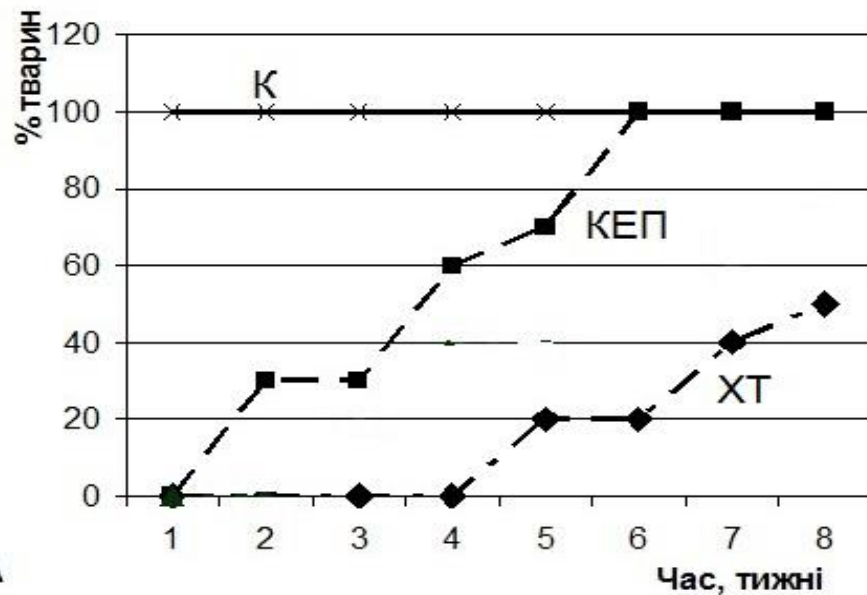


Рис. 5.15. Динаміка відновлення естрального циклу. ХТ – група після хіміотерапії без лікування, КЕП – група після хіміотерапії, що отримувала КЕП, К – позитивний контроль.

У тварин всіх тварин після хіміотерапії без лікування спостерігали відсутність поверхневого епітелію при цитологічному дослідженні, атрофічний тип мазку з невеликою кількістю слизу та глибоких некеротизованих клітин. Циклічність почала з'являтися через 5 тижнів після хіміотерапії, а через 8 тижнів спостерігалася у 50% мишей, що відповідає літературним даними по цій моделі [314].

В групі після введення експлантів плаценти циклічність відновлювалась швидко, і через 6 тижнів після хіміотерапії спостерігалася у 100% тварин.

Слід зазначити, що після хіміотерапії у більшості тваринах не відновлювався регулярний 4-х денний естральний цикл, спостерігалася періодична поява в мазку ороговілих клітин поверхневого епітелію на термін від 3 до 8 днів, що свідчило про естрогенну насиченість організму, яка

можлива без овуляції. Відновлення естрального циклу корелювало з вагою мишей, так при порівнянні маси тварин і настання регулярного естрального циклу було відзначено, що миші з вагою менше 18 г рідко мали регулярний естральний цикл.

При вивченні статеві функції показано, що кількість ефективних спарювань в групі після хіміотерапії склало 30% на 8 тижні, що відповідає даним літератури для моделі (рис. 5.16). При використанні експлантів плаценти цей показник підвищувався до 60-80%.

При дослідженні репродуктивної функції у 90% самок контрольної групи настуپیла вагітність протягом експерименту, середня кількість плодів - 12. Жодна з самок після хіміотерапії не завагітніла, незважаючи на проведене лікування. За літературними даними для даної моделі описано відновлення фертильності в разі введення клітин безпосередньо в яєчник [314].

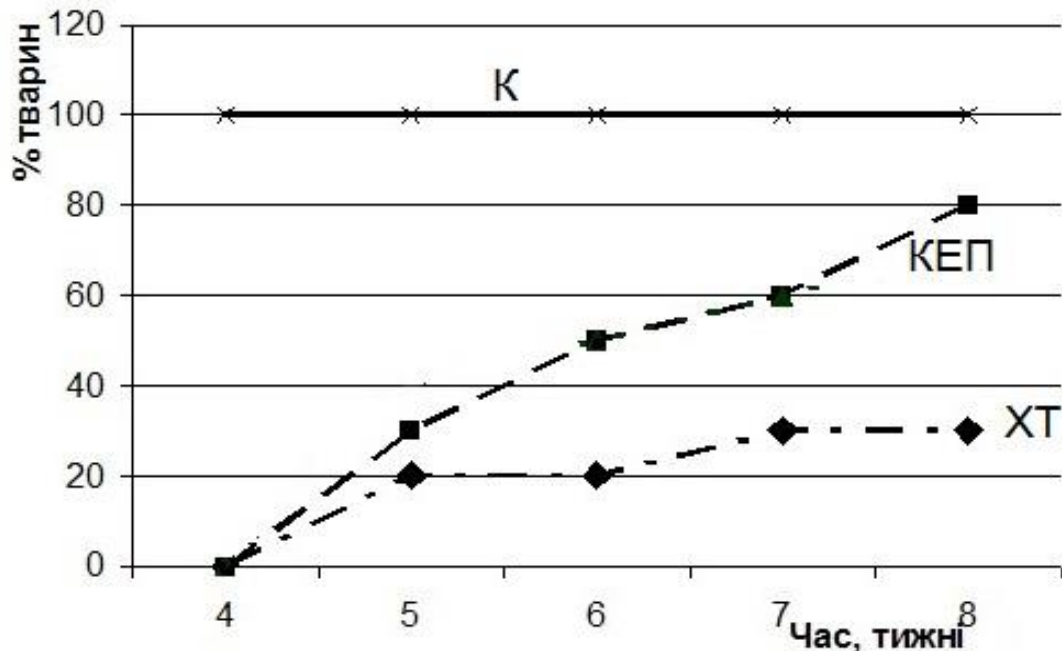


Рис. 5.16. Динаміка зміни статевої активності. ХТ – група після хіміотерапії без лікування, КЕП – група після хіміотерапії, що отримувала КЕП, К – позитивний контроль.

У інтактних тварин в яєчники були звичайних розмірів з фолікулами різного ступеня зрілості та жовтими тілами (рис. 5.17, А). В матках спостерігали вираженість всіх шарів і залоз (рис. 5.17, Б). Нирки були звичайної структури з збереженням клубочкового і канальцевого апарату (рис. 5.17, В). Печінка характерної будову зі збереженням типової структури дольок (рис. 5.17, Г).

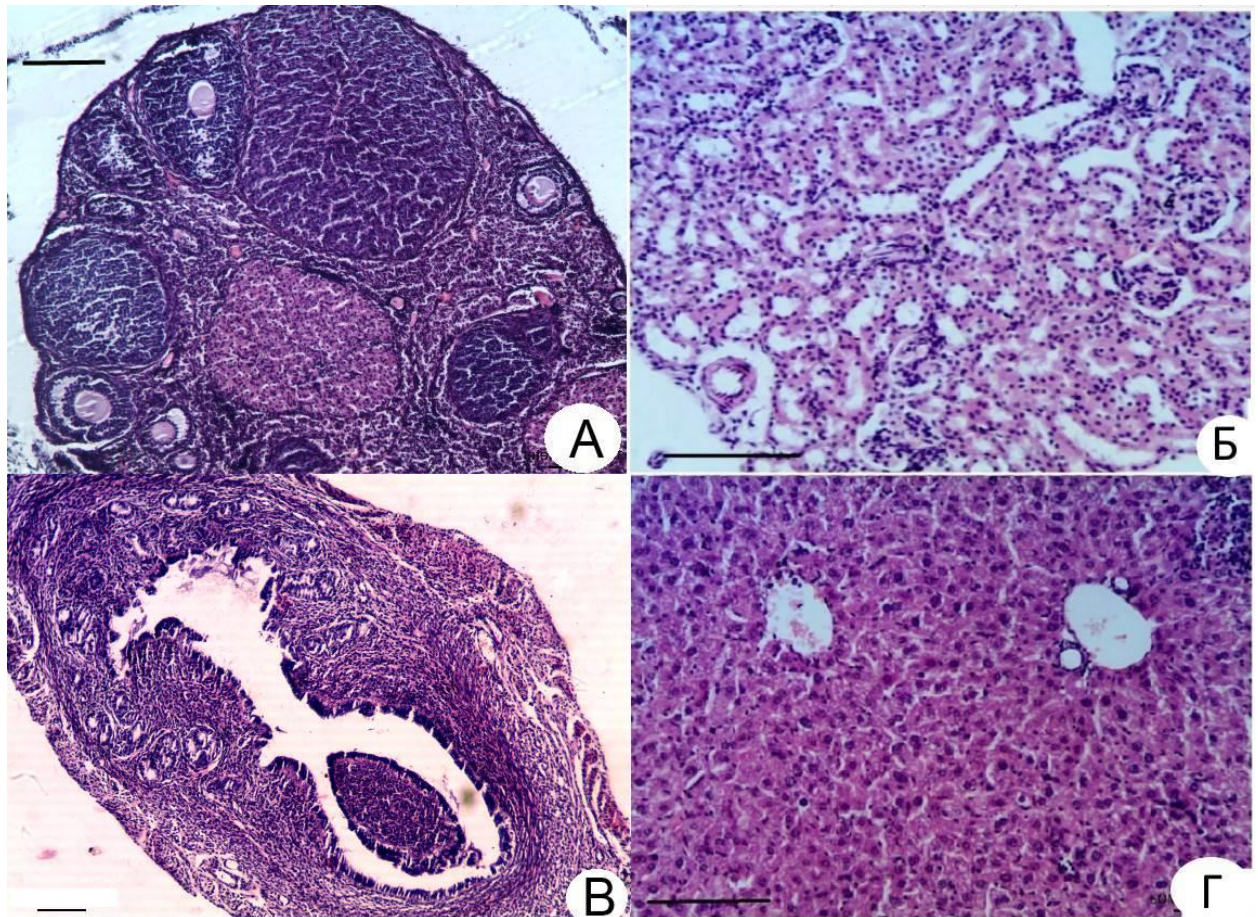


Рис. 5.17. Структура органів інтактних тварин. А – яєчник, Б – матка, В – нирка, Г – печінка. Масштабні лінійки 100 мкм.

У тварин всіх груп через 4 тижні після хіміотерапії звертало на себе увагу зменшення маток і яєчників. При гістологічному дослідженні в яєчниках спостерігали різке зменшення кількості первинних фолікулів, повна відсутність вторинних, різку атрофію, зморщування клітин і органу в цілому (рис. 5.18, А). Судини були спалі. Всі клітини зменшені в об'ємі, ядра клітин невеликі, гіперхромні. Простори між клітинами скорочувалися. Різні частини

яєчника важко було диференціювати між собою. В групі після застосування експлантів зміни були менш виражені, спостерігали гетерохромію ядер, збільшення об'єму клітин. Такі зміни свідчать про зменшення кровообігу в органі, метаболізму в окремих клітинах фактично пригнічення всіх функцій яєчників: ендокринної, продукції яйцеклітин.

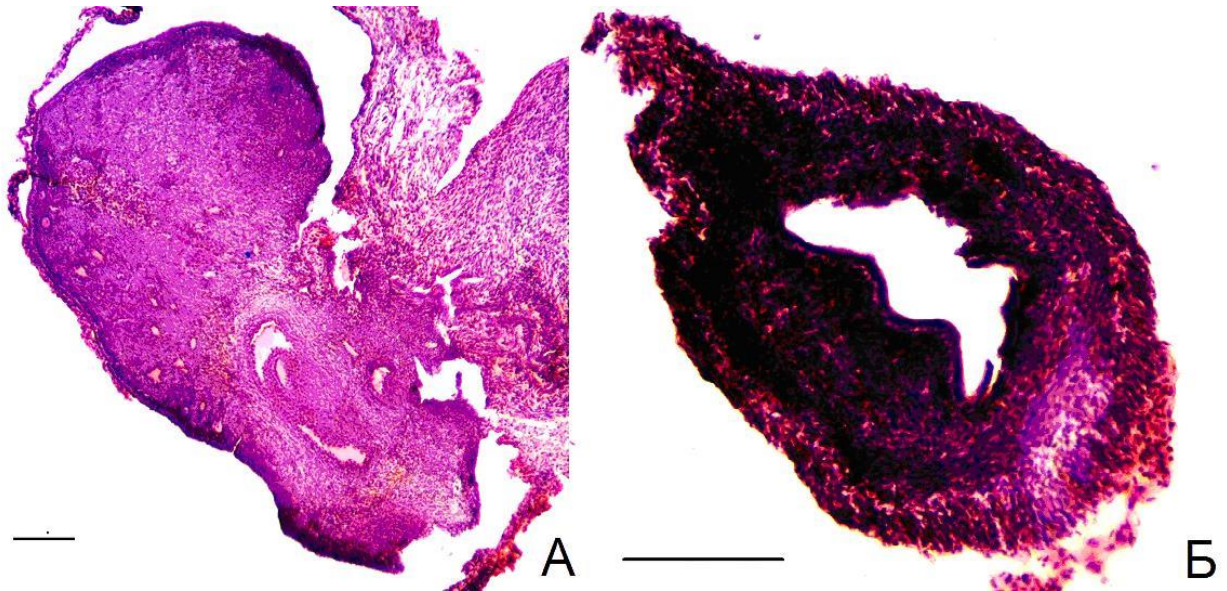


Рис. 5.18. Структура яєчників тварин через 4 тижні після хіміотерапії. Масштабна лінійка 100 мкм.

У матках тварин після через 4 тижні після хіміотерапії, спостерігалася різка атрофія. Шар ендометрію був стоншений, але виділявся на фоні інших структур, інші шари не диференціювалися. Судини та залози ендометрію не визначалися. Клітини були зменшені, ядра гіперхромні (рис. 5.18, Б). Після застосування експлантів у деяких тварин спостерігали початок відновлення, який виражався в збільшенні клітин, гіперхромії ядер.

У нирках спостерігали різкий набряк коркового і мозкового шару, клубочки та каналці чітко не візуалізувалися, ядра клітин були гіперхромними (рис. 5.19, А). В групах з використанням експлантів плаценти набряклим була тільки частина нирки, не більше половини площі зрізів (рис. 5.19, Б). При дослідженні печінки у всіх групах спостерігали набряк і порушення балочної структури печінки (рис. 5.19, В), який був більш

виражений в центральних частинах синусоїдів. В групі, які отримували лікування з використанням експлантів плаценти, балочна структура частково зберігалася, набряк був менш вираженим (рис. 5.19, Г).

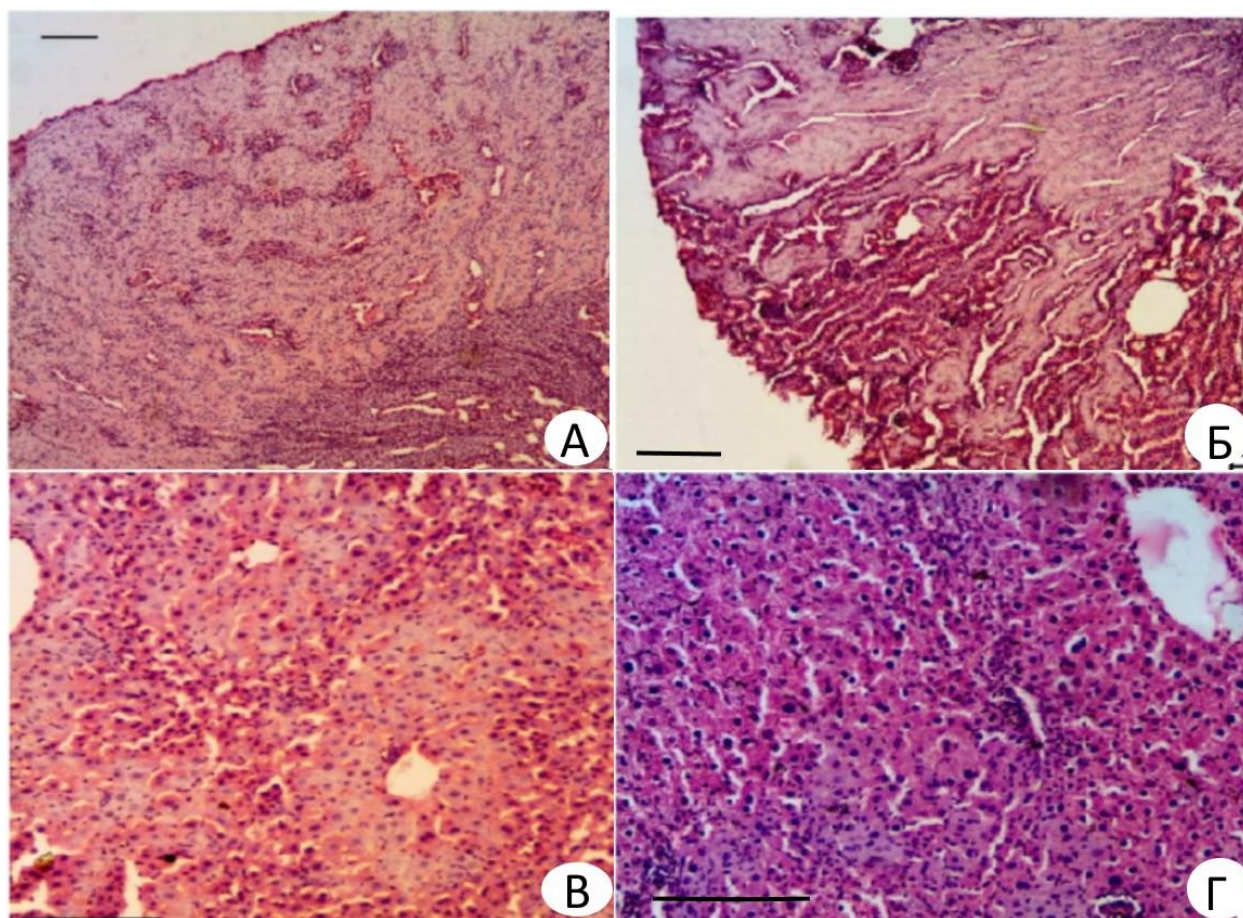


Рис. 5.19. Структура органів тварин через 4 тижні після хіміотерапії. А – нирка з тотальним ураженням, Б – нирка з частковим ураженням, В – печінка з тотальним ураженням, Г – печінка з частковим ураженням. Масштабні лінійки 100 мкм.

Через 12 тижнів при виведенні тварин в групі після хіміотерапії без лікування спостерігали різке збільшення жирової тканини в черевній порожнині. Яєчники були зменшені в розмірах, при гістологічному дослідженні відзначено відсутність у них структурних елементів: жовтих тіл, примордіальних, первинних, вторинних фолікулів, строма заповнена великими клітинами (рис. 5.20, А). Ядра були гетерохромні, клітини не були зморщеними, спостерігалися судини з кров'ю, що свідчить про відновлення метаболізму та кровообігу в органі. Але фолікулогенез припинений

незворотньо, що пов'язано з загибеллю ооцитів. Можливо відновлення естрогенної насиченості організму, про яке свідчить відновлення естрального циклу у деяких тварин, в цій групі тварин відбувається за рахунок більшою мірою жирової тканини, а не яєчників.

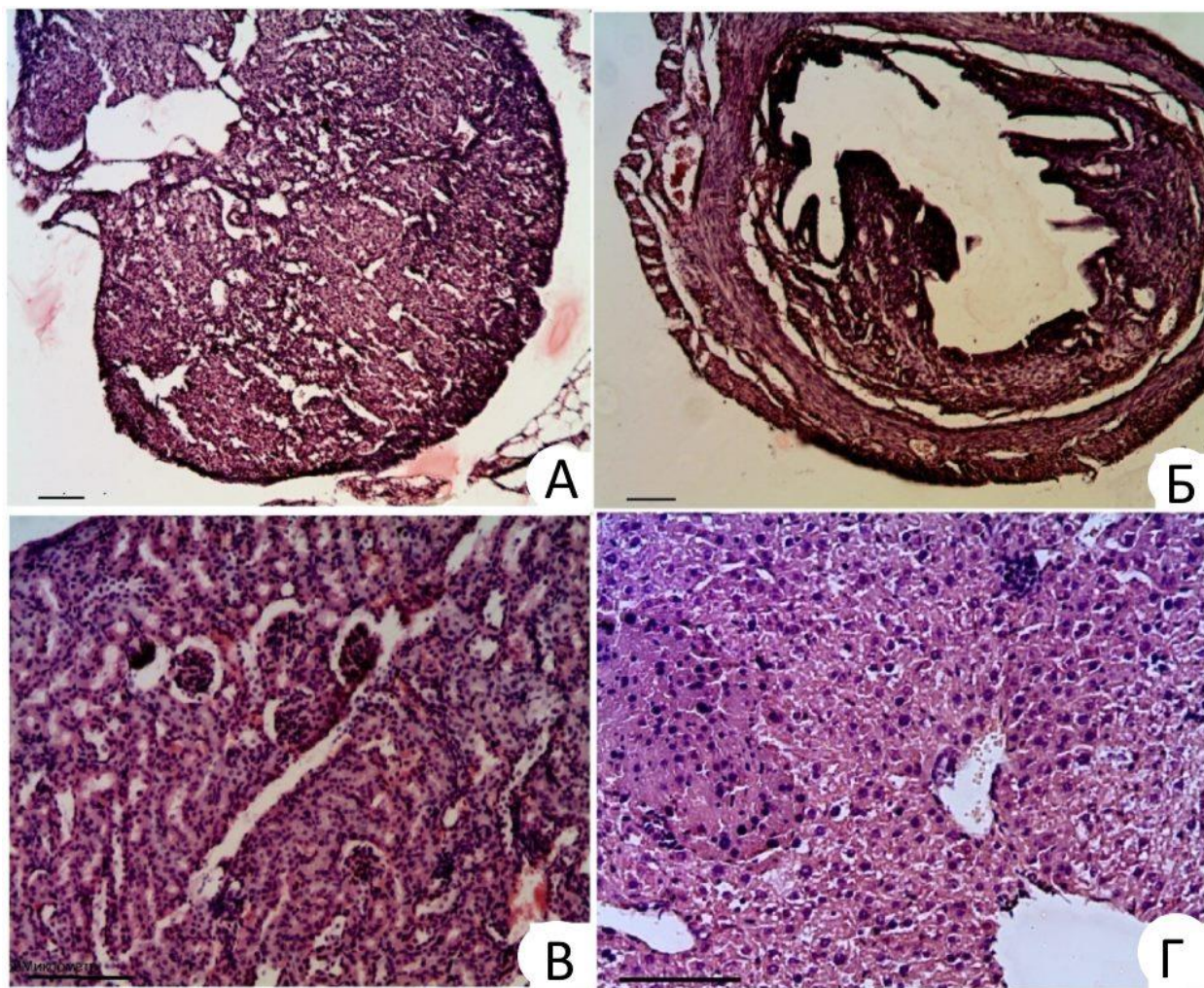


Рис. 5.20. Структура органів тварин без лікування через 12 тижні після хіміотерапії. А – яєчник, Б – матка, В – нирка, Г – печінка. Масштабні лінійки 100 мкм.

Під час гістологічного дослідження маток спостерігали менш виражені атрофічні явища, ніж на 4-му тижні після хіміотерапії, проте витончення шарів і атрофія ендометрію була значною (рис. 5.20, Б). Судини були частково відновлені, спостерігалися окремі залози ендометрію. Внутрішній шар ендометрію залишався стоншеним.

При гістологічному дослідженні нирок спостерігали зморщування частини клубочків, зберігається деякий набряк канальців (рис. 5.20, В). У печінки спостерігалися вогнища цирозу, розростання сполучної тканини порушення балочної структури і ділянки поліморфізму ядер (рис. 5.20, Г). Сінусоїди були деформовані, з нерівномірними просвітами судин та жовчних каналів.

При дослідженні яєчників тварин, яким проводили терапію експлантами плаценти в яєчниках структурні елементи так само були відсутні, проте спостерігали структури, схожі на генеративні елементи яєчника - округлі ділянки, що містять великі клітини з гетерохромними ядрами та світлою цитоплазмою (рис. 5.21, А, позначено стрілками). Яєчники мали нормальні розміри.

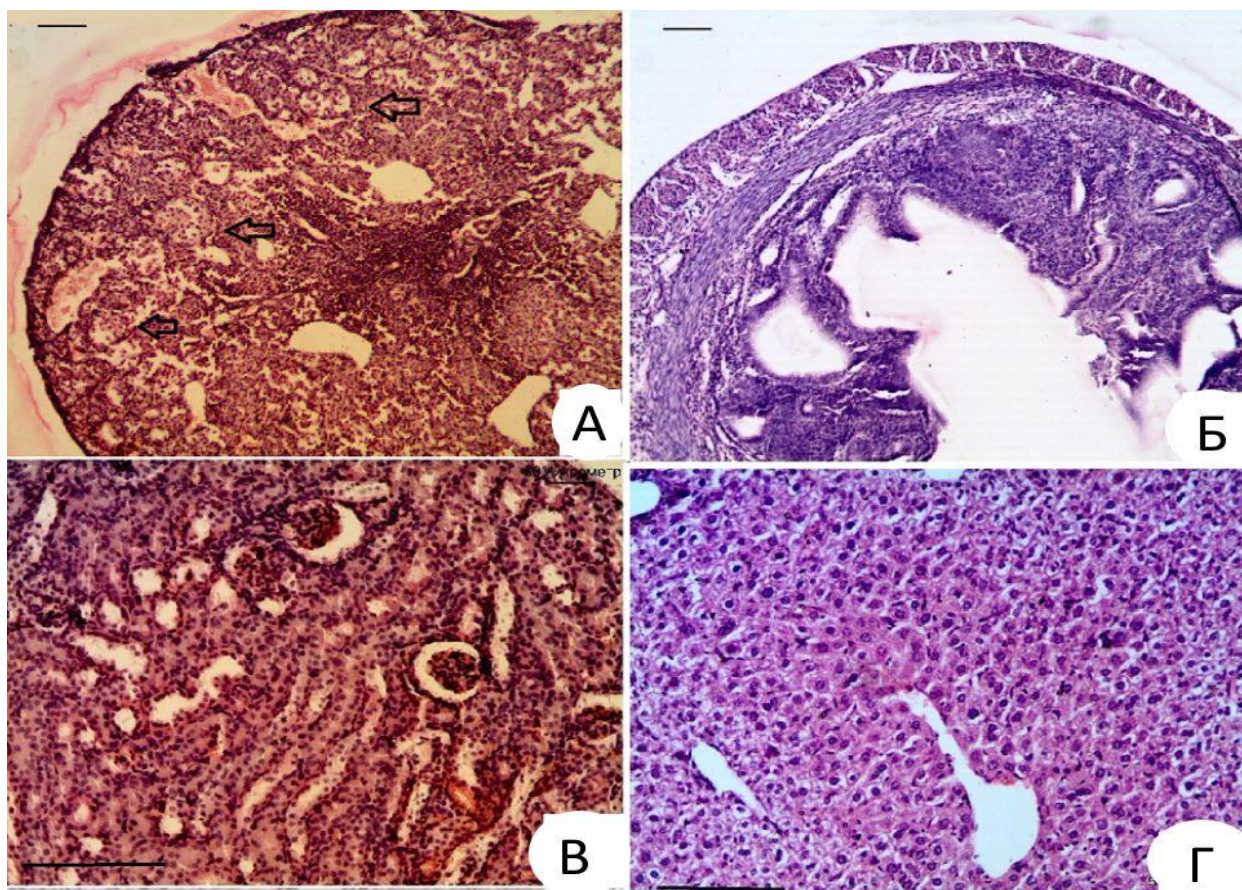


Рис. 5.21. Структура органів тварин через 12 тижні після хіміотерапії та лікування КЕП. А – яєчник, Б – матка, В – нирка, Г – печінка. Стрілки – залишки генеративних елементів. Масштабні лінійки 100 мкм.

Під час гістологічного дослідження маток спостерігали гіперплазію ендометрію, збільшення кількості залоз ендометрію, потовщення міометрію. (рис. 5.21, Б). Більшість клітин мали світлу цитоплазму, гетерохромні ядра. Судини були добре виражені та заповнені кров'ю. В просвіті маток спостерігали секрет.

У нирках патологічних змін виявлено не було (рис. 5.21, В). Чітко визначались клубочки та канальні. Судини не розширені, заповнені кров'ю.

В печінці балочна структура збережена, однак спостерігається поліморфізм ядер, клітини різного розміру, зазвичай з гранулами в цитоплазмі (рис. 5.21, Г). Циротичних змін та розростання сполучної тканини не виявлено. Судини без патологічних змін.

Додатково слід зазначити, що реакція тварин на хіміотерапію і лікування була різною. Так в першій групі у однієї тварини в яєчниках спостерігали збереження фолікулогенезу, але не жовтих тіл і через 12 тижнів, відсутність змін в печінці та нирках, часткова атрофія матки (рис 5.22, А, Б). У одній з тварин другої групи у відповідь на введення експлантів спостерігали різку гіперплазію ендометрію (рис 5.22, В), при атрофії яєчників. У однієї тварини третьої групи спостерігали різку атрофію матки на 12 тижні (рис 5.22, Г), циротичні зміни в печінці, незважаючи на набір ваги. Однак зміни у інших тварин в групах були однотипні.

Таким чином, застосування КЕП має позитивний ефект при лікуванні овариальної недостатності, індукованої хіміотерапією. При не топічному введенні препаратів можливе відновлення органів детоксикації, статевої функції, але не фертильності. Літературні данні, пов'язані з моделью, що застосовувалася описують можливість відновлення фертильності при безпосередньому введенні плацентарних чи інших МСК в яєчник [187, 314]. Чутливість до хіміотерапії і до лікування у окремих особин залежить від індивідуальних особливостей організму.

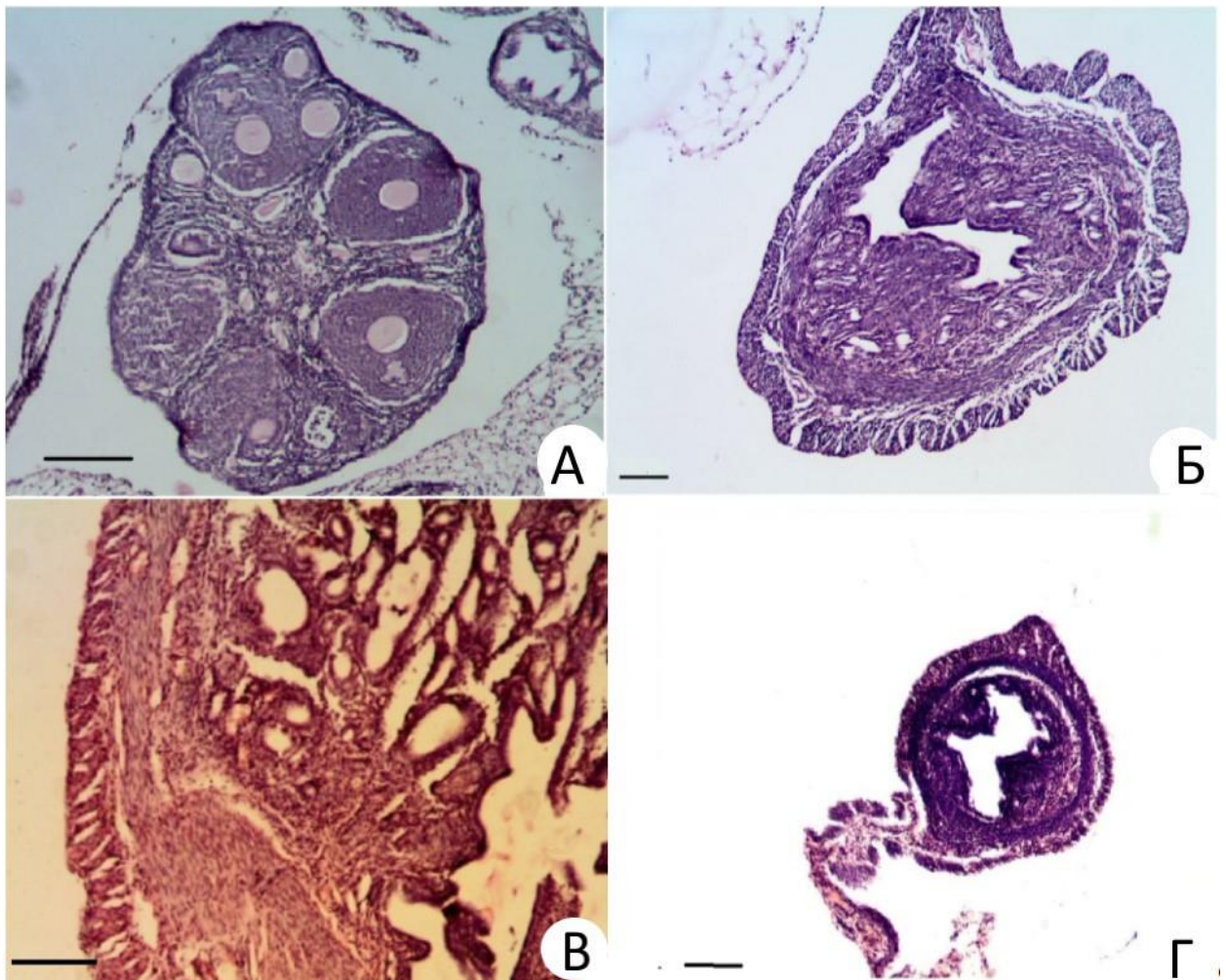


Рис. 5.22. Атипові зміни в органах деяких тварин. А – яєчник тварини після хіміотерапії зі збереженими фолікулами, Б – матка тварини після хіміотерапії без ознак атрофії, В – матка тварини після хіміотерапії та застосування КЕП з різкою, Г – матка тварини 3 групи. Масштабні лінійки 100 мкм.

5.2.6. Дослідження впливу кріоконсервованих похідних плаценти на прояви ускладнень після операціях на жіночих статевих органах

Основною причиною жіночого непліддя є спайковий процес в черевній порожнині з блокуванням прохідності маткових труб та виходу яйцеклітини при овуляції. Більшість оперативних втручань в черевній порожнині призводять до формування злук більшого, або меншого ступеню. До факторів тубооваріального непліддя відносять також зниження прохідності та функції маткових труб, які часто виникають після операцій з приводу

позаматкової вагітності. В ряді випадків необхідним є розтин маткової труби з подальшим відновленням її цілісності. Неповноцінне відновлення рубця на матці чи трубі веде до повторної позаматкової вагітності, проблем при виношуванні вагітності. Враховуючи позитивний трофічний ефект від КЕП на матку можна припустити, що їх застосування призведе до більш повного відновлення рубця.

Операції на сучасному етапі медицини зазвичай проводять лапароскопічним доступом за допомогою відповідного обладнання. Тому при моделюванні ушкоджень маткових труб в експерименті були використані саме методики радіохвильової коагуляції при розтині маток щурів. Враховуючи, що основною причиною непліддя після будь-якої операції є спайковий процес, який прогресує після коагуляції, окрім застосування експлантів досліджували, необхідність проведення додатково профілактики виникнення спайок за допомогою протиспайкових гелів.

Після проведення оперативного лікування на 7 добу після у більшості самок з введенням КЕП (рис 5.24, А) мали місце поодинокі спайки, підпаяність матки до мезосальпінгсу, брижі кишкового але без «запаювання» та вільних кінців маточних рогів, що можна трактувати, як спайковий процес I ступеню.

У щурів, які не отримували лікування похідними плаценти, але яким проводили профілактику спайкоутворювання протиспайковим гелем (рис 5.24, В) спайковий процес мало відрізнявся – поодинокі формування спайок, без конгломератів та запаювання кінців труб.

При дослідженні аналогічних процесів у тварин, що не отримували лікування та протиспайкової профілактики спостерігали виражений спайковий процес, формування конгломератів, роздування кишкового вище спайок, що свідчить про звуження просвіту та наявність часткової кишкової непрохідності (рис 5.24, Г).

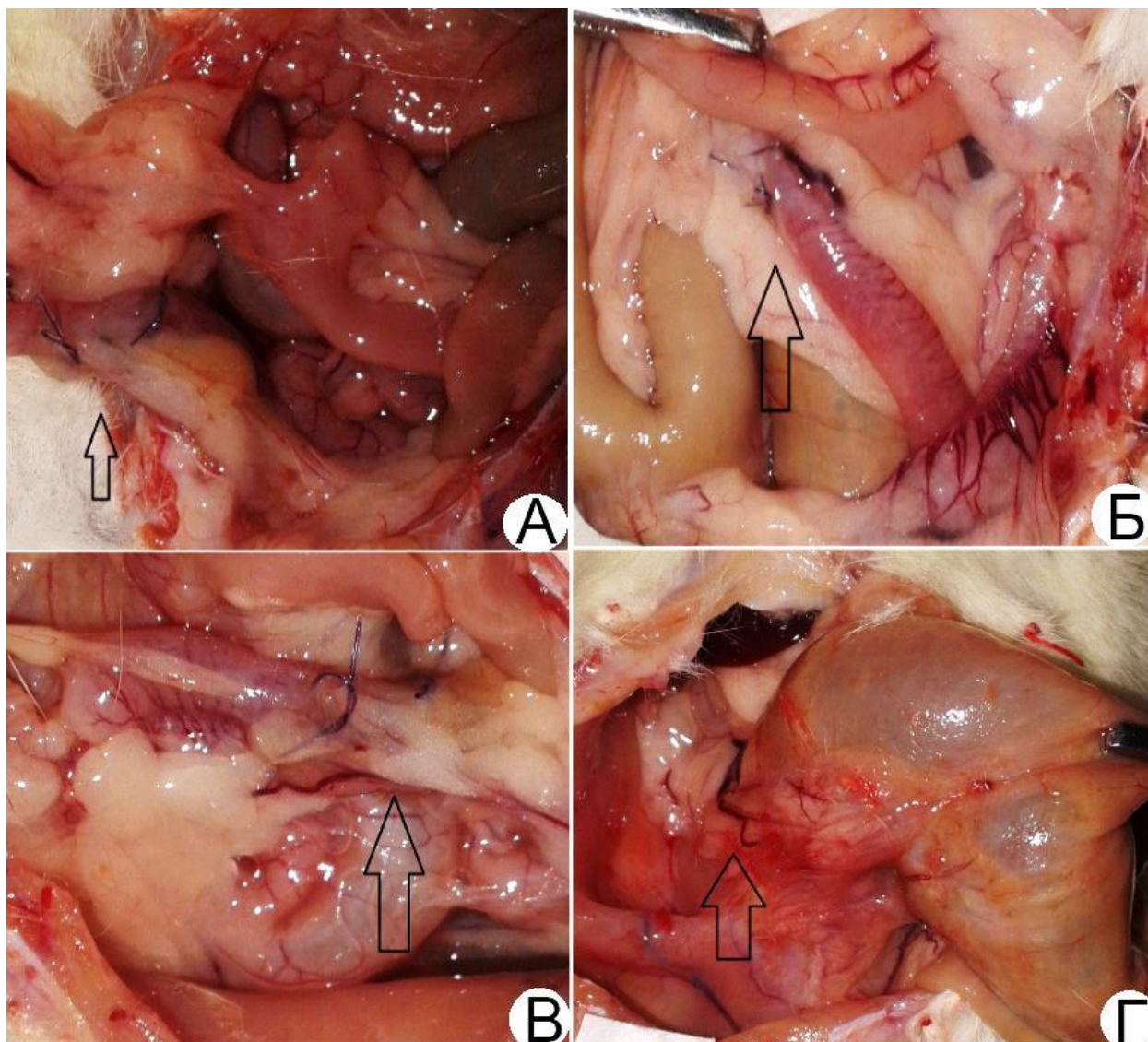


Рис. 5.24. Макроскопічна картина органів черевної порожнини щурів на 7-у добу: А, Б – стоншення стінки у тварини після введення похідних плаценти, В - з профілактикою спайкоутворювання, Г - без лікування та профілактики спайкоутворювання Місця операції з залишками шовного матеріалу позначені стрілками.

Описані зміни, об'єднані з даними отриманими після виведення всіх тварин з експерименту представлені у таблиці 5.11, з якої видно, що тварини які отримували лікування з введенням кріоконсервованих експлантів плаценти, або тільки протиспайкову профілактику мали спайковий процес – 0 – I ступеню, а тварини після операції без застосування протиспайкового бар'єру – III – IV ступінь спайкового процесу.

Таблиця 5.11

Розвиток спайкового процесу у піддослідних шурів

Ступінь спайкового процесу	1 група (КЕП, профілактика спайок)		2 група (профілактика спайок)		3 група (хибнооперовані)	
	n	%	n	%	n	%
0	9	64,3	12	85,7	—	—
I	5	35,7	2	14,3	—	—
II	—	—	—	—	—	—
III	—	—	—	—	6	42,86
IV	—	—	—	—	8	57,14

При гістологічному дослідженні місця операції в групі після застосування КЕП з профілактикою спайкоутворення спостерігали формування рихлого рубця та тенденцію до відновлення шарів, подекуди підпаювання жирової тканини (рис 5.25, А).

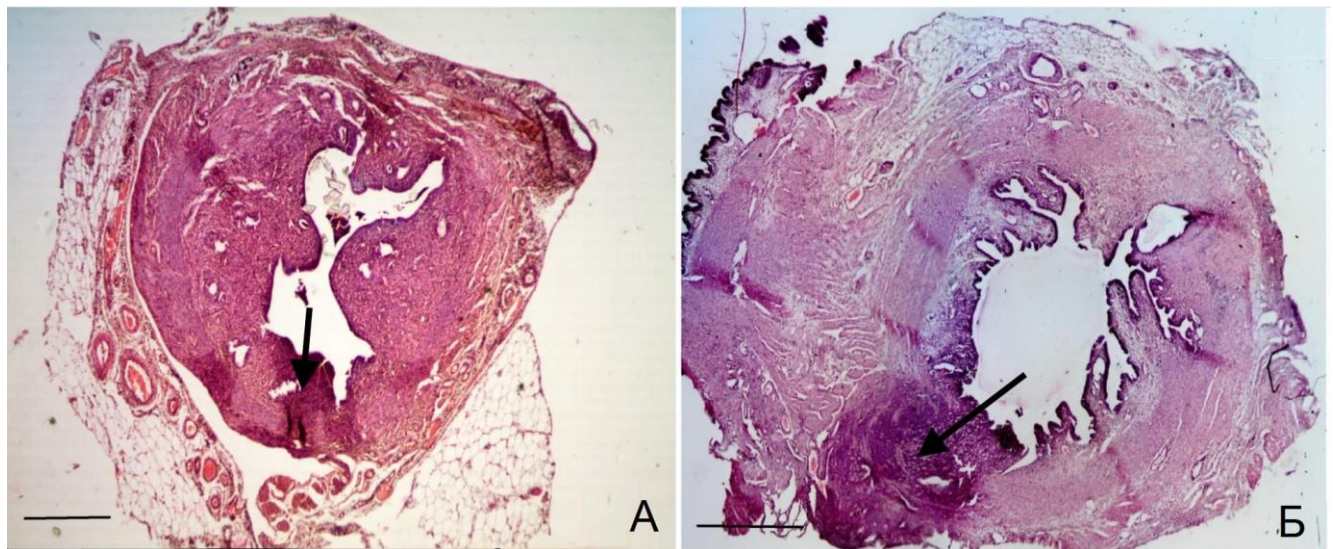


Рис. 5.25. Мікроскопічна оцінка відновлення оперованих рогів матки. А – повноцінний рубць у тварини після КЕП, Б – фіброзний рубць без лікування похідними плаценти. Стрілками позначені місця операції. Забарвлення гематокстнін-еозином. Масштабні лінійки 100 мкм.

У тварин після операції та профілактики спакового процесу без застосування похідних плаценти виявляли формування більш грубого рубця, але без гіперплазії ендометрію чи спайок (рис 5.25, Б). У тварин, які не отримували похідних плаценти чи про тиспайкову терапію спостерігали формування грубого рубця з підпаюванням жирової тканини.

При аналізі репродуктивних показників в досліджуваних групах продемонстровано, що при застосуванні експлантів плаценти спостерігається збільшення кількості жовтих тіл та плодів, що може говорити про стимуляцію пошкодженого яєчника (табл. 5.12., рис. 5.26, А).

Таблиця 5.12

**Середні статистичні показники кількості плодів та жовтих тіл у
піддослідних тварин ($M \pm m$)**

Показник	Група		
	1 група (КЕП, профілактика спайок)	2 група (профілактика спайок)	3 група (хибнооперовані)
Кількість плодів	$11,0 \pm 2,0$	$9,3 \pm 1,2$	$2,1 \pm 0,5^*$
Кількість жовтих тіл	$15,0 \pm 1,8^*$	$10,6 \pm 0,8$	$9,2 \pm 0,9$

Примітка: * – вірогідність різниці з 4 групою $p < 0,05$.

В групі без профілактики спайкового процесу спостерігали зниження кількості плодів, вірогідно через спайкоутворення. Спостерігали відсутність плодів на боці операції (рис. 5.26, Б), у однієї тварини спостерігали пірметру на місці операції (рис. 5.26, В). У двох тварин третьої та четвертої групи плодів нижче місця операції не було, що свідчить про звужування рогів матки при формуванні рубця та спайкового процесу (рис. 5.26, Г).

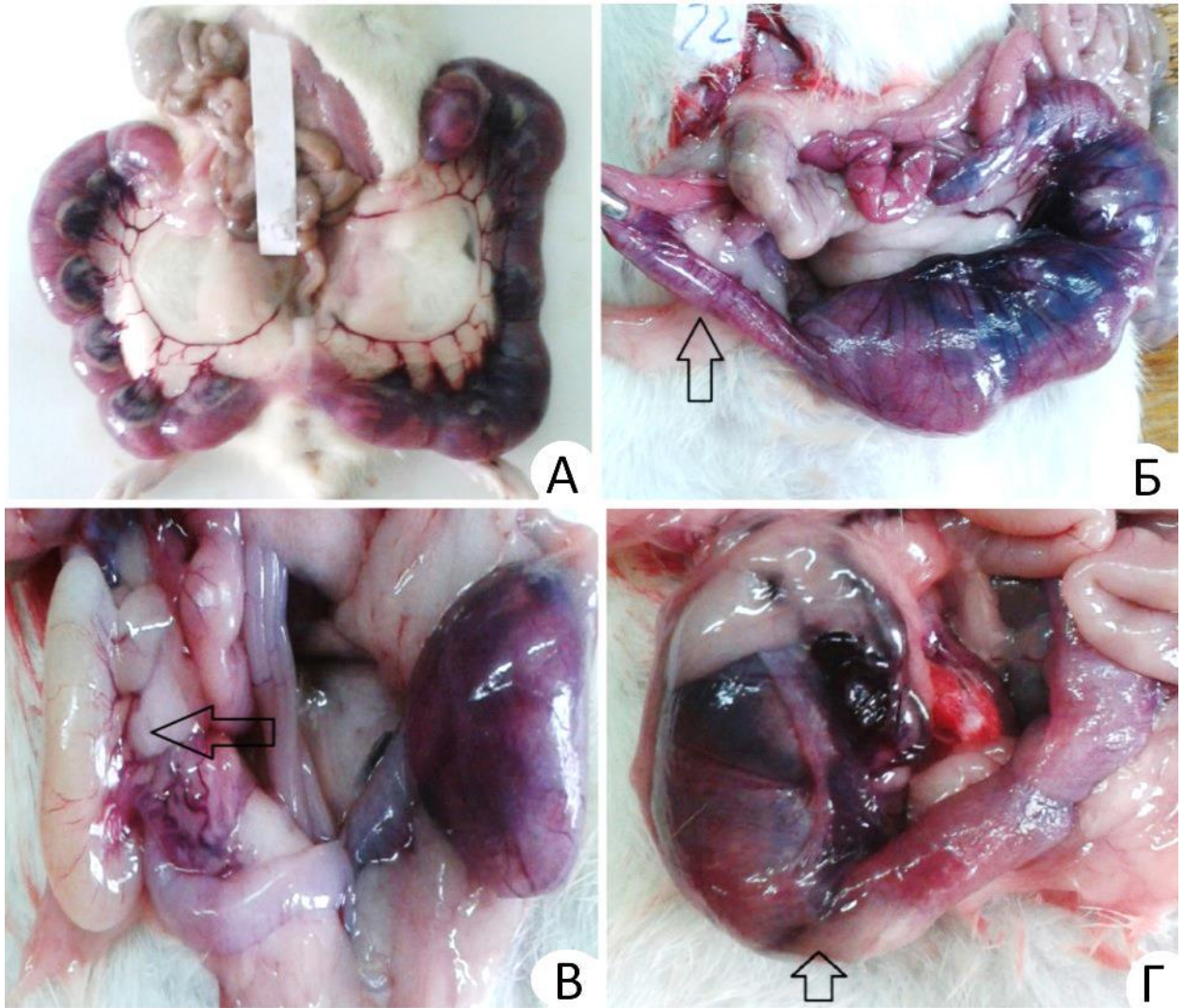


Рис. 5.26. Дослідження репродуктивних показників. А – варіант нормальної вагітності в обох матках, Б – відсутність плодів у розі матки на боці операції у тварини з конгломератом (показано стрілкою), В – піометра на боці операції (показано стрілкою), Г – відсутність плодів нижче місця операції внаслідок звуження матки (місце звуження показане стрілкою).

Таким чином, застосування похідних плаценти для поліпшення прогнозу при гінекологічних операціях має свої особливості. По перше похідні плаценти стимулюють репарацію, функцію яєчника та більш повноцінне відновлення операційної травми матки. Застосування протиспайкової терапії одночасно з похідними плаценти дозволяє уникнути підвищеного спайкоутворення.

Висновки до розділу.

В результаті дослідження дії похідних плаценти на статеву систему піддослідних тварин було виявлено, що їх дія з одного боку має спільні риси з МСК [30, 187, 228, 280, 314], з іншого – має схожі риси з впливом плаценти на жіночий організм при вагітності [113, 302]. Так, виявлено позитивний трофічний ефект щодо матки та яєчників в нормі і при ішемізації, при цьому фолікулогенез тимчасово пригнічується, що можна пояснити дією хоріонічного гонадотропіну та статевих гормонів в комплексі з антиоксидантними та ростовими факторами [30, 113, 314]. Подібна реакція спостерігається при застосуванні плацентарного матеріалу для лікування наслідків хіміотерапії [314]. Показано позитивна дія на перебіг аутоімунної патології, що характерно як для МСК, так і для перебігу цих процесів при вагітності [189, 302]. Відновлення фертильності при СПКЯ, в моделі, викликаній блокуванням прогестеронових рецепторів та порушенням регуляції може бути пов'язано як з центральними механізмами, через дію гонадотропінів та естрогенів, так і з відновленням після прямого впливу на яєчники та матку. Також, для СПКЯ описано роль оксидативного стресу та хронічного запалення в патогенезі [218], які можуть невілюватися застосуванням похідних плаценти [280]. В той же час при застосуванні КЕП спостерігали підсилення інфекційного процесу, що пояснювали загальним імуносупресивним впливом плаценти, який спостерігається при вагітності [302]. Підвищення спайкоутворення в моделях інфекційного процесу та перекруту, при якому відбувається асептичне запалення, можна пояснити не тільки активацією інфекційного процесу, а й проліферативної фази запалення, що в цьому випадку несе негативні наслідки [21].

Результати проведеного дослідження з урахуванням літературних даних дозволяє характеризувати КЕП, та можливо інші плацентарні біоб'єкти як перспективні щодо лікування або реабілітації при патологічних станах жіночої статевої системи в патогенезі яких є ендокринопатія, аутоімунний компонент, яєчникова недостатність, ішемічний компонент. В

той же час наявність гострого інфекційного або асептичного запалення в черевній порожнині є протипоказанням для застосування КЕП.

У результаті проведених досліджень щодо впливу КЕП на жіночу репродуктивну систему в нормі та при патологічних станах можна зробити наступні висновки. Гуморальні фактори, які виділяються після введення кріоконсервованих експлантів плаценти людини мишам-самицям мають позитивний трофічний ефект на матку та яєчники. При цьому повноцінний фолікулогенез та овуляція тимчасово пригнічуються, що можна пояснити дією хоріонічного гонадотропіну чи інших факторів. Кріоконсервовані експланти плаценти людини позитивно впливають на саногенез при патологічних станах, пов'язаних із аутоімунними процесами, ендокринопатією (зокрема СПКЯ, пов'язаним з гіперестрогенією) та яєчникомовою недостатністю. Кріоконсервовані експланти плаценти негативно впливають на перебіг інфекційного процесу, підвищуючи ризик формування спайок, підсилюючи запалення у малому тазу, при цьому можлива активація інфекційного процесу чи формування трубнооваріального безпліддя.

Результати розділу опубліковані в роботах [1-5, 7, 12, 13, 15-19, 21, 23, 25, 27-29, 37-39, 41, 47-49, 54, 55, 58, 64-68] додатку А.

АНАЛІЗ ТА ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

На сучасному етапі розвитку медицини тканинна терапія, кріомедицина, біоінженерія, клінічна медицина в тому числі акушерство та гінекологія тісно пов'язані між собою. Майбутні успіхи медицини все більш пов'язують з розвитком її нових напрямків. Вивчення складних механізмів функціонування живих систем призводить до розуміння неможливості, низької ефективності або надмірної вартості застосування окремих фармакопейних молекул в терапії низки захворювань. Замість фармакологічних речовин більш доцільним визнається використання компонентів живих організмів – окремих молекул, девіталізованих структур, клітин, тканин, тканинноінженерних структур, органів.

Напрямок біомедицини не є цілком новим, оскільки лікарі намагались застосовувати компоненти живих організмів в лікуванні з давніх часів та завжди існували намагання створити нові методи їх застосування. Але в XX сторіччі з розвитком біології та розуміння функціонування живих систем на всіх рівнях, трансплантології та поняття гістосумісності, хірургії, анестезіології та антисептики, з можливістю виконання великих об'ємів оперативного втручання, репродуктології з можливістю екстракорпорального запліднення, кіробіології та кріомедицини з можливістю створення низькотемпературних банків зробило можливим використання клітинних та тканинних технологій. Погляди суспільства також змінюються в бік підтримки нових іноваційних стандартів лікування. Ряд технологій вже використовуються в сучасній медицині. Репродуктологія використовує екстракорпоральне запліднення з культивуванням, трансплантацією ембріонів. Хірургія, ортопедія, стоматологія використовують алло- та ксеноматеріали кісток, ауто фібрин, плазму, збагачену тромбоцитами. В косметології використовується аутоплазма, тромбоцитарні концентрати. В трансфузіології та трансплантології вже давно існують стандарти застосування біоматеріалу.

Новітні напрямки медицини пов'язані з розвитком застосування життєздатних матеріалів та біоінженерних структур, стовбурових клітин. Для їх застосування необхідно створення в першу чергу біобанків з можливістю ефективного довгострокового зберігання. Низькотемпературні технології вирішують три основні проблеми застосування біологічного матеріалу: надають час, необхідний для обстеження на інфекційну безпеку, гістосумісність та дозволяють створити запас необхідний матеріалу, який можна застосовувати у разі потреби. Втім технології низькотемпературного та гіпотермічного зберігання не є досконалими, що особливо стосується складних біологічних систем.

Існує багато можливих джерел отримання біологічного матеріалу для потреб медицини. Це може бути добровільне донорство, кадаверний матеріал, абортний матеріал, аутоматеріал, тваринний матеріал. При цьому спроби виділення стовбурових клітин, чи інших біоматеріалів були з багатьох тканин та органів: кров, кістковий мозок, шкіра, жирова тканина, пульпа зуба, плацентарний матеріал, кісткова тканина та багато інших. Клітини та тканини отримані з різних джерел мають різні властивості. Зрозуміло, що навіть коли стовбурові клітини з плаценти, кісткового мозку та жирової тканини дорослої людини мають східний фенотип, та диференціювальний потенціал що відповідає мінімальним критеріям МСК їх властивості не можуть бути цілком однаковими. Перевагу мають ті джерела, що забезпечують багато матеріалу, мають низьку імуногенність, високу активність клітин та мають мало етичних проблем. Цим критеріям відповідає у першу чергу плацентарний матеріал.

Широке застосування плацентарного матеріалу відкриває нові горизонти для сучасної медицини. Матеріал є утильним та велика його кількість залишається після кожних пологів. Отримання матеріалу є безпечним для донору та прийнятним для суспільства. Можливо застосування аутоматеріалу. З плаценти можна отримати клітини, що відносяться до МСК, елементи плацентарної крові – еритроцити,

гемопоеичні клітини, сироватка кордової крові, оболонки, що можуть бути застосовані як пластичний матеріал, екстракти, тканини пуповини. Стівбурові клітини плаценти відносяться до дорослих, вони вже не є ембріональними, але їх метаболічна активність та проліферативний потенціал перевищує характеристики клітин, отриманих у дорослої людини. Під час вагітності природним чином відтворюються моделі органної, тканинної та клітинної трансплантації. Плацента та плід в матці можна вважати моделлю органної трансплантації, яка можлива в тому числі при повній генетичній несумісності, що доведено в технологіях донації ооцитів та подальшого їх використання в допоміжних репродуктивних технологіях. Моделлю тканинної та клітинної трансплантація при вагітності є депортація трофобласту, яка може бути відтворена, навіть при відсутності вагітності. Ці процеси з одного боку створюють підґрунття для застосування плацентарного матеріалу, з іншого – для вивчення механізмів толерантності.

За даними U.S. National Library of Medicine (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) та U.S. National Institutes of Health (ClinicalTrials.gov) зареєстровано близько 16000 досліджень та 400 клінічних випробувань, присвячених похідним плаценти. Більшість з них присвячено клітинам кордової крові та ізольованим клітинам плаценти, оболонок, пуповини, менше – плідним оболонкам, екстрактам, сироватці кордової крові та амніотичній рідині. Найчастіше похідні плаценти застосовувались при патології ендокринної, нервової системи, органів зору, кровотворення, при аутоімунних станах, ішемічних, дистрофічних та дегенеративних порушеннях.

Важливими особливостями плаценти є тропність до жіночої статевої системи, можливість змінювати фізіологічні процеси та перебіг хвороб в організмі жінки під час та після вагітності. Це відкриває нові можливості застосування похідних плаценти, використовуючи їх природні властивості.

Терапія похідними плаценти в першу чергу може бути спрямована на лікування гінекологічної патології, з якої найбільш актуальними на

теперішній час є непліддя, яєчникова недостатність, аутоімунні та ендокринні розлади.

Таким чином актуальними та невирішеними є питання кріоконсервування та гіпотермічного зберігання різних похідних плаценти, в тому числі з урахуванням GMP стандартів на основі розуміння пошкоджуючої дії факторів кріоконсервування та з'ясування механізмів дії кріоконсервованих похідних плаценти на жіночу статеву систему в нормі та при патологічних станах.

В зв'язку з чим метою дослідження було визначити закономірності впливу факторів кріоконсервування та низькотемпературного зберігання на морфофункціональні характеристики похідних плаценти, що можуть бути застосовані у медичній практиці та вивчити їх вплив на перебіг експериментальної гінекологічної патології на моделях найбільш розповсюджених та соціально значущих захворювань.

Для вирішення цієї мети були поставлені наступні задачі, які включали:

1. Визначити стабільність структурних та функціональних характеристик похідних плаценти, що можуть бути застосовані в медичній практиці (експлантів, клітин в суспензії, в сфероїдах та інкапсульованих в альгінатних сферах) після їх отримання.
2. Провести оцінку впливу субнормотермічного (20°C) та гіпотермічного (4°C) зберігання на структуру, життєздатність, метаболічну активність, культуральні характеристики похідних плаценти при їх короточасному зберіганні та транспортуванні.
3. Дослідити збереженість морфофункціональних характеристик та особливості ушкодження різних похідних плаценти при кріоконсервуванні в залежності від їх структури.
4. З'ясувати вплив кріозахисних середовищ з різним складом на збереженість клітин плаценти при кріоконсервуванні.
5. Встановити вплив різних режимів кріоконсервування та коливання температур при низькотемпературному зберіганні на

морфофункціональний стан клітин плаценти.

6. Оцінити вплив клітин та експлантів плаценти на ізолювані компоненти жіночої статеві системи та систем її регуляції (органотипові культури яєчників, маток, фібробласти, нервові клітини, спленоцити) *in vitro*.
7. Порівняти властивості свіжовиділених та кріоконсервованих клітин та експлантів плаценти у системі *in vitro*.
8. З'ясувати вплив кріоконсервованих експлантів плаценти на естральний цикл, структуру яєчників, маток та фертильність здорових експериментальних тварин.
9. Встановити в експерименті вплив кріоконсервованих експлантів плаценти на перебіг розповсюдженої та соціально значущої гінекологічної патології (інфекційний процес, передчасне виснаження яєчників, ішемічне ураження яєчників, синдром полікістозних яєчників, атифосфоліпідний синдром, операційна травма).

Враховуючи визначену мету та поставлені задачі було заплановано три послідовних етапи досліджень.

На першому етапі отримували похідні плаценти (клітини, експланти, сфероїди, альгінатні мікросфери з клітинами плаценти), вивчали їх кріочутливість, особливості кріоушкоджень, перспективність довгострокового зберігання. Для дослідження було обрано кілька трофобластичних структур, які можуть бути використані в медичній практиці. Експланти, що представляють відокремлені ворсини є природною структурою плаценти здатною до функціонування в чужорідному організмі. Сфероїди були обрані, як структура, що містить функціональні клітини без зайвих компонентів. Альгінатні мікросфери з клітинами плаценти обрані, як клітини в стані імунологічної ізоляції. Клітини обрані як класичний об'єкт регенеративної медицини, трансплантології та кріомедицини, тому всі експерименти проводились в першу чергу на клітинах.

Визначали вихідні параметри, збереженість та життєздатність після кріоконсервування, гіпотермічного зберігання, моделювання

довгострокового зберігання. Особливу увагу приділяли визначенню механізмів кріоушкодження. Обирали найбільш перспективні форми плацентарних об'єктів для клінічного застосування.

На другому етапі дослідження вивчали вплив кріоконсервованих похідних плаценти на ізольовані біологічні системи. Методами парного культивування оцінювали вплив факторів, що виділяють похідні плаценти на культури клітин фібробластів, як загальноприйнятий об'єкт, нервові клітини, як елемент регуляції статевої функції, спленоцити, як елемент імунної системи, органотипові культури матки та яєчників, як основні органи мішені.

На третьому етапі вивчали вплив похідних плаценти на організм лабораторних тварин, як в нормі, так і при типових патологічних станах жіночої репродуктивної системи. На інтактних тваринах було вивчено вплив похідних плаценти на структуру оваріального циклу, фертильність. У якості патологічних процесів були обрані інфекційний процес (на прикладі моделі перитоніту), аутоімунний процес (антифосфоліпідний синдром), ендокринна патологія (на прикладі синдрому полікістозних яєчників), травма, ішемія, ятрогенна патологія (стан після хіміотерапії). Визначали вплив похідних плаценти на інтактний організм, показання, протипоказання для їх застосування при гінекологічній патології, ефективність.

Після отримання похідних плаценти у різних видах було підтверджено, що культура клітин має стійкі характеристики, фенотип та диференціювальний потенціал МСК, високі проліферативні характеристики та метаболічну активність. Можливе отримання культури клітин з різних структур плаценти. Було обрано хоріальні оболонки, оскільки вони містять велику кількість клітин, але не мають природної стійкості проти ферментних систем, що дозволяє технічно легше отримати більшу кількість клітин. Ворсини плаценти виявились більш стійкими до ферментативної обробки. Руйнація синцитію призводила до утворення желеподібного розчину, який потребував додавання ДНКаз, яка в свою чергу може не тільки руйнувати гель, але й клітини.

Гіпотермічне та субнормотермічне зберігання розглядалося в першу чергу як засіб транспортування біологічних об'єктів від лікарні де вони отримані до лабораторії та від кріобанку до лікарні. Визначено, що більш ефективним методом короткочасного збереження є субнормотермічне зберігання – при температурі жилого приміщення 20°C що забезпечує збереженість кількості клітин, їх життєздатності та культуральних властивостей протягом 48-и годин, в подальшому спостерігається різка втрата як кількості клітин, так і життєздатності, максимальним строком зберігання, при якому можливе відновлення моношару є 72-и год. При цьому воно не потребує додаткового обладнання. Гіпотермічне зберігання при 4°C-6°C дозволяє зберегти культуру протягом 24 годин, та потребує додаткових умов, холодильного устаткування, тому воно не є прийнятним для культур клітин. Оптимальними кріопротекторами для кріоконсервування МСК плаценти, що дозволяють зберегти максимальну кількість клітин, життєздатність, метаболічні та культуральні властивості є ДМСО та пропандіол. При цьому важливим є зберігання іонного складу середовища та кислотно-лужного балансу, в той час, як додавання сироватки значно не впливає на результат кріоконсервування.

При спробі зниження токсичності кріозахисних середовищ, використання дозволених фармпрепаратів згідно вимог GMP у якості кріозахисних середовищ були застосовані речовини, які мають властивості кріопротекторів та застосовуються у медичній практиці. Визначено, що можливо кріоконсервування МСК плаценти без середовища культивування, при застосування декстрину, полівінілпіролідону чи пропандіолу на основі розчинів Рінгеру чи Хенксу. При цьому збереженість знижується на 20-30%, але на наш погляд при комбінації режимів кріоконсервування та складу середовища цей результат можна поліпшити.

Окрема увага приділялась питанням кріоконсервування та довгострокового зберігання матеріалу в низькотемпературному банку, з можливими коливаннями температури при штатних та аварійних ситуаціях,

таких як поповнення рівню азоту, транспортування, аварійного розморожування.

Виявлено, що при кріоконсервуванні клітин плаценти оптимальним режимом кріоконсервування є охолодження зі швидкістю $1^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ до -40°C з наступним зануренням у рідкий азот, підвищення цієї температури призводить до різкої втрати кількості клітин, та життєздатності, максимальною температурою, що дозволяє відновити культуру перед швидким охолодженням є -40°C . Зниження температури до -80°C не призводить до вірогідних змін. Це дозволяє використовувати обладнання лікарень відділень переливання крові для кріоконсервування. Повторне заморожування клітин плаценти без рекультивування призводить до втрати 50% кількості клітин та 20% життєздатності, що вказує на необхідність їх рекультивування у випадку аварійного розморожування. Коливання температури у кріосховищі також негативно впливають на збереженість клітин у разі більше 20 циклів коливань температур в діапазоні -196°C - -100°C , або коливаннях до -80°C більше 10 разів.

Проведене кріомікроскопічне дослідження також вказує на те, що при температурі нижче -40°C зміни мінімальні та відбувається у разі багатьох циклів температурних коливань. Механізмом цих порушень є об'ємні зміни у структурі льоду.

Отримані експланти плаценти також є стабільною органотиповою культурою. Її особливістю є те, що вона може довго існувати без флотуючих систем, оскільки ворсини плаценти пристосовані до рідкого середовища.

При кріоконсервування експлантів плаценти, при зниженні температури спостерігається мінімальне кристалоутворення всередині ворсин. Кристали збільшуються при розмороженні, пошкоджуючи мезенхіму. Так розміри кристалів співпадають з розмірами розривів та розширень мезенхіми, виявлених при гістологічних дослідженнях. Кристали, що утворюються в тканині менші за розміром, ніж кристали у середовищі, що оточує клітини. При цьому більшість клітин зберігаються життєздатними,

як за даними конфокальної мікроскопії з забарвленням EB/FDA, так і за при забарвленні нейтральним червоним, трипановим синім, МТТ, тесту відновлення резазуріну та тесту утилізації глюкози. При оцінці барвників більш проникають усередину ворсин FDA та трипановий синій, EB гірше за всі інші. Шляхом до покращення результатів збереження цілісних ворсин є зниження процесів рекристалізації при відігріві. Міжклітинне оточення ворсин та кількість клітин є оптимальними для збереження. Перспективним може бути створення штучних структур зі східними властивостями, в яких клітини знаходяться в рихлому міжклітинному середовищі. Гіпотермічне та субнормотермічне зберігання експлантів плаценти в середовищі культивування можливе протягом 3- 4 діб при цьому експланти є більш стійкими до субнормотермічного чи гіпотермічного зберігання, ніж клітини, що також можна пов'язати з особливостями міжклітинного середовища.

Отримана культура сфероїдів клітин плаценти була нестабільною, що можна пов'язати з відносно слабкими міжклітинними зв'язками. Сфероїди руйнуються при фізичних впливах (відмивання, центрифугування, піпетування), адгезують до поверхні культурального пластику, переходячи в моношар клітин. Подібні зміни проходять при кріоконсервуванні та гіпотермічному зберіганні. Сфероїд руйнуються, розпадаються на окремі клітини.

При кріоконсервуванні сфероїдів, в яких клітини пов'язані між собою за рахунок міжклітинних зв'язків спостерігаються гірші результати, ніж при кріоконсервуванні клітин та експлантів. Найбільше руйнування спостерігається при рекристалізації на етапі відігріву препарату. Сфероїди руйнуються з причини кристалізації та рекристалізації всередині та на поверхні самого сфероїда. Під дією ДМСО ослаблюються та втрачаються адгезивні властивості клітин, що було показано окремими експериментами. Ці зміни візуалізуються при конфокальній та світловій мікроскопії: руйнуються як сфероїди, вивільнюючи окремі клітини, так і в меншому ступені окремі клітини, особливо ті, що локалізуються на поверхні сфероїду. При цьому

метаболичні характеристики кріоконсервованих культур сфероїдів в цілому мало відрізняються від характеристик окремих клітин.

Отримані альгінатні мікросфери та плівки з клітинами плаценти є досить стабільною культурою, яку можна оцінювати за метаболичними тестами та вітальним забарвленням за допомогою конфокальної мікроскопії.

Процеси, що виникають при кріоконсервуванні альгінатних мікро сфер з МСК вже досить вивчені, окрім кріомікроскопічного дослідження механізмів ушкодження. Отримані нами данні свідчать про неоднорідність льоду у сфероїдах при кріоконсервуванні. Так більшість препарату займають крупні кристали, а меншу частину – невеликі, що починають плавитися при більш низьких температурах. Гіпотеза про взаємодію альгінату з ДМСО та перерозподіл ДМСО в препараті під час кріоконсервування була підтверджена тим, що при кріоконсервуванні альгінатів без ДМСО формування різних фракцій льоду не відбувалося. Також експериментальним шляхом встановлено, що розчини ДМСО мають властивості полімеризувати альгінат в концентрації вище 15%. При цьому той факт, що отримані альгінатні мікросфери розчиняються в розчині Версену, та утворення мікро сфер в присутності EDTA неможливо говорить про те, що ДМСО зв'язується з альгінатом нековалентно, як іони кальцію з утворенням хелатів. При кріомікроскопічних дослідженнях видно, що ушкоджуються клітини, що лежать між кристалами та на їх границях – при розморожуванні спостерігаються комірці, наповнені клітинним вмістом. Попередні дослідження також свідчать про те, що збереженість клітин при культивуванні в мікро носіях нижча, за клітини, кріоконсервовані в суспензії.

Таким чином, найбільш перспективними об'єктами для низькотемпературного банку є клітини плаценти та експланти, які добре зберігаються при кріоконсервуванні та в субнормотермічних та гіпотермічних умовах. Вони також більш стабільні до дії інших факторів. Інші представлені об'єкти доцільно формувати з клітин плаценти вже після розморожування. Розуміння механізмів кріоушкодження цих об'єктів може

дозволити моделювати більш стійкі тканинноінженерні структури, які повинні мати деякий простір між клітинами та містити міжклітинну речовину, що не вісмоде з кріопротектором.

В ізольованих системах *in vitro* виявлено, що вплив кріоконсервованих та нативних похідних плаценти на культури клітин та тканин вірогідно не відрізняється. Це створює передумови для ефективного створення кріобанків похідних плаценти.

Відсутність значного впливу середовищ, кондиційованих нативними та кріоконсервованими похідними плаценти на культуру фібробластів свідчить про відсутність неспецифічного впливу похідних плаценти на органи та тканини через цей компонент строми. Це може бути пов'язано з тим, щ фібробласти є досить активно проіферуючими та метаболічно активними клітинами, та їх подальша стимуляція гуморальними факторами, що виділяється плацентою вже не можлива, або не має сильного впливу.

Нервова система є вищею ланкою регуляції функцій жіночої статеві функції, яка починається з кори мозоку, гіпофізу, гіпоталамусу, а потім закінчується яєчниками та маткою. Кожна з цих ланок певною мірою незалежна, а в чомусь залежить від інших компонентів. Продемонстровано, що середовища, кондиційовані нативними та кріоконсервованими похідними плаценти позитивно впливають на метаболічну активність нативної культури нейроклітин. Модель глутаматної ексайтотоксичності обрано як типовий механізм ушкодження нейроклітин при вікових змінах та багатьох патологічних станах. Позитивний вплив продемонстровано також в моделі глутаматної ексайтотоксичності при застосуванні середовищ, кондиційованих клітинами плаценти як до глутматного впливу, так і після нього.

Вплив середовищ, кондиційованих нативними та кріоконсервованими похідними плаценти на яєчники при короткотривалому культивуванні можна оцінити, як пригнічуючий, типовий для тих процесів, що проходять при вагітності, та обумовлені в першу чергу дією хоріонічного гонадотропіну.

Втім після вагітності та зникнення цих факторів можна очікувати відновлення функції. Матки під дією середовищ, кондиційованих нативними та кріоконсервованими похідними плаценти підвищують свою метаболічну активність, що також характерно, для дії гуморальних факторів, пов'язаних з вагітністю. Враховуючи відсутність дії на фібробласти та найбільшу зміну ендометрію при морфологічному дослідженні культури можна зробити висновок про саме його стимуляцію, що відкриває нові можливості в лікуванні непліддя, оскільки матковий фактор непліддя пов'язаний частіше з атрофією чи неспроможністю ендометрію.

В результаті дослідження дії похідних плаценти на статеву систему піддослідних тварин було виявлено, що їх дія з одного боку має спільні риси з МСК, з іншого – має схожі риси з впливом плаценти на жіночий організм при вагітності.

Так, виявлено позитивний трофічний ефект щодо матки та яєчників в нормі і при ішемізації, при цьому фолікулогенез тимчасово пригнічується, вагітність настає пізніше, що можна пояснити дією хоріонічного гонадотропіну та статевих гормонів в комплексі з антиоксидантними та ростовими факторами. Ендометрій також гіпертрофується при застосуванні похідних плаценти, що співпадає з даними, отриманими в експериментах *in vitro* та може бути застосовано при лікуванні непліддя маткового генезу. Кількість плодів при цьому підвищується не достовірно, як і їх маса, що однак дозволяє робити припущення про незначну стимуляцію фолікулогенезу на тлі загальної стимуляції яєчників.

При застосуванні КЕП спостерігали підсилення інфекційного процесу, що пояснювали загальним імуносупресивним впливом плаценти, який спостерігається при вагітності. Підвищення спайкоутворення в моделях інфекційного процесу та перекруту, при якому відбувається асептичне запалення, можна пояснити не тільки активацією інфекційного процесу, а й проліферативної фази запалення, що в цьому випадку несе негативні наслідки та може сприяти виникненню тубоперітонеального непліддя. Окрім

спайкоутворення виявлено, що при активації інфекційного процесу відбувається токсична атрофія матки та яєчників, яка також може впливати на стан репродуктивної системи.

Вплив похідних плаценти на перебіг аутоімунної патологій цілком очікуваний, оскільки при вагітності та при дії МСК спостерігається фізіологічна перебудова імунної системи з супресивним компонентом. При застосуванні похідних плаценти спостерігали явища десенсибілізації з трофічним впливом на репродуктивну систему, що можливо застосувати у якості прегравідарної підготовки та забезпечити повноцінну імплантацію, попередивши розвиток плацентарної дисфункції та патології другої половини вагітності. Повноцінного відновлення репродуктивних показників при застосуванні КЕП на тлі АФС не відбулося, що свідчить про необхідність додаткового застосування антикоагулянтної терапії.

Відновлення фертильності при СПКЯ, в моделі, викликаній блокуванням прогестеронових рецепторів та порушенням регуляції може бути пов'язано як з центральними механізмами, через дію гонадотропінів та естрогенів, так і з відновленням після прямого впливу на яєчники та матку. Також, для СПКЯ описано роль оксидативного стресу та хронічного запалення в патогенезі, які можуть невілюватися застосуванням похідних плаценти.

Перекрут яєчників моделює ураження у наслідок гострої ішемізації та крововиливу в паренхіму яєчників та маток щурів. Застосування КЕП у даному разі призводить до більш повного відновлення генеративних елементів яєчників та ендометрію, що співпадає з попередніми результатами але спричиняє підвищене спайкоутворення.

Основною причиною передчасної недостатності яєчників є хіміотерапія, яка проводиться у молодих жінок з приводу онкозахворювань. Хіміотерапевтична модель недостатності яєчників також застосовується для відтворення зниження оваріального резерву без видалення яєчників та надає можливості їх відновлення. При застосуванні цієї моделі ми спостерігали

значне ураження статевої з проявами яєчникової недостатності. Крім того значно уражувалися інші органи, перед усім печінка та нирки. Самовільний регрес цієї моделі практично не спостерігався, деяке відновлення естрогенного статусу відбувалося вірогідніше завдяки позагонадному синтезу естрогенів в жировій тканині, яєчники та матка залишалися атрофічними. В печінці залишалися вогнища цирозу, в нирках токсичні явища в канальцях та клубочках. При застосуванні похідних плаценти спостерігали стимуляцію органів статевої системи, що також знаходило своє відображення в відновленні статевої функції та естрального циклу. Можливе повне відновлення матки, оваріальний резерв був втрачений у більшості тварин. Часткове відновлення естрального циклу знаходило морфологічне підтвердження в яєчниках у вигляді гіпертрофії окремих структур, схожих на генеративні елементи, але без ооцитів, яких було втрачено. Більш ефективними виявилися КЕП, ніж клітини плаценти.

Оперативне лікування гінекологічних захворювань є однією з перспективних галузей застосування похідних плаценти. Від застосування клітинної терапії очікується більш повне відновлення органів жіночої статевої системи після оперативного лікування. Насамперед маткових туб, операції на яких зазвичай приводять оклюзії та непліддя, або позаматкової вагітності. В моделі операції на матках порівнювали ефективність застосування КЕП, та клітин плаценти. Визначено, що при застосуванні похідних плаценти більш ефективно відновлюється місце травми матки та замість грубого рубця або стоншення відновлюються її шари. Одночасно спостерігається більш інтенсивне утворення спайок навкруги місця операції. Застосування клітин плаценти в місце операції не призводить до покращення ефекту, але ще посилює спайкоутворення.

Обрані моделі містять у собі основні можливі елементи патогенезу захворювань жіночої статевої системи та дозволяють всебічно оцінити вплив похідних плаценти. В результаті проведених досліджень щодо впливу КЕП на жіночу репродуктивну систему в нормі та при патологічних станах можна

зробити наступні висновки. Гуморальні фактори, які виділяються після введення кріоконсервованих експлантів плаценти людини мишам-самицям мають позитивний трофічний ефект на матку та яєчники в нормі та після їх ураження хімічними або фізичними факторами. При цьому повноцінний фолікулогенез та овуляція тимчасово пригнічуються, що можна пояснити дією хоріонічного гонадотропіну, який в свою чергу може викликати типовий rebound ефект. Кріоконсервовані експланти плаценти людини позитивно впливають на саногенез при патологічних станах, пов'язаних із аутоіммунними процесами, ендокринопатією (зокрема СПКЯ, пов'язаним з гіперестрогенією) та яєчникомовою недостатністю. Кріоконсервовані експланти плаценти негативно впливають на перебіг інфекційного процесу, підвищуючи ризик формування спайок, підсилюючи запалення у малому тазу, при цьому можлива активація інфекційного процесу чи формування трубооваріального безпліддя.

ВИСНОВКИ

Дисертаційна робота містить теоретичне обґрунтування та експериментальне вирішення проблеми низькотемпературного зберігання похідних плаценти, їх ефективного диференційованого застосування при лікуванні експериментальної гінекологічної патології. Встановлено, що похідні плаценти можуть бути ефективно збережені при низьких температурах у формі експлантів та суспензій клітин з застосуванням запропонованих програм та покращують перебіг гінекологічної патології аутоімунного, ішемічного, дистрофічного, ендокринного, токсичного генезу, але погіршують перебіг гострої інфекційної патології та ризик спайкоутворення.

1. Встановлено, що експланти, клітини плаценти в суспензії та в альгінатних мікросферах зберігають структуру, життєздатність та метаболічні характеристики (за даними вітального забарвлення, тестів МТТ та відновлення резазурину) при культивуванні. Сфероїди, отримані з клітин плаценти є нестійкими, мають тенденцію до руйнування та адгезії. Клітини, виділені з ворсин плаценти, плідних оболонок мають характеристики МСК (імунофенотип CD90+, CD73+, CD105+, CD34-, здатні до індукованого диференціювання в адипогенному, хондрогенному та остеогенному напрямку).
2. Виявлено, що при субнормотермічних умовах (+20°C) експланти, клітини плаценти в суспензії та в альгінатних мікросферах зберігають структуру, життєздатність та метаболічні характеристики 48 годин, сфероїди - 24 години. При зниженні температури до гіпотермічних умов (+4°C) термін збереження знижується до 24 годин для всіх похідних плаценти.
3. Кріоконсервування під захистом 10% диметилсульфоксиду та охолодженням зі швидкістю 1°C/хв до -80°C з наступним зануренням у рідкий азот дозволяє отримати збереженість клітин та експлантів плаценти

більш 90% за показниками структурної цілісності та життєздатності, клітин в альгінатних сферах – близько 70%, сфероїдів – близько 50% зі значним руйнуванням.

4. Встановлено, що типовими кріоушкодженнями для експлантів плаценти є розриви сполучної тканини та десквамація трофобласту внаслідок росту кристалів. Для сфероїдів з клітин плаценти характерне пошкодження кристалами міжклітинних зв'язків та загибель клітин по периферії сфероїдів. В альгінатних гранулах з клітинами плаценти при кріоконсервуванні утворюються зони з великими кристалами (до 150 мкм), та зони з невеликими кристалами (до 3 мкм), що є результатом взаємодії кріопротектору з альгінатом.
5. Максимальна збереженість клітин плаценти на рівні більше 80% спостерігається при застосуванні у якості кріопротекторів диметилсульфоксиду, пропандіолу, етиленгліколю. При застосуванні сахарози, гліцерину життєздатність клітин не перевищує 70%. Заміна середовища DMEM сольовими розчинами NaCl, Рінгера чи Хенксу зменшує кількість життєздатних клітин після кріоконсервування. Наявність сироватки не впливає на кріозахисні властивості середовищ.
6. Доведено, що для ефективного кріоконсервування клітин плаценти необхідно проводити охолодження зі швидкістю 1°C/хв до -40°C, або нижче, з наступним зануренням у рідкий азот. Повторне заморожування клітин плаценти без рекультивування призводить до втрати близько 50% клітин. При коливанні температур в кріосховищі в межах -196°C- - 100°C до 20 разів збереженість клітин плаценти залишається незмінною. При більшій кількості коливань, або коливаннях температури до -80°C кількість клітин, їх життєздатність, метаболічні характеристики знижуються, водночас збільшується кількість апоптотично змінених клітин.
7. В системі *in vitro* середовища, кондиційовані клітинами та експлантами плаценти підвищують метаболічну активність нейроклітин, органотипових культур матки, пригнічують її в культурах яєчників, спленоцитів та не

впливають на метаболічну активність фібробластів.

8. Встановлено, що середовища, кондиційовані кріоконсервованими похідними плаценти вірогідно більше пригнічують метаболічну активність спленоцитів, ніж свіжовиділеними та чинять однаковий вплив на метаболічну активність та морфологічні характеристики нейроклітин, фібробластів, органотипових культур матки та яєчників.
9. Імплантація кріоконсервованих експлантів плаценти здоровим експериментальним тваринам призводить до гіпертрофії яєчників, матки, затримки овуляції та часу настання вагітності, не впливає на репродуктивні показники.
10. Показано, що імплантація кріоконсервованих експлантів плаценти при несанованому інфекційному процесі, знижує кількість тварин, що завагітніли з 80 до 40% та середню кількість плодів через підвищене спайкоутворення та активацію гострого запального процесу.
11. Виявлено, що імплантація кріоконсервованих експлантів плаценти при експериментальному антифосфоліпідному синдромі дозволяє знизити активність лімфоцитів за РБТЛ та швидкість згортання крові, підвищити кількість плодів. В моделі синдрому полікістозних яєчників застосування кріоконсервованих експлантів плаценти дозволяє відновити естральний цикл у 90% тварин, підвищити відсоток вагітних тварин з 0 до 40%. В моделі передчасного виснаження яєчників після хіміотерапії застосування кріоконсервованих експлантів плаценти відновлює естральний цикл, статеву функцію, структуру матки, але не фертильність. В моделі ішемічного ураження яєчників після застосування кріоконсервованих експлантів плаценти вірогідно відновлюється кількість жовтих тіл та підвищується кількість плодів.

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

Проведене дослідження охоплювало декілька проблем біології та медицини, що пов'язані з похідними плаценти: можливості гіпотермічного, субнормотермічного та низькотемпературного зберігання, атестації багатоклітинних структур в низькотемпературних банках, можливості створення штучних багатоклітинних структур з низькою кріочутливістю, можливості застосування кріоконсервованих похідних плаценти для лікування експериментальної гінекологічної патології.

1. Для короткочасного зберігання похідних плаценти протягом 24-48 годин, яке частіше необхідне для їх транспортування доцільно застосовувати субнормотермічні умови – близько 20°C та середовище культивування у концентрації 1×10^5 клітин/мл, чи 10 мл на 1 г експлантів.
2. Для ефективного кріоконсервування похідних плаценти в дослідницьких цілях доцільно застосовувати повільне охолодження зі швидкістю 1°C/хв, до -40°C з наступним зануренням у рідкий азот під захистом 10% диметилсульфоксиду на середовищі культивування.
3. Перспективними для кріоконсервування похідних плаценти в медичних цілях з метою зниження токсичності є пропандіол та розчин Рингера, повільне охолодження зі швидкістю 1°C/хв, до -40°C з наступним зануренням у рідкий азот. 6% декстран (Поліглюкін), 6% полівінілпіролідону (Неогемодез), 6% сорбітол (Реосорбілакт) та 6% гідроксиетилкрахмаль (Стабізол) мають низькі кріопротекторні властивості.
4. Для скрінінгової атестації збереженості клітин плаценти ефективними є МТТ тест, забарвлення трипановим синім, тест споживання глюкози з середовища. Для оцінки збереженості багатоклітинних структур доцільно застосовувати тест відновлення резазурину, тест споживання глюкози з середовища, забарвлення FDA/EB.

5. При створенні кріорезистентних носіїв, заселених клітинами важливо враховувати можливі зміни матеріалу носія при кріоконсервуванні та його взаємодію з компонентами кріозахисного середовища.
6. Для клінічного застосування більш перспективними є кріоконсервовані клітини та експланти плаценти за рахунок низької кріочутливості, ніж альгінатні сфери та сфероїди.
7. Похідні плаценти є перспективними для розробки методів лікування гінекологічної патології, аутоімунного, ішемічного, дистрофічного, ендокринного, токсичного генезу, протипоказані при гострій інфекційній патології та ризику спайкоутворення.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Аралов ОН Гормональные и иммунологические нарушения при невынашивании беременности и их коррекция с помощью гетеротопической трансплантации криоконсервированной плацентарной ткани [автореферат]. Харьков: Харьковский государственный медицинский университет. 2003. 19 с.
2. Астрелина ТА, Гомзяков АЕ, Кобзеева ИВ, Карпова ЕЭ, Круглова Я.А., Скоробагатова ЕВ и др. Оценка качества и безопасности применения криоконсервированных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток плаценты человека в клинической практике. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2013; 8(4): 82-6.
3. Багманов МА, Петров АМ. Новый препарат для лечения и профилактики послеродовых осложнений у коров. Актуал. пробл. вет. науки. – М.: МВА им. К.И.Скрябина, 1999. - С.20-21
4. Беляев ВИ, Лободин КА, Семенихин ИП Биологическая активность препаратов из плаценты. Ветеринария. 2002; 5:33-36
5. Боброва ЕН, Зинченко АВ, Щетинский МИ. Динамика насыщения ткани плаценты диметилсульфоксидом. Проблемы криобиологии. 2005; 15(1): 20-26.
6. Вернера І. Є. ред. Україна у цифрах у 2016 році Державна служба статистики України, 240 с.
http://www.ukrstat.gov.ua/druk/publicat/kat_u/publ1_u.htm
7. Гольцев А.Н., Юрченко Т.Н., ред. Плацента: криоконсервирование, клиническое применение. Харьков: СПД ФЛ Бровин А.В.; 2012. 318 с.
8. Грищенко В.И., Гольцев А.Н. Трансплантация продуктов фетоплацентарного комплекса. От понимания механизма действия к повышению эффективности применения. Проблемы криобиологии. 2001;1:54-85.
9. Грищенко В.И., Юрченко Т.Н., ред. Плацента: криоконсервирование, структура, свойства, перспективы клинического применения. Харьков:

СПД ФЛ Бровин А.В.; 2011. 292 с.

10. Грищенко ВИ, Нардид ЭО, Прокопюк ВЮ. Исследование эффективности применения нативной и криоконсервированной сыворотки кордовой крови в экспериментальной модели постгистерэктомического синдрома. Вісн. пробл. біології і медицини: Український науково-практичний журнал. 2010; 2: 68-72 .
11. Грищенко ВИ, Юрченко ТН, Прокопюк ОС. Новые криобиологические технологии получения клеточных и тканевых фетоплацентарных трансплантатов и их использование в медицине. Трансплантология. 2004; 7(3): 123-129.
12. Грищенко ВИ, Юрченко ТН, редактор. Прокопюк ОС, Чижевский ВВ, Прокопюк ВЮ, Волина ВВ. Плацента: криоконсервирование, структура, свойства, перспективы клинического применения. Харьков: СПД ФЛ Бровин А.В., 2011. Глава 5. Верификация биобезопасности и сохранности криоконсервированных плацентарных биообъектов; с. 207-245.
13. Грищенко ВІ, Юрченко ТМ, Прокопюк ОС, Страна ВІ, Козлова ВП, Прокопюк ВЮ винахідники; Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України патентовласник. Спосіб консервування тканин фетоплацентарного комплексу. Патент України № 30808. 15 груд 2000.
14. Грищенко МГ Патогенетичні основи вдосконалення допоміжних репродуктивних технологій у жінок, які перенесли запальні захворювання органів малого тазу [автореферат]. Харків: Харківський національний медичний університет. 2011. 36 с.
15. Грищенко ОВ, Морозова ТФ, Лахно ИВ, Розанова ЕД, Воротилин АМ. Улучшение функциональных свойств тканевых препаратов в программе КТПЧ (криоконсервированная ткань плаценты человека). Вестник проблем биологии и медицины. 1998; 19:20-28.

16. Жилка НЯ, Миронюк ІС, Слабкий ГО Характеристика деяких показників репродуктивного здоров'я жіночого населення України. *Wiadomości Lekarskie* 2018; LXXI (9): 1803-1808.
17. Зильбер АП. Шифман ЕМ. Акушерство глазами анестезиолога. «Этюды критической медицины», т. 3. Петрозаводск: Издательство ПГУ. 1997. 397 с.
18. Козуб ММ, Прокопюк ВЮ, Козуб МІ, Прокопюк ВЮ, Скібіна КП Порівняльна характеристика різних методик оперативного лікування, профілактики спайкоутворення та післяопераційної реабілітації у щурів з моделлю трубної вагітності в експерименті. Збірник наукових праць співробітників НМАПО ім. П.Л. Шупіка. 2016; 27(2): 224-31.
19. Котлик ЮА. Нарушения в организме женщин при бесплодии иммунологического генеза и способы их коррекции с использованием тканевой трансплантации [автореферат]. Харьков: Харьковский государственный медицинский университет. 2004. 20 с.
20. Кузьміна Ю. Стан системи мати-плацента-плід при хронічній гіпоксії плоду та його корекція [автореферат]. Київ: Інституті педіатрії, акушерства та гінекології АМН України. 2004. 35 с.
21. Кулаков ВИ, Адамян ЛВ, Мынбаев ОА. Послеоперационные спайки: Этиология, патогенез, профилактика. Москва: Медицина; 1998. 526 с.
22. Лахно І.В. Застосування кріоконсервованої суспензії плаценти для лікування фетоплацентарної недостатності. [автореферат]. Харків: Харківський державний медичний університет. 1999. 20 с.
23. Маликова Т.П. Амниотическая оболочка и её применение в офтальмологии. *Oftalmologia*. 2010; 3: 115-121.
24. Муризина ИЮ. Гормонально-цитокиновый профиль при нарушении процесса дородовой перестройки и пути его коррекции [автореферат]. Харьков: Харьковский государственный медицинский университет. 2004. 20 с.
25. Мусатова ИБ, Прокопюк ОС, Волина ВВ, Прокопюк ВЮ Создание

- многокомпонентных сред для криоконсервирования ткани плаценты. Биофизика живой клетки 2014; 10: 126-128.
26. Мусатова ИБ, Прокопюк ОС, Волина ВВ, Прокопюк ВЮ. Создание криозащитных сред для сохранения эксплантов ткани плаценты. Biotechnologia acta. 2013; 6 (6): 132-8.
27. Наказ МОЗ України № 1093 від 17.12.2013 Про затвердження Інструкції з виготовлення, використання та забезпечення якості компонентів крові <http://zakon0.rada.gov.ua/laws/show/z0030-14>
28. Нардид ОА. Влияние низких температур на белковые системы. Проблемы криобиологии и криомедицины. 2014;24(2): 83-101.
29. Нардид ЭО Биологическая активность криоконсервированной сыворотки кордовой крови в экспериментальной модели постгистерэктомического синдрома [автореферат]. Харьков: Институт проблем криобиологии и криомедицині НАН Украины. 2010. 23 с.
30. Насадюк КМ. Клеточные технологии в репродуктологии, акушерстве и гинекологии. Клітинна та органна трансплантологія. 2013; 1(1): 56-60.
31. Пасієшвілі НМ, Карпенко ВГ, Прокопюк ВЮ, Фалько ОВ. Вплив імуномодуляторів на перебіг вагітності при експериментальних інфекційно-запальних ураженнях матері та плоду. Sciences of Europe. 2016; 1(3): 15-23.
32. Паукер ВА, Шмаков РГ. Онкологические заболевания и беременность. Акушерство и гинекология. 2013; 1: 5-10.
33. Перчик О.А. Сохранность экстракта плаценты на этапах низкотемпературного хранения и его эффективность при урогенитальных расстройствах у женщин в климактерии [автореферат]. Харьков: Институт проблем криобиологии и криомедицині НАН Украины. 2007. 20 с.
34. Писаревский АА, Опиненко НА, Журавлёв ИВ. Функциональная активность тканей плаценты, селезёнки и печени при гнойно-септических заболеваниях в условиях экстракорпоральной детоксикации. Хирургия. 1998; 7: 40-43.

- 35.Питько ВА. Нові підходи в лікуванні жінок з підгострими запальними захворюваннями придатків матки [автореферат]. Харківський державний медичний університет. 2001. 36 с.
- 36.Погожих ДМ. Вплив низькотемпературного зберігання на властивості та біологічну активність екстрактів плаценти [автореферат]. Харків: Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України. 2009. 22 с.
- 37.Прибилова ОВ. Гормональні порушення та їх корекція в жінок з патологічним перебігом клімаксу шляхом застосування гетеротопічної трансплантації кріоконсервованої плацентарної тканини. Харків: Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України. 2000. 20 с.
- 38.Прокопюк В.Ю. Кріоконсервована хоріальна тканина в терапії материнсько-плодової інфекції (клініко-експериментальне дослідження). Проблемы криобиологии. 2011; 21(3): 338-249.
- 39.Прокопюк В.Ю., Гольцев А.М. , Прокопюк О.В , Фалько О.В., Шевченко М.В. Вплив кріоконсервованих мезенхімально стромальних клітин та експлантів плаценти на ізолювані тканини та *in vitro* клітини жіночої репродуктивної системи. Сімнадцяті данілевські читання *in print*
- 40.Прокопюк ВЮ, Гольцев АМ, Прокопюк ОС, Сомова КВ, Логінова ОО. Вплив кріоконсервованих експлантів плаценти на перебіг експериментального синдрому полікістозних яєчників. Вісник проблем біології і медицини. 2018; 142(1): *in print*
- 41.Прокопюк ВЮ, Гольцев АН, Прокопюк ОС, Трифонов ВЮ. Экспериментальное обоснование прегравидарной подготовки кріоконсервированными плацентарными препаратами. В: Сборник тезисов и программа V Всероссийский симпозиум с международным участием „Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии”; 2012 май 17-18; Уфа. Уфа: «Башкортостан», 2012, с. 184-5.
- 42.Прокопюк ВЮ, Грищенко ВИ, Прокопюк ОС, Чижевский ВВ Опыт работы низкотемпературного банка аутологичных и донорских препаратов кордовой крови и плаценты в регенеративной медицине. В:

- Ткачук ВА, редактор. Сборник тезисов Всероссийской научной школы-конференции «Стволовые клетки и регенеративная медицина»; 2010 октябрь 25-26, Москва. Москва: "МГУ"; 2010, с. 58-59.
43. Прокопюк ВЮ, Логінова ОО, Прокопюк ОВ, Сомова ЄВ. Вплив кріоконсервованих експлантів плаценти на відновлення яєчників після лікування перекуту. Світ біології та медицини. 2018; 63 (1): in print
44. Прокопюк ВЮ, Пасієшвілі НМ, Прокопюк ОВ, Карпенко ВГ, Прокопюк ОС. Спосіб профілактики первинної плацентарної недостатності. Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України. Патент України № 91122. 2014 червень 25.
45. Прокопюк ВЮ, Прокопюк ОС, Карпенко ВГ, Пасієшвілі НМ, Фалько ОВ. Спосіб корекції вікових порушень репродуктивної функції. Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України. Патент України № 72117. 2012 серпень 10.
46. Прокопюк ВЮ, Прокопюк ОС, Мусатова ІБ, Сорокіна ІВ, Логінова ОО, Сомова КВ Корекція інволютивних змін репродуктивної системи самиць старих щурів імплантацією кріоконсервованих фрагментів плаценти. Фізіол. журн. 2018; 64(4): 74-81.
47. Прокопюк ВЮ, Прокопюк ОС, Трифонов ВЮ, Зайченко ГВ. Спосіб моделювання акушерського антифосфоліпідного синдрому. Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України. Патент України № 62029. 2011 серпень 10.
48. Прокопюк ВЮ, Прокопюк ОС, Чижевський ВВ Спосіб кріоконсервування тканини плаценти. Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України. Патент України № 79009. 2013 квітень 10.
49. Прокопюк ВЮ, Прокопюк ОС. Механизмы влияния кріоконсервированных препаратов плаценты на репродуктивную функцию в периоде позднего онтогенеза. В: Гольцев АН, редактор. Тезисы докладов 36-й ежегодной конференции молодых учёных «Холод в биологии и медицине»; 2012 май 22-24; Харьков. Харьков: ИПКиК

НАНУ; 2010, с. 31.

50. Прокопюк ВЮ, Скибина КП, Прокопюк АВ, Козуб МН Экстракт плаценты ускоряет восстановление половой и репродуктивной функции после химиотерапии в эксперименте (пилотное исследование). Український радіологічний журнал. 2016; XXIV(1, 1): 159.
51. Прокопюк ВЮ, Скібіна КП, Козуб ММ, Прокопюк ОВ, Пасієшвілі НМ. Спосіб лікування передчасної недостатності яєчників. Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України. Патент України № 107968. 2016 червень 24.
52. Прокопюк ВЮ, Фалько ОВ, Прокопюк ОС, Воліна ВВ, Трифонов ВЮ. Аналіз методологічних підходів при моделюванні гестаційного антифосфоліпідного синдрому. Патологія. 2015; 32(2): 4-10.
53. Прокопюк ВЮ, Чуб ОВ, Шевченко М.А. Глутаматна ексайтотоксичність як метод вибору оцінки нейропротекторної дії лікарських препаратів *in vitro*. В: Черних ВП, редактор. Патофізіологія і фармація: шляхи інтеграції: тези доповідей VII Національного конгресу патофізіологів України з міжнародною участю. 2016 жовтень 5-7, Харків. Харків: НФаУ, с. 187.
54. Прокопюк ВЮ. Внеплацентарные трофобластические структуры: изучение, структура, функции, свойства, диагностическое и терапевтическое значение. Акушерство и гинекология. 2016; 2. – С. 49-54.
55. Прокопюк ВЮ. Етико-правові проблеми отримання, дослідження і застосування плацентарних препаратів. В: Тези п'ятого конгресу з біоетики; 2013 вересень 23-25; Київ, с.146-147.
56. Прокопюк ВЮ. Экспериментальная оценка эффективности прегравидарной подготовки и лечения антифосфолипидного синдрома. Клінічна та експериментальна патологія. 2011; X (2,36,1):79-82.
57. Прокопюк О.С., Прокопюк В.Ю. Криоконсервированные плацентарные биообъекты в тканевом аутобанке. В: акад. РАН и РАМН Миронов СП редактор. Сборник тезисов IV Всероссийского симпозиума с

- международным участием «Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии»; 2010 апрель 21-22; Санкт-Петербург. Санкт-Петербург: «Человек и его здоровье»; 2010, с. 24.
58. Прокопюк ОС, Прокопюк ВЮ, Карпенко ВГ. Плацентарная терапия гериатрических изменений репродуктивной функции В: Сборник тезисов и программа V Всероссийский симпозиум с международным участием „Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии”; 2012 май 17-18; Уфа. Уфа: «Башкортостан», 2012, с. 185-6.
59. Прокопюк ОС, Прокопюк ВЮ. Использование криоконсервированных препаратов плаценты для коррекции возрастных изменений. В: Матеріали конференції „Актуальні питання геронтології та геріатрії”, присвячених пам’яті В.В. Фролькіса; 2013 січень 25; Київ. Київ: "Інститут геронтології ім.Д.Ф.Чеботарьова НАМН України", с. 48.
60. Прокопюк ОС, Ронко АА, Прокопюк ВЮ, Чижевський ВВ. Низкотемпературный банк плацентарных биообъектов: научные перспективы развития в сфере медицинских биотехнологий. В: Материалы III международной научно-практической конференции „Академическая наука – проблемы и достижения”; 2014 февраль 20-2; Москва, с. 43-6.
61. Прокопюк ОС, Чижевський ВВ, Прокопюк ВЮ. Вплив імплантації кріоконсервованої хоріальної тканини на морфофункціональний стан міокарда старих щурів. Медицина сьогодні і завтра. 2011; 50-51(1-2): 242-245.
62. Прокопюк ОС, Шевченко НО, Прокопюк ВЮ, Чуб ОВ, Терехова ОО. Вплив кріоконсервованих біоб’єктів плацентарного походження на культуру клітин. Вісник проблем біології і медицини. 2015; 1(122,3): 160-4.
63. Пучковская НА, редактор. Тканевая терапия. Киев: Здоров’я; 1975. 208 с.
64. Рассоха ИВ, Гольцев АН, Гурина ТМ. Влияние разных режимов криоконсервирования на способность суспензии плаценты проявлять

- иммунокорригирующую активность при лечении адьювантного артрита у мышей. Проблемы криобиологии. 2004; (1): 21-29.
- 65.Ромашенко ОВ, Возіанова СВ, Руденко АВ, Яковенко ЛФ Лікування запальних захворювань органів малого таза, спричинених мікст-інфекцією. Здоровье женщины. 2016; 112 (6): 134-140.
- 66.Роєнко ОО, Прокопюк ВЮ, Фалько ОВ, Шевченко НО, Прокопюк ОС Використання кріоконсервованих оболонок плода в терапії трофічних виразок в експерименті. Клінічна хірургія. 2016; 5: 69-72.
- 67.Румянцев ГЕ. Тканевая терапия. Ростов-на-Дону: Ростиздат; 1951. 182 с.
- 68.Світовий банк в Україні.
<http://www.worldbank.org/uk/country/ukraine/overview>. Accessed 28 Feb 2018.
- 69.Стефанов ОВ, редактор. Доклінічні дослідження лікарських засобів: Метод. рекомендації. Київ: Авіцена; 2001. 528 с.
- 70.Ткачук ВА, редактор. Стволовые клетки и регенеративная медицина: Сб статей. Москва: МАКС Пресс, 2011. Прокопюк ОС, Грищенко ВИ, Бабийчук ЛА, Прокопюк ВЮ, Зубов ПМ. Глава 16. Кріоконсервирование плацентарных биообъектов, содержащих стволовые клетки; с. 289-303.
- 71.Трифонов ВЮ, Прокопюк ВЮ Современные представления об акушерском антифосфолипидном синдроме. Експериментальна і клінічна медицина. 2010; 2: 50-5.
- 72.Трифонов ВЮ, Прокопюк ВЮ, Прокопюк ОС, Липина ОВ, Волина ВВ, Зуб ЛИ, Фалько ОВ, Прокопюк АВ. Экспериментальное обоснование возможности прегравидарной профилактики антифосфолипидного синдрома. Таврический медико-биологический вестник. 2010; 13 (4,52): 188-192.
- 73.Феськов ВО Сучасні підходи до лікування безпліддя у жінок, хворих на ендометріоз яєчників, з використанням екстракорпорального запліднення. ScienceRise: Medical Science. 2017; 7(15): 39-43.
- 74.Феськов ОМ. Діагностика та лікування ендокринної неплідності у жінок в

- залежності від стану ендометрія. Київ: Національний медичний університет. 2002. 33 с.
75. Філатов ВП. Тканинна терапія. – Київ: Вид.-во АН УССР, 1949. – 37 с.
76. Чижевский ВВ, Прокопюк ОС, Грошевой МИ, Липина ОВ, Прокопюк ВЮ. Низкотемпературный банк биологических объектов: научно-методические основы и перспективы развития. В: Гольцев АН, редактор. Актуальные проблемы криобиологии и криомедицины. Харьков: издательский дом „Райдер”, 2012, с. 469-486.
77. Чуб ОВ, Прокопюк ВЮ, Мусатова ІБ, Прокопюк ОС. Кріоконсервовані експланти плаценти підвищують тривалість життя самців і знижують імовірність смерті самиць в репродуктивний період. В: Тези доповідей XIV Міжнародної наукової конференції студентів, аспірантів, докторантів, молодих вчених та фахівців "Актуальні питання сучасної медицини". 2017 березень 30-31, Харків. Харків: ХНУ, с. 88-9.
78. Чуб ОВ, Прокопюк ВЮ, Прокопюк ОС, Мусатова ІБ, Шевченко МВ Кріоконсервовані плацентарні біопрепарати в профілактиці і корекції дисфункцій ЦНС в пізньому онтогенезі (експериментальне дослідження). Проблемы старения и долголетия. 2016; 25: 44.
79. Чуб ОВ, Шевченко МА., Прокопюк ВЮ. Нейропротекторный эффект факторов плацентарного происхождения в модели глутамат-индуцированной токсичности клеток головного мозга новорожденных крыс. В: Тези доповідей 40 щорічної конференції молодих учених "Холод в біології та медицині". 2016 травень 23-24, Харків. Харків: ІПКіКНАНУ, с. 26.
80. Шепитько ВИ Структурно-функциональные показатели кріоконсервированной плаценты и влияние ее трансплантации на морфофункциональное состояние ряда внутренних органов [автореферат]. Полтава: Украинская медицинская стоматологическая академия. 2004. 32 с.
81. Шепитько КВ. Вплив кріоконсервованої фетоплацентарної тканини на

- перебіг стабільної стенокардії напруги [автореферат]. Полтава: українська медичинська стоматологічна академія. 2004. 24 с.
- 82.Шехтман ММ. Руководство по экстрагенитальной патологии у беременных. Москва: Триада; 2006. 816 с.
 - 83.Alecsandru D., García-Velasco J.A. Immunology and human reproduction. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2015;27(3):231-4. doi: 10.1097/GCO.0000000000000174.
 - 84.Abumaree MH, Stone PR, Chamley LW. The effects of apoptotic, deported human placental trophoblast on macrophages: possible consequences for pregnancy. *J. Reprod. Immunol.* 2006; 72(1-2): 33-45.
 - 85.al-Gubory KH, Machelon V, Nomé F.Evidence that a non-steroidal factor from ovine placenta inhibits aromatase activity of granulosa cells in vitro. *C R Acad Sci III.* 1995;318(1):91-8.
 - 86.Allen CL, Clare G, Stewart EA, Branch MJ, McIntosh OD, Dadhwal M, et al. Augmented dried versus cryopreserved amniotic membrane as an ocular surface dressing. *PLoS One.* 2013; 8(10): e78441. doi: 10.1371/journal.pone.0078441.
 - 87.Amengual O, Atsumi T. Antiphospholipid syndrome, "the best prophet of the future".*Mod Rheumatol.* 2018;1-8. doi: 10.1080/14397595.2018.1435988.
 - 88.Arango-Rodriguez ML, Ezquer F, Ezquer M, Conget P. Could cancer and infection be adverse effects of mesenchymal stromal cell therapy? *World J Stem Cells.* 2015;7(2):408-17.
 - 89.Asgari HR, Akbari M, Yazdekhesti H , Rajabi Z, Navid S , Aliakbari F et al. Comparison of human amniotic, chorionic, and umbilical cord multipotent mesenchymal stem cells regarding their capacity for differentiation toward female germ cells. *Cell Reprogram.* 2017;19(1):44-53.
 - 90.Askelund KJ, Chamley LW. Trophoblast deportation part I: Review of the evidence demonstrating trophoblast shedding and deportation during human pregnancy. *Placenta.* 2011; 32(10): 716-23.
 - 91.Azziz R. Diagnosis of polycystic ovarian syndrome: the rotterdam criteria are

- premature. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2006; 91(3): 781–5. doi:10.1210/jc.2005-2153.
92. Bae J, Park S, Kwon JW. Factors associated with menstrual cycle irregularity and menopause. *BMC Womens Health*. 2018;18(1):36. doi: 10.1186/s12905-018-0528-x
 93. Baghaban Eslaminejad M, Jahangir S. Amniotic fluid stem cells and their application in cell-based tissue regeneration. *International Journal of Fertility & Sterility*. 2012; 6 (3): 147-156.
 94. Bahk JY, Jung JH, Han H, Min SK, Lee YS. Treatment of diabetic impotence with umbilical cord blood stem cell intracavernosal transplant: preliminary report of 7 cases. *Exp Clin Transplant*. 2010 Jun;8(2):150-60.
 95. Bahri Khomami M, Boyle JA, Tay CT, Vanky E, Teede HJ, Joham AE et al. Polycystic ovary syndrome and adverse pregnancy outcomes: current state of knowledge, challenges and potential implications for practice. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2018 Feb 20. doi: 10.1111/cen.13579
 96. Ballen KK, Gluckman E, Broxmeyer HE. Umbilical cord blood transplantation: the first 25 years and beyond. *Blood*. 2013; 22 (4): 491-498.
 97. Benn P, Curnow KJ, Chapman S, Michalopoulos SN, Hornberger J, Rabinowitz M. An economic analysis of cell-free DNA non-invasive prenatal testing in the US general pregnancy population. *PLoS One*. 2015; 10(7): 0132313. doi:10.1371/journal.pone.0132313
 98. Berardo C, Di Pasqua LG, Siciliano V, Rizzo V, Richelmi P, Ferrigno A et al. Machine perfusion at 20°C prevents ischemic injury and reduces hypoxia-inducible factor-1 α expression during rat liver preservation. *Ann Transplant*. 2017;22:581-589.
 99. Bianchi M, Giannantonio C, Spartano S, Fioretti M, Landini A, Molisso A, et al. Allogeneic umbilical cord blood red cell concentrates: an innovative blood product for transfusion therapy of preterm infants. *Neonatology*. 2015; 107(2): 81-6. doi: 10.1159/000368296.
 100. Bolat E, Kocamaz E, Kulahcilar Z, Yilmaz A, Topcu A, Ozdemir M et al.

- Investigation of efficacy of mitomycin-C, sodium hyaluronate and human amniotic fluid in preventing epidural fibrosis and adhesion using a rat laminectomy model. *Asian Spine J.* 2013;7(4): 253-9.
101. Berggren EK, Presley L, Amini SB, Hauguel-de Mouzon S, Catalano PM. Are the metabolic changes of pregnancy reversible in the first year postpartum? *Diabetologia.* 2015; 58(7):1561-8. doi: 10.1007/s00125-015-3604-x
 102. Caplan AI. Adult Mesenchymal Stem Cells and Women's Health Menopause. 2015; 22(2): 131-135.
 103. Chamley LW, Holland OJ, Chen Q, Viall CA, Stone PR, and Abumaree M. Review: where is the maternofetal interface? *Placenta.* 2014;35 Suppl: S74-80.
 104. Chandanwale A, Langade D, Mohod V, Sinha S, Ramteke A, Bakhshi GD, Motwani M. Comparative evaluation of human placental extract for its healing potential in surgical wounds after orthopaedic surgery: an open, randomised, comparative study. *J Indian Med Assoc.* 2008;106(6):405-8.
 105. Chen HJ, Chen CH, Chang MY, Tsai DC, Baum EZ, Hariri R et al. Human placenta-derived adherent cells improve cardiac performance in mice with chronic heart failure. *Stem Cells Transl Med.* 2015; 4(3): 269-75.
 106. Chen J, Shehadah A, Pal A, Zacharek A, Cui X, Cui Y, et al. Neuroprotective effect of human placenta-derived cell treatment of stroke in rats. *Cell Transplant.* 2013; 22(5): 871-9.
 107. Chen JY, Mou XZ, Du XC, Xiang C. Comparative analysis of biological characteristics of adult mesenchymal stem cells with different tissue origins. *Asian Pac J Trop Med.* 2015; 8(9): 739-46.
 108. Chen SJ, Liu YL, Sytwu HK. Immunologic regulation in pregnancy: from mechanism to therapeutic strategy for immunomodulation. *Clin Dev Immunol.* 2012; 2012:258391. doi: 10.1155/2012/258391.
 109. Cho HR, Ryou JH, Lee JW, Lee MH. The effects of placental extract on fibroblast proliferation. *J Cosmet Sci.* 2008 May-Jun;59(3):195-202.
 110. Choi HY, Kim SW, Kim B, Lee HN, Kim SJ, Song M et al. Alpha-fetoprotein, identified as a novel marker for the antioxidant effect of placental

- extract, exhibits synergistic antioxidant activity in the presence of estradiol. *PLoS One*. 2014; 9(6):e99421. doi: 10.1371/journal.pone.0099421.
111. Choi YS, Park YB, Ha CW, Kim JA, Heo JC, Han WJ et al. Different characteristics of mesenchymal stem cells isolated from different layers of full term placenta. *PLoS One*. 2017; 12(2):e0172642. doi: 10.1371/journal.pone.0172642. eCollection 2017.
 112. Clark P Changes of hemostasis variables during pregnancy. *Semin Vasc Med*. 2003;3(1):13-24.
 113. Cole L.A. Biological functions of hCG and hCG-related molecules. *Reprod Biol Endocrinol*. 2010;8:102. doi: 10.1186/1477-7827-8-102.
 114. Colleoni F, Morash AJ, Ashmore T, Monk M, Burton GJ, Murray AJ. Cryopreservation of placental biopsies for mitochondrial respiratory. *Placenta*. 2012 ;33(2):122-3.
 115. Cooke M, Tan EK, Mandrycky C, He H, O'Connell J, Tseng SC. Comparison of cryopreserved amniotic membrane and umbilical cord tissue with dehydrated amniotic membrane/chorion tissue. *J Wound Care*. 2014; 23(10):465-74. doi: 10.12968/jowc.2014.23.10.465.
 116. Corwin WL, Baust JM, Baust JG, Van Buskirk RG. Characterization and modulation of human mesenchymal stem cell stress pathway response following hypothermic storage. *Cryobiology*. 2014; 68(2): 215-26. doi: 10.1016/j.cryobiol.2014.01.014.
 117. Cotor G, Pop A, Ghita M. The effect of ovine placenta extract on mammogenesis, lactogenesis, and galactopoiesis in sheep. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*. 2011; 35(3): 137-142. doi:10.3906/vet-0610-34.
 118. Croft Long E. The placenta in lore and legend. *Bull Med Libr Assoc*. 1963 Apr; 51(2): 233–241.
 119. Dahlberg A, Milano F. Cord blood transplantation: rewind to fast forward. *Bone Marrow Transplantation*. 2017; 52(6): 799-802.
 120. Das BB, Ronda J, Trent M. Pelvic inflammatory disease: improving

- awareness, prevention, and treatment. *Infect Drug Resist.* 2016; 9: 191-7. doi: 10.2147/IDR.S91260.
121. Dhanda S, Ramani S, Thakur M. Gestational trophoblastic disease: a multimodality imaging approach with impact on diagnosis and management. *Radiol. Res. Pract.* 2014; 2014: 842751. doi:10.1155/2014/842751
 122. Dharmarajan AM, Goodman SB, Atiya N, Parkinson SP, Lareu RR, Tilly KI, et al. Role of apoptosis in functional luteolysis in the pregnant rabbit corpus luteum: evidence of a role for placental-derived factors in promoting luteal cell survival. *Apoptosis.* 2004; 9(6): 807-14. Doi:10.1023/B:APPT.0000045783.71178.c4
 123. Di Germanio C, Bernier M, de Cabo R, Barboni B. Amniotic epithelial cells: a new tool to combat aging and age-related diseases? *Front Cell Dev Biol* 2016; 4: 135. doi: 10.3389/fcell.2016.00135
 124. Dragovic RA, Southcombe JH, Tannetta DS, Redman CW, Sargent IL. Multicolor flow cytometry and nanoparticle tracking analysis of extracellular vesicles in the plasma of normal pregnant and pre-eclamptic women. *Biol Reprod.* 2013 Dec 26;89(6):151. doi: 10.1095/biolreprod.113.113266.
 125. Erdem E, Yagmur M, Harbiyeli I, Taylan-Sekeroglu H, Ersoz R. Umbilical cord blood serum therapy for the management of persistent corneal epithelial defects. *International Journal of Ophthalmology.* 2014; 7(5): 807-810.
 126. Falko OV, Shevchenko NA, Prokopyuk VY, Roenko AA, Prokopyuk OS. Comparative analysis of limbs' trophic ulcers modeling methods in mice. *Novosti Khirurgii.* 2017; 25(6): 561-6.
 127. Fal'ko OV, Zemlianskikh NG, Lipina OV, Prokopiuk OS. Modification of placenta blood serum proteins under low temperature effect. *Biomed Khim.* 2013; 59(2): 219-34.
 128. Fenton AJ. Premature ovarian insufficiency: Pathogenesis and management. *J Midlife Health.* 2015; 6(4):147-53. doi: 10.4103/0976-7800.172292.
 129. Fierabracci A, Lazzari L, Muraca M, Parolini O. How far are we from the clinical use of placental-derived mesenchymal stem cells? *Expert Opin Biol*

- Ther. 2015; 15(5):613-7. doi: 10.1517/14712598.2015.1000856.
130. Foty R. A simple hanging drop cell culture protocol for generation of 3D spheroids. *J Vis Exp*. 2011 May 6;(51). doi: 10.3791/2720.
 131. Frise CJ Williamson C. Gastrointestinal and liver disease in pregnancy. *Clin Med (Lond)*. 2013; 13(3):269-74. doi: 10.7861/clinmedicine.13-3-269.
 132. Fujimoto KL, Miki T, Liu LJ, Hashizume R, Strom SC, Wagner WR, et al. Naive rat amnion-derived cell transplantation improved left ventricular function and reduced myocardial scar of postinfarcted heart. *Cell Transplant*. 2009;18(4):477-86. doi: 10.3727/096368909788809785.
 133. Gao J, Liu L, Liu W, Song J, Li K, Hong Y et al. Study of process optimization on freeze drying of human amniotic membrane. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi*. 2012; 29(4): 705-9.
 134. Gandhi M, Martin SR. Cardiac disease in pregnancy. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 2015; 42(2):315-33. doi: 10.1016/j.ogc.2015.01.012.
 135. Garrido-Gimenez C, Alijotas-Reig J. Recurrent miscarriage: causes, evaluation and management. *Postgrad Med J*. 2015; 91(1073):151-62. doi: 10.1136/postgradmedj-2014-132672.
 136. Garrod A, Batra G, Ptacek I, Heazell AE. Duration and method of tissue storage alters placental morphology - implications for clinical and research practice. *Placenta*. 2013; 34(11): 1116-9. doi: 10.1016/j.placenta.2013.07.067.
 137. Gerber B, Ortmann O. Prevention of early menopause study (POEMS): Is it possible to preserve ovarian function by gonadotropin releasing hormone analogs (GnRHa)? *Arch Gynecol Obstet*. 2014; 290:1051-3.
 138. Gholizadeh-Ghalehaziz S, Farahzadi R, Fathi E, Pashaiasl M. A mini overview of isolation, characterization and application of amniotic fluid stem cells. *International Journal of Stem Cells*. 2015; 8,(2): 115-120.
 139. Giannaccare G, Fresina M, Vagge A, Versura P. Synergistic effect of regenerating agent plus cord blood serum eye drops for the treatment of resistant neurotrophic keratitis: a case report and a hypothesis for pathophysiologic mechanism. *International Medical Case Reports Journal*.

- 2015; 8: 277-281. doi: 10.2147/IMCRJ.S89968
140. Gibner SM, Sudarikov IV, Miroshnikov Y. O. Cryopreserved placenta introduction as a perspective way to recover male fertility. *Problems of Cryobiology*. 2011; 17(3): 298-304.
 141. Gilligan J, Tong M, Longato L, de la Monte SM, Gundogan F. Precision-cut slice culture method for rat placenta. *Placenta*. 2012 Jan;33(1):67-72. doi: 10.1016/j.placenta.2011.10.013.
 142. Giwa S, Lewis JK, Alvarez L, Langer R, Roth AE, Church GM et al. The promise of organ and tissue preservation to transform medicine. *Nat Biotechnol*. 2017; 35(6): 530-542. doi: 10.1038/nbt.3889.
 143. Gluckman E. History of cord blood transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2009 Nov;44(10):621-6. doi: 10.1038/bmt.2009.280
 144. Goltsev AN, Grischenko VI, Rassokha IV Ostankov MV. Possibility of using the embryo fetoplacental complex products to correct apoptotic processes under autoimmune diseases. *Problems of cryobiology*. 2003; 4: 41-8.
 145. Goltsev AN, Grischenko VI, Sirous MA, Lutsenko ED, Goltsev KA. Cryopreservation: an optimizing factor for therapeutic potential of fetoplacental complex products. *Biopreserv Biobank*. 2009; 7(1): 29-38. doi: 10.1089/bio.2009.0701.ang.
 146. Goltsev AN, Lutsenko ED, Ostankov MV. Effect of different cryopreservation regimens on manifestation of immune modulating activity of placenta at development of adjuvant arthritis. *Problems of cryobiology*. 2008; 18(4): 456-8.
 147. Graham J. Burton, Abigail L. Fowden The placenta: a multifaceted, transient organ *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2015 Mar 5; 370(1663): 20140066. doi: 10.1098/rstb.2014.0066
 148. Gulevsky A. K., Akhatova Yu. S., Moiseeva N. N., Gorina O. L., Chizhevsky V. V., L. et al. Assessment of phagocytic activity of leukoconcentrate neutrophils cryopreserved with dimethyl acetamide after post-thaw rehabilitation in medium containing cord blood low-molecular fraction

- (Below 5 kDa). *Probl Cryobiol Cryomed*. 2012; 22 (1): 71-78.
149. Gupta AK, Holzgreve W, Huppertz B, Malek A, Schneider H, Hahn S. Detection of fetal DNA and RNA in placenta-derived syncytiotrophoblast microparticles generated in vitro. *Clin Chem*. 2004 Nov;50(11):2187-90.
 150. Haeger JD, Hambruch N, Dilly M, Froehlich R, Pfarrer C. Formation of bovine placental trophoblast spheroids. *Cells Tissues Organs*. 2011;193(4):274-84. doi: 10.1159/000320544.
 151. Han NR, Park CL, Kim NR, Kim HY, Yoou MS, Nam SY, et al. Protective effect of porcine placenta in a menopausal ovariectomized mouse. *Reproduction*. 2015;150(3):173-81. doi: 10.1530/REP-15-0157.
 152. Hanson B, Johnstone E, Dorais J, Silver B, Peterson CM, Hotaling J. et al. Female infertility, infertility-associated diagnoses, and comorbidities: a review. *J Assist Reprod Genet*. 2017; 34(2):167-177. doi: 10.1007/s10815-016-0836-8.
 153. Heckmann N, Auran R, Mirzayan R. Application of amniotic tissue in orthopedic surgery. *American Journal of Orthopedics*. 2016; 45(7): 421-25.
 154. Holesh JE, Lord M. *Physiology, Ovulation*. Stat Pearls. Treasure Island (FL): Stat Pearls Publishing. 2017. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441996/>
 155. Hong JW, Lee WJ, Hahn SB, Kim BJ, Lew DH. The effect of human placenta extract in a wound healing model. *Annals of Plastic Surgery*. 2010; 65: 96-100.
 156. Huppertz B. The anatomy of the normal placenta. *Journal of Clinical Pathology*. 2008; 61(12): 1296-1302.
 157. Huppertz B., Kivity V., Sammar M. Grimpel Y, Leepaz N, Orendi K et al. Cryogenic and low temperature preservation of human placental villous explants. A new way to explore drugs in pregnancy disorders. *Placenta*. 2011; 32 Suppl:S65-76. doi: 10.1016/j.placenta.2010.11.020
 158. Ince-Askan H, Hazes JM, Dolhain RJ. Is Disease Activity in Rheumatoid Arthritis during Pregnancy and after Delivery Predictive for Disease Activity in a Subsequent Pregnancy? *J Rheumatol*. 2016; 43(1): 22-5. doi:

- 10.3899/jrheum.150565.
159. Irino T, Okuda T, Grollman A. Changes induced in the glomeruli of the kidney of rats by placental extracts as observed with the electron microscope. *Am J Pathol.* 1967 Mar;50(3):421-33.
 160. Isachenko VV, Ostashko FI, Grishchenko VI. Isachenko EF. Survival of trophoblastic fragments and vesicles after vitrification, ultrarapid freezing, and storage at 4 degrees C. *Cryobiology.* 1993; 30(4): 432-7.
 161. Ito K, Yamada R, Matsumoto N, Imamura T. Evaluation of fibroblast growth factor activity exerted by placental extract used as a cosmetic ingredient. *J Cosmet Dermatol.* 2017 Oct 2. doi: 10.1111/jocd.12434.
 162. Jiang R, Han Z, Zhuo G, Qu X, Li X, Wang X, et al. Transplantation of placenta-derived mesenchymal stem cells in type 2 diabetes: a pilot study. *Front Med.* 2011; 5(1):94-100. doi: 10.1007/s11684-011-0116-z.
 163. Jirsova K, Jones GL. Amniotic membrane in ophthalmology: properties, preparation, storage and indications for grafting – a review. *Cell and Tissue Banking.* 2017; 18(2):193-204.
 164. Jung J, Choi JH, Lee Y, Park JW, Oh IH, Hwang SG, et al. Human placenta-derived mesenchymal stem cells promote hepatic regeneration in CCl4-injured rat liver model via increased autophagic mechanism *Stem Cells.* 2013 Aug;31(8):1584-96. doi: 10.1002/stem.1396.
 165. Kadam S, Muthyala S, Nair P, Bhonde R. Human placenta-derived mesenchymal stem cells and islet-like cell clusters generated from these cells as a novel source for stem cell therapy in diabetes. *The Review of Diabetic Studies.* 2010; 7 (2): 168-182.
 166. Kapandji A.I. Connective tissue: big unifying element of the organism]. *Ann Chir Plast Esthet.* 2012 ;57(5):507-14. doi: 10.1016/j.anplas.2012.07.007.
 167. Kanellopoulos-Langevin C, Caucheteux SM, Verbeke P, Ojcius DM. Tolerance of the fetus by the maternal immune system: role of inflammatory mediators at the feto-maternal interface. *Reproductive Biology and Endocrinology. Reprod Biol Endocrinol.* 2003; 1: 121. doi:10.1186/1477-7827-

1-121

168. Kang M, Choi S, Cho Lee AR. Effect of freeze dried bovine amniotic membrane extract on full thickness wound healing. *Arch. Pharm. Res. Arch Pharm Res.* 2013; 36(4): 472-8. doi: 10.1007/s12272-013-0079-5.
169. Kanno H, Kawakami Z, Mizoguchi K, Ikarashi Y, Kase Y. Yokukansan, a kampo medicine, protects PC12 cells from glutamate-induced death by augmenting gene expression of cystine/glutamate antiporter system Xc-. *PLoS One.* 2014; 9(12): e116275. doi: 10.1371/journal.pone.0116275.
170. Karacal N, Kosucu P, Cobanglu U, Kutlu N. Effect of human amniotic fluid on bone healing. *Journal of Surgical Research. J Surg Res.* 2005; 129(2): 283-7.
171. Karimpour M. A, Heidari M., Parivar K., Azami N.S. The effects of fibroblast co-culture and activin A on in vitro growth of mouse preantral follicles. *Iran Biomed J.* 2014;18(1):49-54.
172. Kawakatsu M, Urata Y, Goto S, Ono Y, Li TS. Placental extract protects bone marrow-derived stem/progenitor cells against radiation injury through anti-inflammatory activity. *Journal of Radiation Research.* 2013; 54(2): 268-276.
173. Kim KS, Kim HS, Park JM, Kim HW, Park MK, Lee HS, et al. Long-term immunomodulatory effect of amniotic stem cells in an Alzheimer's disease model. *Neurobiology of Aging. Neurobiol Aging.* 2013; 34(10): 2408-20. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2013.03.029.
174. Kitanohara M, Yamamoto T, Masunaga S, Ohishi M, Komatsu Y, Nagase M. Effect of porcine placental extract on the mild menopausal symptoms of climacteric women. *Climacteric.* 2017; 20(2): 144-150. doi: 10.1080/13697137.2017.1279140.
175. Kitchen H, Aldhouse N, Trigg A, Palencia R, Mitchell S. A review of patient-reported outcome measures to assess female infertility-related quality of life. *Health Qual Life Outcomes.* 2017; 15(1): 86. doi: 10.1186/s12955-017-0666-0.
176. Klein J, Charach R, Sheiner E Treating diabetes during pregnancy. *Expert*

- Opin Pharmacother. 2015; 16(3):357-68. doi: 10.1517/14656566.2015.988140.
177. Kliman HJ, Nestler JE, Sermasi E, Sanger JM, Strauss JF 3rd. Purification, characterization, and in vitro differentiation of cytotrophoblasts from human term placentae. *Endocrinology*. 1986 Apr;118(4):1567-82.
 178. Klinich KD, Miller CS, Hu J, Nazmi GM, Pearlman MD, Schneider LW, Rupp JD. Effect of frozen storage on dynamic tensile properties of human placenta. *J Biomech Eng*. 2012; 134(3):034501. doi: 10.1115/1.4006025.
 179. Kocaoemer A, Kern S, Klüter H, Bieback K. Human AB Serum and thrombin-activated platelet-rich plasma are suitable alternatives to fetal calf serum for the expansion of mesenchymal stem cells from adipose tissue. *Stem Cells*. 2007 May;25(5):1270-8.
 180. Kondakov II, Yurchenko TN, Sharlay TM. Effect of cryopreserved placenta tissue implantation on myocardium morphology under experimental atherosclerosis. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine*. 2011; 21(4): 416-420.
 181. Kong P, Xie X, Li F, Liu Y, Lu Y. Placenta mesenchymal stem cell accelerates wound healing by enhancing angiogenesis in diabetic Goto-Kakizaki (GK) rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013 23; 438(2): 410-9. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.07.088.
 182. Koratala A, Bhattacharya D, Kazory A. Chronic Kidney Disease in Pregnancy. *South Med J*. 2017; 110(9):578-585. doi: 10.14423/SMJ.0000000000000693.
 183. Kovalyov GA, Vysekantsev IP, Ischenko IO, Abrafikova LG, Olefirenko AA, Sandomirskiy BP. Effect of cryopreserved cord blood serum and placental extract on cold-wound healing. *Probl Cryobiol Cryomed* 2015; 25(1):57-66. doi: <https://doi.org/10.15407%2Fcryo25.01.057>
 184. Kozub MM, Prokopyuk VYu, Skibina KP, Prokopyuk OV, Kozub NI. Comparison of various of tissue and cell therapy approaches when restoring ovarian, hepatic and kidney's function after chemotherapy-induced ovarian failure. *Exp Oncol*. 2017; 39(3): 181-5.

185. Kranz A, Wagner DC, Kamprad M, Scholz M, Schmidt UR, Nitzsche F, al. Transplantation of placenta-derived mesenchymal stromal cells upon experimental stroke in rats *Brain Res.* 2010 Feb 22;1315:128-36. doi: 10.1016/j.brainres.2009.12.001.
186. Kwon JW, Hong SE, Kang SR, Park BY. Effect of human placental extract treatment on random-pattern skin flap survival in rats. *J Invest Surg.* 2018 Feb 12:1-10. doi: 10.1080/08941939.2017.1417518.
187. Lai D, Wang F, Yao X, Zhang Q, Wu X, Xiang C. Human endometrial mesenchymal stem cells restore ovarian function through improving the renewal of germline stem cells in a mouse model of premature ovarian failure. *J Transl Med.* 2015 May 12;13:155. doi: 10.1186/s12967-015-0516-y.
188. Law LW, Sahota DS, Chan LW, Chen M, Lau TK, Leung TY. Effect of long-term storage on placental growth factor and fms-like tyrosine kinase 1 measurements in samples from pregnant women. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2010 Dec;23(12):1475-80. doi: 10.3109/14767051003678242
189. Lee HJ, Jung J, Cho KJ, Lee CK, Hwang SG, Kim GJ. Comparison of in vitro hepatogenic differentiation potential between various placenta-derived stem cells and other adult stem cells as an alternative source of functional hepatocytes. *Differentiation.* 2012; 84(3): 223-31. doi: 10.1016/j.diff.2012.05.007.
190. Lee JM Comparison of immunomodulatory effects of placenta mesenchymal stem cells with bone marrow and adipose mesenchymal stem cells. *Immunopharmacol.* 2012; 13 (2): 219-224. doi: 10.1016/j.intimp.2012.03.024.
191. Lee KH, Kim TH, Lee WC, Kim SH, Lee SY, Lee SM. Anti-inflammatory and analgesic effects of human placenta extract. *Nat Prod Res.* 2011; 25(11):1090-100. doi: 10.1080/14786419.2010.489050.
192. Lee YK, Chung HH, Kang SB. Efficacy and safety of human placenta extract in alleviating climacteric symptoms: prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Obstet Gynaecol Res.* 2009; 35(6):1096-101. doi: 10.1111/j.1447-0756.2009.01066.x.

193. Li J, Zhang H, Liu G. Research on anti-aging effect of mouse placenta cells transplantation Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi. 2010; 27(6):1312-6.
194. Li Z, Zhao W, Liu W, Zhou Y, Jia J, Yang L. Transplantation of placenta-derived mesenchymal stem cell-induced neural stem cells to treat spinal cord injury. Neural Regen Res. 2014; 9(24):2197-204. doi: 10.4103/1673-5374.147953.
195. Lim R, Concise Review: Fetal Membranes in Regenerative Medicine: New Tricks from an Old Dog? Stem Cells Transl Med. 2017;6(9):1767-1776. doi: 10.1002/sctm.16-0447.
196. Liu W, Morschauser A, Zhang X, Lu X, Gleason J, He S et al., Human placenta-derived adherent cells induce tolerogenic immune responses. Clin Transl Immunology. 2014; 3(5): e14. doi:10.1038/cti.2014.5
197. Luan X, Diekwisch TG. CP27 affects viability, proliferation, attachment and gene expression in embryonic fibroblasts. Cell Prolif. 2002 Aug;35(4):207-19.
198. Ma K, Yao H, Zhang M, Guo JJ, Cheng L, Li JH, Liu ZJ. Effect of human placental extract on proliferation of human umbilical cord blood CD34(+) cells in vitro. Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi. 2012 Oct;20(5):1183-6.
199. Maged M C Physiologic and pharmacokinetic changes in pregnancy Front Pharmacol. 2014; 5: 65. doi:10.3389/fphar.2014.00065
200. Malek A, Bersinger NA. Human placental stem cells: biomedical potential and clinical relevance. J Stem Cells. 2011;6(2):75-92.
201. Malhotra C, Jain AK. Human amniotic membrane transplantation: different modalities of its use in ophthalmology,” World Journal of Transplantation, vol. 4, no. 2, pp. 111–121, 2014.
202. Margulies AL, Selleret L, Zilberman S, Nagarra IT, Chopier J, Gligorov J et al. Pregnancy after cancer: for whom and when?. Bull Cancer. 2015; 102(5):463-9. doi: 10.1016/j.bulcan.2015.03.012.

203. Martínez-Varea A, Pellicer B, Perales-Marín A, Pellicer A. Relationship between maternal immunological response during pregnancy and onset of preeclampsia. *J. Immunol. Res.* 2014; 2014: 210241. doi:10.1155/2014/210241.
204. Mattar P, Bieback K. Comparing the immunomodulatory properties of bone marrow, adipose tissue, and birth-associated tissue mesenchymal stromal cells. *Front Immunol.* 2015 Nov 3;6:560. doi: 10.3389/fimmu.2015.00560.
205. Meo SA, Hassain A Metabolic Physiology in Pregnancy. *J Pak Med Assoc.* 2016; 66(9 Suppl 1): S8-S10.
206. Melcer Y, Maymon R, Pekar-Zlotin M, Vaknin Z, Pansky M, Smorgick N. Does she have adnexal torsion? Prediction of adnexal torsion in reproductive age women. *Arch Gynecol Obstet.* 2018;297(3):685-690. doi: 10.1007/s00404-017-4628-x.
207. Melmed GY, Pandak WM, Casey K, Abraham B, Valentine J, Schwartz D et al. Human placenta-derived cells (PDA-001) for the treatment of moderate-to-severe crohn's disease: a phase 1b/2a study. *Inflamm. Bowel Dis.* 2015; 21(8): 1809-16.
208. Mermet I, Pottier N, Sainthillier JM, Malugani C, Cairey-Remonnay S, Maddens S, et al., "Use of amniotic membrane transplantation in the treatment of venous leg ulcers. *Wound Repair Regen.* 2007;15(4):459-64.
209. Miki T, Wong W, Zhou E, Gonzalez A, Garcia I, Grubbs BH. Biological impact of xeno-free chemically defined cryopreservation medium on amnioticepithelial cells. *Stem Cell Res Ther.* 2016 12;7:8. doi: 10.1186/s13287-015-0258-z
210. Mincheva-Nilsson L, Baranov V. Placenta-derived exosomes and syncytiotrophoblast microparticles and their role in human reproduction: immune modulation for pregnancy success. *Am. J. Reprod. Immunol.* 2014; 72(5): 440-57.
211. Mitsui Y, Bagchi M, Marone PA, Moriyama H, Bagchi D. Safety and toxicological evaluation of a novel, fermented, peptide-enriched, hydrolyzed swine placenta extract powder. *Toxicol Mech Methods.* 2015; 25(1):13-20. doi:

- 10.3109/15376516.2014.971139.
212. Mohamed SA, Shalaby SM, Abdelaziz M, Brakta S, Hill WD, Ismail N et al. Human mesenchymal stem cells partially reverse infertility in chemotherapy-induced ovarian failure. *Reprod Sci.* 2018 Jan;25(1):51-63. doi: 10.1177/1933719117699705.
 213. Moon JH, Lee JR, Jee BC, Suh CS, Kim SH, Lim HJ, Kim HK. Successful vitrification of human amnion-derived mesenchymal stem cells *Hum Reprod.* 2008 Aug;23(8):1760-70. doi: 10.1093/humrep/den202.
 214. Moon PD, Kim KY, Rew KH, Kim HM, Jeong HJ. Anti-fatigue effects of porcine placenta and its amino acids in a behavioral test on mice. *Can J Physiol Pharmacol.* 2014 Nov;92(11):937-44. doi: 10.1139/cjpp-2014-0068.
 215. Newby D, Dalgliesh GL, Aitken DA, Lyall F. Effect of cryopreservation on human cytotrophoblast cells in culture: hCG and PALP production *Placenta.* 2007; 28(4):350-2.
 216. Oliveira MS, Barreto-Filho JB Placental-derived stem cells: Culture, differentiation and challenges. *World J Stem Cells.* 2015; 7(4): 769-75. doi:10.4252/wjsc.v7.i4.769.
 217. Ozgenel GY, Filiz G. Effects of human amniotic fluid on peripheral nerve scarring and regeneration in rats. *Journal of Neurosurgery. J Neurosurg.* 2003 Feb;98(2):371-7.
 218. Pandey V., Singh A., Singh A. Krishna A, Pandey U, Tripathi Y.B. Role of oxidative stress and low-grade inflammation in letrozole-induced polycystic ovary syndrome in the rat. *Reprod Biol.* 2016; 16 (1): 70-77.
 219. Pantham P, Askelund KJ, Chamley LW. Trophoblast deportation part II: a review of the maternal consequences of trophoblast deportation. *Placenta.* 2011; 32(10):724-31. doi: 10.1016/j.placenta.2011.06.019.
 220. Paolin A, Cogliati E, Trojan D, Griffoni C, Grassetto A, Elbadawy HM, Ponzin D. Amniotic membranes in ophthalmology: long term data on transplantation outcomes. *Cell Tissue Bank.* 2016; 17(1):51-8. doi: 10.1007/s10561-015-9520-y.

221. Park SB, Kim KN, Sung E, Lee SY, Shin HC. Human placental extract as a subcutaneous injection is effective in chronic fatigue syndrome: a multi-center, double-blind, randomized, placebo-controlled study *Biol Pharm Bull.* 2016; 39(5):674-9. doi: 10.1248/bpb.b15-00623.
222. Park SY, Phark S, Lee M, Lim JY, Sul D. Anti-oxidative and anti-inflammatory activities of placental extracts in benzo[a]pyrene-exposed rats *Placenta.* 2010;31(10):873-9. doi: 10.1016/j.placenta.2010.07.010.
223. Parolini O, Knöfler M, Abumaree M. New frontiers in placenta stem cell research, translation, and clinical application. *Placenta.* 2017; 59:73. doi: 10.1016/j.placenta.2017.07.015.
224. Parolini O., Alviano F., Bagnara G.P., Bilic G., Bühring H.J., Evangelista M. et al. Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international Workshop on Placenta Derived Stem Cells. *Stem Cells.* 2008; 26(2): 300-11. doi:10.1634/stemcells.2007-0594
225. Pawitan JA Prospect of stem cell conditioned medium in regenerative medicine. *Biomed Res Int.* 2014; 2014:965849. doi: 10.1155/2014/965849.
226. Petrenko Y, Syková E, Kubinová Š. The therapeutic potential of three dimensional multipotent mesenchymal stromal cellspheroids. *Stem Cell Res Ther.* 2017 26;8(1):94. doi: 10.1186/s13287-017- 0558-6.
227. Piltonen T.T., Chen J.C., Khatun M., Kangasniemi M., Liakka A., Spitzer T., Tran N., Huddleston H., Irwin J.C., Giudice L.C. Endometrial stromal fibroblasts from women with polycystic ovary syndrome have impaired progesterone-mediated decidualization, aberrant cytokine profiles and promote enhanced immune cell migration in vitro. *Hum Reprod.* 2015;30(5):1203-15. doi: 10.1093/humrep/dev055.
228. Pipino C, Shangaris P, Resca E, Zia S, Deprest J, Sebire NJ et al. Placenta as a reservoir of stem cells: an underutilized resource? *Br Med Bull.* 2013;105:43-68. doi: 10.1093/bmb/lds033.
229. Podfigurna-Stopa A, Czyzyk A, Grymowicz M, Smolarczyk R, Katulski K, Czajkowski K, Meczekalski B. Premature ovarian insufficiency: the context of

- long-term effects. *J Endocrinol Invest.* 2016; 39(9):983-90. doi: 10.1007/s40618-016-0467-z.
230. Pogozhykh D, Pogozhykh O, Prokopiuk V, Mueller T. Mimicked long term cryopreservation of transgenic multipotent stromal cells affects viability but not transgene expression. In: Abstracts and program "8th International Meeting Stem Cell Network North Rhine-Westphalia". 2015 April 21-22; Bonn, Germany, p. 95.
 231. Pogozhykh D, Pogozhykh O, Prokopyuk V, Goltsev A, Figueiredo C, Müller T. Mimicking long-term biobanking of placental multipotent stromal cells by temperature fluctuations during cryopreservation. In: Society for Low Temperature Biology Annual Meeting 2016. 2016 september 7, Dresden, p.7.
 232. Pogozhykh D, Pogozhykh O, Prokopyuk V, Kuleshova L, Goltsev A, Blasczyk R, Mueller T. Influence of temperature fluctuations during cryopreservation on vital parameters, differentiation potential, and transgene expression of placental multipotent stromal cells. *Stem Cell Research & Therapy.* 2017; 8:66. doi: 10.1186/s13287-017-0512-7
 233. Pogozhykh D, Prokopyuk V, Pogozhykh O, Mueller T, Prokopyuk O. Influence of Factors of Cryopreservation and Hypothermic Storage on Survival and Functional Parameters of Multipotent Stromal Cells of Placental Origin. *PLoS One.* 2015; 10 (10): e0139834. doi: 10.1371/journal.pone.0139834.
 234. Pogozhykh O, Pogozhykh D, Prokopiuk V, Muller T. Parametrs for accurate estimation of survival rates of multipotent stromal cells after long-term criopreservation simulation. In: Abstracts and program "Freezing biological time" Society for Low Temperature Biology 50th Anniversary Celebration, Annual Scientific Conference & AGM; 2014 October 8 - 10; London, p.74.
 235. Pogozhykh O, Pogozhykh D, Prokopyuk V, Figueiredo C. Characterisation of cells derived from cryopreserved placental tissues. In: Abstract book. SLTB Science meeting Cambridge. 2017 September 19 – 20, Cambridge (Uk).
 236. Pogozhykh O, Prokopyuk V, Figueiredo C, Pogozhykh D. Placenta and placental derivatives in regenerative therapies: experimental studies, history,

- and prospects. *Stem Cells International*. 2018; 2018: 14.
doi:10.1155/2018/4837930
237. Popovych YO. Cryopreserved cord blood preparations in combined surgical treatment of purulent complications of type II diabetes mellitus *Problems of Cryobiology and Cryomedicine. Probl Cryobiol Cryomed*. 2014; 24(4):332-345. doi:10.15407%2Fcryo24.04.332
238. Pravdyuk AI, Petrenko YA, Fuller BJ, Petrenko AY. Cryopreservation of alginate encapsulated mesenchymal stromal cells. *Cryobiology*. 2013;66(3):215-22. doi: 10.1016/j.cryobiol.2013.02.002.
239. Prokopiuk VYu, Musatova IB, Shevchenko MV, Chub OV, Shevchenko NO, Prokopiuk OS Placental MSCs, explants, extract protect neural cells against glutamate-induced toxicity. In: Gálik J, Slovinská L, Lukáčová N, editors. *Program and Abstract Book 8 th International Symposium on Experimental and Clinical Neurobiology*. 2017 June 18 – 21 Kosice, Slovakia. Kosice: Mgr. Viliam Oravec - GAIA, p. 72.
240. Prokopiuk VYu. Influence of cryopreserved and native placental derivativetes on isolated tissues and cells of the female reproductive system in vitro. *Probl Cryobiol Cryomed*. 2018; 28(1): in print
241. Prokopuk VY, Kozub NI, Skybina KP, Kozub MN Placental cryoextract rescue ovarian function of mice with premature ovarian falure induced by chemoterapy. *Prezeglad lekarski*. 2016; 73, Suppl. 1: 5.
242. Prokopyuk OS, Prokopyuk VYu, Pasieshvili NM, Chyzhevskiy VV, Trifonov VYu, Karpenko VG, Loginova OO. Implantation of cryopreserved human placental fragments restores prooxidant-antioxidant balance in experimental animals of late ontogeny. *Probl Cryobiol Cryomed*. 2017; 27(1): 61-70. doi: 10.15407%2Fcryo27.01.061
243. Prokopyuk OS, Prokopyuk VYu, Volina VV, Chizevsky VV Cryopreservation effect on morfofunctional integrity of human placental tissue. In: *Speaker Abstract 47th Annual Meeting of Cryobiology “Cryo-2010”*; 2010 July 17-20, Bristol. Bristol: Society for Cryobiology: 2010. p. 77.

244. Prokopyuk OS, Prokopyuk VYu. Morphofunctional integrity of placental fragments after using different cryopreservation protocols. Problems of cryobiology. 2012; 22(3): 264.
245. Prokopyuk V.Yu. , Chub O.V., Shevchenko N.A., Falko O.V., Musatova I.B., Lazurenko V.V. , Tischenko A.N., Prokopyuk O.S. Cryopreserved placental explants increase lifespan of male mice and change survival features of female mice. Probl Cryobiol Cryomed 2017; 27(2): 143–150.
246. Prokopyuk VYu, Chub OV, Shevchenko MV, Prokopyuk OS. Placental stem cells, organotypic culture and human placenta extract have neuroprotective activity. Cell and Organ Transplantology. 2017; 5(1): 39-42. doi:10.22494/cot.v5i1.67
247. Prokopyuk VYu, Falko OV, Musatova IB, Prokopyuk OS, Royenko OO, Terekhova OO, Chub OV. Low temperature preservation and storage of placental biological derivatives. Probl Cryobiol Cryomed. 2015; 25(4): 291-310. doi:10.15407/cryo25.04.291.
248. Prokopyuk VYu, Grischenko OV, Prokopyuk OV, Shevchenko NO , Falko OV, Storchak AV, Schedrov AO. Effect of cryopreserved placental explants on female reproductive system under normal and pathological conditions (experimental study). Probl Cryobiol Cryomed. 2017; 28(3): 250-65. DOI: <https://doi.org/10.15407%2Fcryo27.03.250>
249. Prokopyuk VYu, Pogozykh D, Pogozykh O, Musatova IB, Kuleshova LG, Prokopyuk OS Influence of cryopreservation on survival of placental, umbilical cord, and fetal membrane explants, as well as placental cells within spheroids and alginate microspheres. In: Society for Low Temperature Biology Annual Meeting 2016. 2016 september 7, Dresden, p.27.
250. Prokopyuk VYu, Prokopyuk OS, Musatova IB, Roenko AN, Terekhova EA Preservation assay for placental, umbilical and membrain tissues in low temperature bank. In: Abstracts and program "Freezing biological time" Society for Low Temperature Biology 50th Anniversary Celebration, Annual Scientific Conference & AGM; 2014 October 8 - 10; London, p.74.

251. Prokopyuk VYu, Prokopyuk OS, Musatova IB, Shevchenko NA, Roenko AA, Terehova EA, Volina VV. Safety of placental, umbilical cord and fetal membrane explants after cryopreservation. *Cell and organ transplantology*. 2015; 3(1): 34-8. doi:10.22494/cot.v3i1.18
252. Prokopiuk VYu, Kozub MM, Skibina KP, Prokopyuk OV. Experimental study of cell and tissue therapy protocols in rehabilitation after chemotherapy-induced ovarian failure. *Exp Oncol*. 2017; 39(3): 250-1.
253. Rasquin LL, Mayrin JV. Polycystic Ovarian Disease (Stein-Leventhal Syndrome). Authors Source StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2017-2017 Oct 6. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29083730>
254. Ravishanker R, Bath AS, Roy R. "Amnion Bank" – the use of long term glycerol preserved amniotic membranes in the management of superficial and superficial partial thickness burns. *Burns*. 2003; 29(4): 369-374.
255. Rayburn WF, Tracy EE. Changes in the Practice of Obstetrics and Gynecology. *Obstet Gynecol Surv*. 2016; 71(1): 43-50. doi: 10.1097/OGX.0000000000000264.
256. Regnault TR, Galan HL, Parker TA, Anthony RV. Placental development in normal and compromised pregnancies – a review. *Placenta*. 2002; 23(23): S119-S129.
257. Riboh JC, Saltzman BM, Yanke AB, Cole BJ. Human amniotic membrane-derived products in sports medicine: basic science, early results, and potential clinical applications. *Am J Sports Med*. 2016; 44(9): 2425-34. doi: 10.1177/0363546515612750.
258. Ricci E, Vanosi G, Lindenmair A, Hennerbichler S, Peterbauer-Scherb A, Wolbank S. et al. Anti-fibrotic effects of fresh and cryopreserved human amniotic membrane in a rat liver fibrosis model *Cell Tissue Bank*. 2013;14(3):475-88. doi: 10.1007/s10561-012-9337-x.
259. Riley JK. Trophoblast immune receptors in maternal-fetal tolerance *Immunol Invest*. 2008;37(5):395-426. doi: 10.1080/08820130802206066.

260. Riordan NH, Chan K, Marleau AM, Ichim TE. Cord blood in regenerative medicine: do we need immune suppression? *J Transl Med.* 2007; 5: 8. doi:10.1186/1479-5876-5-8
261. Rittirsch D, Huber-Lang MS, Flierl MA, Ward PA. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. *Nat Protoc.* 2009;4(1):31-6. doi: 10.1038/nprot.2008.214.
262. Roselli EA, Lazzati S, Iseppon F, Manganini M, Marcato L, Gariboldi MB, et al. Fetal mesenchymal stromal cells from cryopreserved human chorionic villi: cytogenetic and molecular analysis of genome stability in long-term cultures *Cytotherapy.* 2013;15(11):1340-51. doi: 10.1016/j.jcyt.2013.06.019.
263. Ross C.A. The trophoblast model of cancer. *Nutr. Cancer.* 2015; 67(1): 61-7.
264. Roy S, Arora S, Kumari P, Ta M. A simple and serum-free protocol for cryopreservation of human umbilical cord as source of Wharton's jelly mesenchymal stem cells. *Cryobiology.* 2014; 68(3):467-72. doi: 10.1016/j.cryobiol.2014.03.010.
265. Ruggeri A. Alternative donors: cord blood for adults. *Seminars in Hematology.* 2016; 53(2): 65-73.
266. Ruiz A, Aguilar R, Tébar AM, Gaytán F, Sánchez-Criado JE. RU486-treated rats show endocrine and morphological responses to therapies analogous to responses of women with polycystic ovary syndrome treated with similar therapies. *Biol Reprod.* 1996;55(6):1284-91.
267. Saurat JH, Didierjean L, Mérot Y, Salomon D. Blistering skin disease in a man after injections of human placental extracts. *BMJ.* 1988 Sep 24;297(6651):775.
268. Segal SK, Mohan M, Anand NK, Kulsreshtha R. Placental extract--a teratogen. *Indian Pediatr.* 1990 Aug;27(8):871-3.
269. Shablii V., Kuchma M., Kyryk V., Onishchenko G., Tsupikov O., et al. Mesenchymal stromal cells from native and cryopreserved human placenta: phenotype, multipotency and in vivo migration potential. *Problems of*

- Cryobiology. 2012; 22 (2): 157-160.
270. Shadyab AH, Gass ML, Stefanick ML, Waring ME, Macera CA, et al. Maternal age at childbirth and parity as predictors of longevity among women in the unitedstates: the women's health initiative. Am J Public Health. 2017 Jan;107(1):113-119.
 271. Schevchenko NO, Somova KV, Volina VV, Prokopiuk VYu, Prokopiuk OS. Dynamics of activity and duration of functioning of cryopreserved cryoextract, placental cells and fragments in the organism of experimental animals. Morphologia. 2016;10(2):93-8.
 272. Schreiber K, Sciascia S, de Groot PG, Devreese K, Jacobsen S, Ruiz-Irastorza G et al. Antiphospholipid syndrome. Nat Rev Dis Primers. 2018;4:18005. doi: 10.1038/nrdp.2018.5.
 273. Schumacher A, Costa SD, Zenclussen AC. Endocrine factors modulating immune responses in pregnancy. Front Immunol. 2014;5:196. doi: 10.3389/fimmu.2014.00196.
 274. Sekhon LH, Gerber RS, Rebarber A, Saltzman DH, Klauser CK, Gupta S , Fox NS. Effect of oocyte donation on pregnancy outcomes in in vitro fertilization twin gestations. Fertil Steril. 2014;101(5):1326-30. doi: 10.1016/j.fertnstert.2014.01.055.
 275. Seo JM, Sohn MY, Suh JS, Atala A, Yoo JJ, Shon YH. Cryopreservation of amniotic fluid-derived stem cells using natural cryoprotectants and low concentrations of dimethylsulfoxide Cryobiology. 2011;62(3):167-73. doi: 10.1016/j.cryobiol.2011.02.003.
 276. Shablil V., Kuchma M., Kyryk V., Onishchenko G., Tsupikov O, Klymenko P. et. al. Mesenchymal stromal cells from native and cryopreserved human placenta: phenotype, multipotency and in vivo migration potential. Probl. Cryobiol. Cryomed. 2012; 22(2): 157-60.
 277. Shah PH, Venkatesh R, More CB, Vassandacoumara V. Comparison of therapeutic efficacy of placental extract with dexamethasone and hyaluronic acid with dexamethasone for oral submucous fibrosis - a retrospective analysis.

- J Clin Diagn Res. 2016 Oct;10(10):ZC63-ZC66.
278. Sharma N, Lathi SS, Sehra SV, Agarwal T, Sinha R, Titiyal JS. et al. Comparison of umbilical cord serum and amniotic membrane transplantation in acute ocular chemical burns. *Br J Ophthalmol.* 2015; 99(5):669-73. doi: 10.1136/bjophthalmol-2014-305760.
 279. Silini AR, Cancelli S, Signoroni PB, Cargnoni A, Magatti M, Parolini O. The dichotomy of placenta-derived cells in cancer growth. *Placenta.* 2017;59:154-162. doi: 10.1016/j.placenta.2017.05.011.
 280. Silini AR, Cargnoni A, Magatti M, Pianta S, Parolini O. The long path of human placenta, and its derivatives, in regenerative medicine. *Front Bioeng Biotechnol.* 2015;3:162. doi: 10.3389/fbioe.2015.00162.
 281. Skybina KP, Chub OV, Prokopyuk VYu, Shevchenko MV. Placental factors protects neural cells from glutamate-induced toxicity. In: Chernykh VP, Kotvitska AA, Krutskyh TV, Danylchenko SYu, editors. *Topical issues of new drugs development: Abstracts of XXIII International Scientific And Practical Conference Of Young Scientists And Student in 2 vol.* 2016 April 21 Kharkiv. Kharkiv: Publishing Office NUPh, 2016, vol. 2, p. 106.
 282. Soma-Pillay P, Nelson-Piercy C, Mebazaa A, Physiological changes in pregnancy *Cardiovasc J Afr.* 2016; 27(2): 89-94.
 283. Sommer M, Fünfstück R, Stein G. Cell cultures from cryopreserved renal biopsies and other tissue samples. *Exp Toxicol Pathol.* 1999;51(3):229-34.
 284. Spong CY, Ghidini A, Ossandon M, Walker CN, Pezzullo JC. Are the cytokines interleukin-6 and angiogenin stable in frozen amniotic fluid? *Am J Obstet Gynecol.* 1998;178(4):783-6.
 285. Sukach A.N., Shevchenko M.V., Liashenko T.D. Comparative study on influence of fetal bovine serum and serum of adult rat on cultivation of newborn rat neural cells. *Biopolymers and cell.* 2014; 30(5): 394-99.
 286. Sullivan SD, Sarrel PM, Nelson LM. Hormone replacement therapy in young women with primary ovarian insufficiency and early menopause. *Fertil Steril.* 2016 Dec;106(7):1588-1599. doi: 10.1016/j.fertnstert.2016.09.046.

287. Tahmasebi S, Tahamtan M, Tahamtan Y. Prevention by rat amniotic fluid of adhesions after laparotomy in a rat model. *Int J Surg.* 2012;10(1):16-9. doi: 10.1016/j.ijssu.2011.11.003
288. Taghizadeh RR, Cetrulo KJ, Cetrulo CL. Wharton's Jelly stem cells: future clinical applications *Placenta.* 2011; 32 Suppl 4:S311-5. doi: 10.1016/j.placenta.2011.06.010.
289. Tarusin DN, Petrenko YuA, Semenchenko OA, Mutsenko VV, Zaikov VS, Petrenko AY. Efficiency of the sucrose-based solution and UW solution for hypothermic storage of human mesenchymal stromal cells in suspension or within alginate microspheres. *Problems of cryobiology and cryomedicine.* 2015; 25(4): 329-339. doi:10.15407/cryo25.04.329
290. Taskin O, Birincioglu M, Aydin A, Buhur A, Burak F, Yilmaz I, Wheeler JM. The effects of twisted ischaemic adnexa managed by detorsion on ovarian viability and histology: an ischaemia-reperfusion rodent model. *Hum Reprod.* 1998; 13(10): 2823-7.
291. Tehrani FA, Ahmadiani A, Niknejad H. The effects of preservation procedures on antibacterial property of amniotic membrane. *Cryobiology.* 2013; 67(3): 293-298.
292. Thirumala S, Goebel WS, Woods EJ. Clinical grade adult stem cell banking. *Organogenesis.* 2009; 5(3): 143-54.
293. Thomasen H, Pauklin M, Noelle B, Geerling G, Vetter J, Steven P. et al. The effect of long-term storage on the biological and histological properties of cryopreserved amniotic membrane. *Curr Eye Res.* 2011;36(3):247-55. doi: 10.3109/02713683.2010.542267.
294. Togashi S, Takahashi N, Iwama M, Watanabe S, Tamagawa K, Fukui T. Antioxidative collagen-derived peptides in human-placenta extract. *Placenta.* 2002; 23(6):497-502. doi:10.1053/plac.2002.0833
295. Trivedi MK, Mondal SC, Gangwar M, Jana S. Effect of a novel ashwagandha-based herbomineral formulation on pro-inflammatory cytokines expression in mouse splenocyte cells: a potential immunomodulator.

- Pharmacogn Mag. 2017;13(Suppl 1):S90-S94. doi: 10.4103/0973-1296.197709.
296. Van de Kerkhove M P, Hoekstra R, van Nooijen FC, Spoelstra FO, Doorschodt BM, van Wijk AC et al. Subnormothermic preservation maintains viability and function in a porcine hepatocyte culture model simulating bioreactor transport. *Cell Transplant*. 2006; 15(2):161-8.
 297. United Nation Ukraine. Цілі сталого розвитку. Забезпечення здорового способу життя та сприяння благополуччю для всіх в будь-якому віці. <http://sdg.org.ua/ua/pro-hlobalni-tsili/good-health-and-well-being>. Accessed 28 Feb 2018.
 298. US National Institutes of Health. <https://clinicaltrials.gov>. Accessed 28 Feb2018.
 299. US National Library of Medicine. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Accessed 28 Feb 2018.
 300. Van Pham P, Dang LT, Dinh UT, Truong HT, Huynh BN, et al. In vitro evaluation of the effects of human umbilical cord extracts on human fibroblasts, keratinocytes, and melanocytes. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2014 Apr;50(4):321-30. doi: 10.1007/s11626-013-9706-1. Epub 2013 Oct 26.
 301. Vanover M, Wang A, Farmer D. Potential clinical applications of placental stem cells for use in fetal therapy of birth defects. *Placenta*. 2017; 59:107-112. doi: 10.1016/j.placenta.2017.05.010.
 302. Veenstra van Nieuwenhoven AL, Heineman MJ, Faas MM. The immunology of successful pregnancy. *Human Reproduction Update*. 2003; 9(4): 347-57.
 303. Velayuthaprabhu S, Archunan G, Balakrishnan K. Placental thrombosis in experimental anticardiolipin antibodies-mediated intrauterine fetal death. *Am. J. Reprod. Immunol*. 2007; 57 (4): 270-276.
 304. Ventura Ferreira MS, Bienert M, Müller K, Rath B, Goecke T, Opländer C et al. Comprehensive characterization of chorionic villi-derived mesenchymal stromal cells from human placenta. *Stem Cell Res Ther*. 2018 Feb 5;9(1):28. doi: 10.1186/s13287-017-0757-1

305. Volkova NA, Goltsev AN. Cryopreservation effect on proliferation and differentiation potential of cultured chorion cells. *Cryoletters*. 2015; 36(1): 25-29.
306. Volkova NO, Yukhta MS, Stepanyuk LV, Chernyshenko LG Cryopreserved multipotent mesenchymal stromal cells restore fertility in animals with chronic inflammation of ovaries. *Problems of cryobiology and cryomedicine*. 2016; 26(1):84-92.
307. Walker BS, Nelson RE, Jackson BR, Grenache DG, Ashwood ER, Schmidt RL. A cost-effectiveness analysis of first trimester non-invasive prenatal screening for fetal trisomies in the United States. *PLoS One*. 2015; 10(7): 0131402. doi:10.1371/journal.pone.0131402
308. Wang HY, Lun ZR, Lu SS. Cryopreservation of umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells without dimethyl sulfoxide. *Cryo Letters*. 2011; 32(1): 81-88.
309. Werber B, Martin E. A prospective study of 20 foot and ankle wounds treated with cryopreserved amniotic membrane and fluid allograft. *J Foot Ankle Surg*. 2013 Sep-Oct;52(5):615-21. doi: 10.1053/j.jfas.2013.03.024
310. Widen EM, Gallagher D. Body composition changes in pregnancy: measurement, predictors and outcomes. *Eur J Clin Nutr*. 2014; 68(6): 643-52. doi: 10.1038/ejcn.2014.40.
311. World Health Organization. Reproductive health strategy. http://www.who.int/reproductivehealth/publications/general/RHR_04_8/en/ Accessed 28 Feb 2018.
312. World health statistics 2017: monitoring health for the SDGs, Sustainable Development Goals. Geneva: World Health Organization; 2017. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/2017/en/
313. Xia D, He HY, Lei ZM, Zhang PM, Guo Y. Effects of human umbilical cord serum on proliferation and insulin content of human fetal islet-like cell clusters. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2004;3(1):144-8.

314. Xiao GY, Liu IH, Cheng CC, Chang CC, Lee YH, Cheng WT, et al. Amniotic fluid stem cells prevent follicle atresia and rescue fertility of mice with premature ovarian failure induced by chemotherapy. *PLoS One*. 2014 8;9(9):e106538. doi: 10.1371/journal.pone.0106538.
315. Xie C, Jin J, Lv X, Tao J, Wang R, Miao D. Anti-aging effect of transplanted amniotic membrane mesenchymal stem cells in a premature aging model of Bmi-1 deficiency. *Sci Rep* 2015; 5: 13975. doi: 10.1038/srep13975.
316. Yang Y, Melzer C, Bucan V, von der Ohe J, Otte A, Hass R. Conditioned umbilical cord tissue provides a natural three-dimensional storage compartment as in vitro stem cell niche for human mesenchymal stroma. *Stem Cell Res Ther*. 2016;7:28. doi: 10.1186/s13287-016-0289-0.
317. Yasuda Y, Masuda S, Chikuma M, Inoue K, Nagao M, Sasaki R. Estrogen-dependent production of erythropoietin in uterus and its implication in uterine angiogenesis. *J Biol Chem*. 1998;273(39):25381-7.
318. Yoon KC. Use of umbilical cord serum in ophthalmology. *Chonnam Med J*. 2014 Dec; 50(3): 82-85.
319. Yoshizawa RS. Review: public perspectives on the utilization of human placentas in scientific research and medicine *Placenta*. 2013; 34(1):9-13. doi: 10.1016/j.placenta.2012.10.014.
320. Yu XM, Xue ZG, Dai GS, Xu X, Chen WA, Fan KW et al. Isolation, culture and cryopreservation of cells derived from fetal appendages. *Zhonghua Shao Shang Za Zhi*. 2007;23(6):447-50
321. Yurchenko TN, AA. Kapustyanskaya, Shepitko VI. Therapy of gouty arthritis in obese patients using cryopreserved placental extract. *Probl Cryobiol Cryomed*. 2013; 23(4):326–337.
322. Yurchenko TN, Kondakov II, Strona VI. Renal effects following introduction of cryopreserved placental extract on the background of experimental renal failure. *Probl Cryobiol Cryomed* 2014; 24(1):75–78.

doi:10.15407%2Fcryo24.01.075

323. Zarinara A, Zeraati H, Kamali K, Mohammad K, Shahnazari P, Akhondi M M. Models predicting success of infertility treatment: a systematic review. *J Reprod Infertil*. 2016; 17(2): 68-81.
324. Zhang D, Zheng L, Shi H, Chen X, Wan Y, Zhang H et al. Suppression of peritoneal tumorigenesis by placenta-derived mesenchymal stem cells expressing endostatin on colorectal cancer. *Int. J. Med. Sci*. 2014; 11(9): 870-9.
325. Zhang Q, Bu S, Sun J, Xu M, Yao X, He K et al. Paracrine effects of human amniotic epithelial cells protect against chemotherapy-induced ovarian damage. *Stem Cell Res Ther*. 2017;8(1):270. doi: 10.1186/s13287-017-0721-0
326. Zhang S, Yuan J, Li W, Ye Q. Organ transplantation from donors (cadaveric or living) with a history of malignancy: review of the literature. *Transplant. Rev. (Orlando)*. 2014; 28(4): 169-75.
327. Zheng J. editor. Recent advances in research on the human placenta. Croatia. InTech. 2012. <http://www.intechopen.com/books/recent-advances-in-research-on-the-human-placenta>

Список публікацій за темою дисертації

Статті у наукових фахових виданнях.

1. Трифонов ВЮ, Прокопюк ВЮ, Прокопюк ОС, Липина ОВ, Волина ВВ, Зуб ЛИ, Фалько ОВ, Прокопюк АВ. Экспериментальное обоснование возможности прегравидарной профилактики антифосфолипидного синдрома. Таврический медико-биологический вестник. 2010; 13 (4,52): 188-192.
2. Трифонов ВЮ, Прокопюк ВЮ Современные представления об акушерском антифосфолипидном синдроме. Експериментальна і клінічна медицина. 2010; 2: 50-5.
3. Прокопюк ОС, Чижевський ВВ, Прокопюк ВЮ. Вплив імплантації кріоконсервованої хоріальної тканини на морфофункціональний стан міокарда старих щурів. Медицина сьогодні і завтра. 2011; 50-51(1-2): 242-245.
4. Prokopyuk VYu Cryopreserved chorionic tissue in maternal and fetal infection therapy (clinical and experimental research). Problems of cryobiology. 2011; 21(3): 338-249.
5. Прокопюк ВЮ Экспериментальная оценка эффективности прегравидарной подготовки и лечения антифосфолипидного синдрома. Клінічна та експериментальна патологія. 2011; X (2,36,1):79-82.
6. Мусатова ИБ, Прокопюк ОС, Волина ВВ, Прокопюк ВЮ Создание многокомпонентных сред для криоконсервирования ткани плаценты. Биофизика живой клетки 2014; 10: 126-128.
7. Прокопюк ВЮ, Фалько ОВ, Прокопюк ОС, Волина ВВ, Трифонов ВЮ. Аналіз методологічних підходів при моделюванні гестаційного антифосфоліпідного синдрому. Патологія. 2015; 32(2): 4-10.

8. Prokopyuk VYu, Falko OV, Musatova IB, Prokopyuk OS, Royenko OO, Terekhova OO, Chub OV. Low temperature preservation and storage of placental biological derivatives. *Probl Cryobiol Cryomed*. 2015; 25(4): 291-310. doi:10.15407/cryo25.04.291.
9. Прокопюк ОС, Шевченко НО, Прокопюк ВЮ, Чуб ОВ, Терехова ОО. Вплив кріоконсервованих біоб'єктів плацентарного походження на культуру клітин. *Вісник проблем біології і медицини*. 2015; 1(122,3): 160-4.
10. Pogozhykh D, Prokopyuk V, Pogozhykh O, Mueller T, Prokopyuk O. Influence of factors of cryopreservation and hypothermic storage on survival and functional parameters of multipotent stromal cells of placental origin. *PLoS One*. 2015; 10 (10): e0139834. doi: 10.1371/journal.pone.0139834.
11. Prokopyuk VYu, Prokopyuk OS, Musatova IB, Shevchenko NA, Roenko AA, Terekhova EA, Volina VV. Safety of placental, umbilical cord and fetal membrane explants after cryopreservation. *Cell and organ transplantology*. 2015; 3(1): 34-8. doi:10.22494/cot.v3i1.18
12. Schevchenko NO, Somova KV, Volina VV, Prokopyuk VYu, Prokopyuk OS. Dynamics of activity and duration of functioning of cryopreserved cryoextract, placental cells and fragments in the organism of experimental animals. *Morphologia*. 2016;10(2):93-8.
13. Пасієшвілі НМ, Карпенко ВГ, Прокопюк ВЮ, Фалько ОВ. Вплив імуномодуляторів на перебіг вагітності при експериментальних інфекційно-запальних ураженнях матері та плоду. *Sciences of Europe*. 2016; 1(3): 15-23.
14. Прокопюк ВЮ. Внеплацентарные трофобластические структуры: изучение, структура, функции, свойства, диагностическое и терапевтическое значение. *Акушерство и гинекология*. 2016; 2: 49-54.
15. Роєнко ОО, Прокопюк ВЮ, Фалько ОВ, Шевченко НО, Прокопюк ОС. Використання кріоконсервованих оболонок плода в терапії трофічних

- виразок в експерименті. Клінічна хірургія. 2016; 5: 69-72.
16. Козуб ММ, Прокопюк ВЮ, Козуб МІ, Прокопюк ВЮ, Скібіна КП
Порівняльна характеристика різних методик оперативного лікування, профілактики спайкоутворення та післяопераційної реабілітації у щурів з моделлю трубної вагітності в експерименті. Збірник наукових праць співробітників НМАПО ім. П.Л. Шупіка. 2016; 27(2): 224-31.
 17. Falko OV, Shevchenko NA, Prokopyuk VY, Roenko AA, Prokopyuk OS.
Comparative analysis of limbs' trophic ulcers modeling methods in mice. *Novosti Khirurgii*. 2017; 25(6): 561-6.
 18. Kozub MM, Prokopyuk VYu, Skibina KP, Prokopyuk OV, Kozub NI
Comparison of various of tissue and cell therapy approaches when restoring ovarian, hepatic and kidney's function after chemotherapy-induced ovarian failure. *Exp Oncol*. 2017; 39(3): 181-5.
 19. Musatova IB, Volina VV, Chub OV, Prokopyuk VYu, Prokopyuk OS
Effects of implantation of cryopreserved placental explants on the behavioral indices and morphological characteristics of the cerebral structures in senescent mice. *Neurophysiology*. 2017; 49(5): 363-371.
 20. Pogozhykh D, Pogozhykh O, Prokopyuk V, Kuleshova L, Goltsev A, Blasczyk R, Mueller T. Influence of temperature fluctuations during cryopreservation on vital parameters, differentiation potential, and transgene expression of placental multipotent stromal cells. *Stem Cell Research & Therapy*. 2017; 8:66. doi: 10.1186/s13287-017-0512-7
 21. Prokopyuk OS, Prokopyuk VYu, Pasieshvili NM, Chyzhevskiy VV, Trifonov VYu, Karpenko VG, Loginova OO
Implantation of cryopreserved human placental fragments restores prooxidant-antioxidant balance in experimental animals of late ontogeny. *Cryobiol. Cryomed*. 2017; 27(1): 61-70. doi: 10.15407/cryo27.01.061
 22. Prokopyuk VYu, Chub OV, Shevchenko NA, Falko OV, Musatova IB, Lazurenko VV, Tischenko AN, Prokopyuk OS
Cryopreserved placental

- explants increase lifespan of male mice and change survival features of female mice. *Probl Cryobiol Cryomed* 2017; 27(2): 143–150.
23. Prokopyuk VYu, Grischenko OV, Prokopyuk OV, Shevchenko NO, Falko OV, Storchak AV, Schedrov AO. Effect of cryopreserved placental explants on female reproductive system under normal and pathological conditions (experimental study). *Probl Cryobiol Cryomed*. 2017; 28(3): 250-65. DOI: <https://doi.org/10.15407%2Fcryo27.03.250>
24. Prokopyuk VYu, Chub OV, Shevchenko MV, Prokopyuk OS. Placental stem cells, organotypic culture and human placenta extract have neuroprotective activity. *Cell and Organ Transplantation*. 2017; 5(1): 39-42. doi:10.22494/cot.v5i1.67
25. Pogozhykh O, Prokopyuk V, Figueiredo C, Pogozhykh D. Placenta and placental derivatives in regenerative therapies: experimental studies, history, and prospects. *Stem Cells International*. 2018; 2018: 14. doi:10.1155/2018/4837930
26. Prokopiuk VYu Influence of media conditioned by cryopreserved and fresh placental explants and cells on murine uterine and ovarian organotypic cultures. *Probl Cryobiol Cryomed*. 2018; 28(2): 139-150.
27. Прокопюк ВЮ, Гольцев АМ, Прокопюк ОС, Сомова КВ, Логінова ОО. Вплив кріоконсервованих експлантів плаценти на перебіг експериментального синдрому полікістозних яєчників. *Вісник проблем біології і медицини*. 2018; 142(1): 167-171.
28. Прокопюк ВЮ, Логінова ОО, Прокопюк ОВ, Сомова ЄВ. Вплив кріоконсервованих експлантів плаценти на відновлення яєчників після лікування перекруту. *Світ біології та медицини*. 2018; 63 (1): 150-153.
29. Прокопюк ВЮ, Прокопюк ОС, Мусатова ІБ, Сорокіна ІВ, Логінова ОО, Сомова КВ Корекція інволютивних змін репродуктивної системи самиць старих щурів імплантацією кріоконсервованих фрагментів плаценти. *Фізіол. журн*. 2018; 64(4): 74-81.
30. Prokopiuk VYu, Falko OV, Karpenko VG, Chub OV, Loginova OO

- Influence of native and cryopreserved placental derivatives on the splenocyte functional characteristics in vitro. Bulletin of problems in biology and medicine. 2018. V.144 (2); 221-223.
31. Pogozhykh O, Prokopyuk V, Prokopyuk O, Kuleshova L, Goltsev A, Figueiredo C, Pogozhykh D Towards biobanking technologies for natural and bioengineered multicellular placental constructs. Biomaterials. 2018; 185; 39-50.
32. Прокопюк ВЮ, Шевченко МВ, Прокопюк ОС, Мусатова ІБ, Смоляник К.Ю. Оцінка можливості короткочасного зберігання експлантів плаценти для регенеративної медицини. Вісник наукових досліджень. 2019; 2: 53-57. DOI 10.11603/2415-8798.2019.2.10271
33. Прокопюк ВЮ, Пасієшвілі НМ, Прокопюк ОВ, Карпенко ВГ, Логінова ОО Вплив кріоконсервованих експлантів плаценти на прояви ускладнень після операцій на матці в експерименті. Вісник проблем біології і медицини. 2019; 2 (151): 151-155.

Тези конференцій.

34. Prokopyuk OS, Prokopyuk VYu, Volina VV, Chizevsky VV Cryopreservation effect on morfofunctional integrity of human placental tissue. In: Speaker Abstract 47th Annual Meeting of Cryobiology "Cryo-2010"; 2010 July 17-20, Bristol. Bristol: Society for Cryobiology: 2010. p. 77.
35. Прокопюк ВЮ, Грищенко ВИ, Прокопюк ОС, Чижевский ВВ Опыт работы низкотемпературного банка аутологичных и донорских препаратов кордовой крови и плаценты в регенеративной медицине. В: Ткачук ВА, редактор. Сборник тезисов Всероссийской научной школы-конференции «Стволовые клетки и регенеративная медицина»; 2010 октябрь 25-26, Москва. Москва: "МГУ"; 2010, с. 58-59.
36. Прокопюк ОС, Прокопюк ВЮ Кріоконсервовані плацентарні біооб'єкти в тканинному аутобанку. В: акад. РАН і РАМН Міронов СІ

- редактор. Сборник тезисов IV Всероссийского симпозиума с международным участием «Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии»; 2010 апрель 21-22; Санкт-Петербург. Санкт-Петербург: «Человек и его здоровье»; 2010, с. 24.
37. Прокопюк ВЮ, Прокопюк ОС. Механизмы влияния криоконсервированных препаратов плаценты на репродуктивную функцию в периоде позднего онтогенеза. В: Гольцев АН, редактор. Тезисы докладов 36-й ежегодной конференции молодых учёных «Холод в биологии и медицине»; 2012 май 22-24; Харьков. Харьков: ИПКиК НАНУ; 2010, с. 31.
38. Прокопюк ВЮ, Гольцев АН, Прокопюк ОС, Трифонов ВЮ. Экспериментальное обоснование прегравидарной подготовки криоконсервированными плацентарными препаратами. В: Сборник тезисов и программа V Всероссийский симпозиум с международным участием „Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии”; 2012 май 17-18; Уфа. Уфа: «Башкортостан», 2012, с. 184-5.
39. Прокопюк ОС, Прокопюк ВЮ, Карпенко ВГ. Плацентарная терапия гериатрических изменений репродуктивной функции В: Сборник тезисов и программа V Всероссийский симпозиум с международным участием „Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии”; 2012 май 17-18; Уфа. Уфа: «Башкортостан», 2012, с. 185-6.
40. Prokopyuk OS, Prokopyuk VYu. Morphofunctional integrity of placental fragments after using different cryopreservation protocols. Problems of cryobiology. 2012; 22(3): 264.
41. Прокопюк ОС, Прокопюк ВЮ. Использование криоконсервированных препаратов плаценты для коррекции возрастных изменений. В: Матеріали конференції „Актуальні питання геронтології та гериатрії”, присвяченій пам’яті В.В. Фролькіса; 2013 січень 25; Київ. Київ:

- "Інститут геронтології ім.Д.Ф.Чеботарьова НАМН України", с. 48.
- 42.Прокопюк ВЮ. Етико-правові проблеми отримання, дослідження і застосування плацентарних препаратів. В: Тези п'ятого конгресу з біоетики; 2013 вересень 23-25; Київ, с.146-147.
 - 43.Прокопюк ОС, Ронко АА, Прокопюк ВЮ, Чижевський ВВ. Низкотемпературний банк плацентарних біооб'єктів: научні перспективи розвитку в сфері медичних біотехнологій. В: Матеріали III міжнародної научно-практичної конференції „Академічна наука – проблеми і досягнення”; 2014 лютий 20-2; Москва, с. 43-6.
 - 44.Prokopyuk VYu, Prokopyuk OS, Musatova IB, Roenko AN, Terekhova EA Preservation assay for placental, umbilical and membrain tissues in low temperature bank. In: Abstracts and program "Freezing biological time" Society for Low Temperature Biology 50th Anniversary Celebration, Annual Scientific Conference & AGM; 2014 October 8 - 10; London, p.74.
 - 45.Pogozhykh O, Pogozhykh D, Prokopiuk V, Muller T. Parametrs for accurate estimation of survival rates of multipotent stromal cells after long-term criopreservation simulation. In: Abstracts and program "Freezing biological time" Society for Low Temperature Biology 50th Anniversary Celebration, Annual Scientific Conference & AGM; 2014 October 8 - 10; London, p.74.
 - 46.Pogozhykh D, Pogozhykh O, Prokopiuk V, Mueller T. Mimicked long term cryopreservation of transgenic multipotent stromal cells affects viability but not transgene expression. In: Abstracts and program "8th International Meeting Stem Cell Network North Rhine-Westphalia". 2015 April 21-22; Bonn, Germany, p. 95.
 - 47.Prokopuk VY, Kozub NI, Skybina KP, Kozub MN Placental cryoextract rescue ovarian function of mice with premature ovarian failure induced by chemotherapy. *Prezeglad lekarski*. 2016; 73, Suppl. 1: 5.
 - 48.Skybina KP, Chub OV, Prokopyuk VYu, Shevchenko MV. Placental factors protects neural cells from glutamate-induced toxicity. In: Chernykh VP,

- Kotvitska AA, Krutskiyh TV, Danylchenko SYu, editors. Topical issues of new drugs development: Abstracts of XXIII International Scientific And Practical Conference Of Young Scientists And Student in 2 vol. 2016 April 21 Kharkiv. Kharkiv: Publishing Office NUPh, 2016, vol. 2, p. 106.
49. Прокопюк ВЮ, Скибина КП, Прокопюк АВ, Козуб МН. Экстракт плаценты ускоряет восстановление половой и репродуктивной функции после химиотерапии в эксперименте (пилотное исследование). Український радіологічний журнал. 2016; XXIV(1, 1): 159.
50. Чуб ОВ, Шевченко МА., Прокопюк ВЮ. Нейропротекторный эффект факторов плацентарного происхождения в модели глутамат-индуцированной токсичности клеток головного мозга новорожденных крыс. В: Тези доповідей 40 щорічної конференції молодих учених "Холод в біології та медицині". 2016 травень 23-24, Харків. Харків: ІПКіКНАНУ, с. 26.
51. Pogozhykh D, Pogozhykh O, Prokopyuk V, Goltsev A, Figueiredo C, Müller T. Mimicking long-term biobanking of placental multipotent stromal cells by temperature fluctuations during cryopreservation. In: Society for Low Temperature Biology Annual Meeting 2016. 2016 september 7, Dresden, p.7.
52. Prokopyuk VYu, Pogozhykh D, Pogozhykh O, Musatova IB, Kuleshova LG, Prokopyuk OS. Influence of cryopreservation on survival of placental, umbilical cord, and fetal membrane explants, as well as placental cells within spheroids and alginate microspheres. In: Society for Low Temperature Biology Annual Meeting 2016. 2016 september 7, Dresden, p.27.
53. Прокопюк ВЮ, Чуб ОВ, Шевченко М.А. Глутаматна ексайтотоксичність як метод вибору оцінки нейропротекторної дії лікарських препаратів in vitro. В: Черних ВП, редактор. Патофізіологія і фармація: шляхи інтеграції: тези доповідей VII Національного конгресу

- патофізіологів України з міжнародною участю. 2016 жовтень 5-7, Харків. Харків: НФаУ, с. 187.
54. Чуб ОВ, Прокопюк ВЮ, Прокопюк ОС, Мусатова ІБ, Шевченко МВ Кріоконсервовані плацентарні біопрепарати в профілактиці і корекції дисфункцій ЦНС в пізньому онтогенезі (експериментальне дослідження). Проблемы старения и долголетия. 2016; 25: 44.
 55. Чуб ОВ, Прокопюк ВЮ, Мусатова ІБ, Прокопюк ОС. Кріоконсервовані експланти плаценти підвищують тривалість життя самців і знижують імовірність смерті самиць в репродуктивний період. В: Тези доповідей XIV Міжнародної наукової конференції студентів, аспірантів, докторантів, молодих вчених та фахівців "Актуальні питання сучасної медицини". 2017 березень 30-31, Харків. Харків: ХНУ, с. 88-9.
 56. Prokopiuk VYu, Musatova IB, Shevchenko MV, Chub OV, Shevchenko NO, Prokopiuk OS Placental MSCs, explants, extract protect neural cells against glutamate-induced toxicity. In: Gálík J, Slovinská L, Lukáčová N, editors. Program and Abstract Book 8 th International Symposium on Experimental and Clinical Neurobiology. 2017 June 18 – 21 Kosice, Slovakia. Kosice: Mgr. Viliam Oravec - GAIA, p. 72.
 57. Pogozhykh O, Pogozhykh D, Prokopyuk V, Figueiredo C. Characterisation of cells derived from cryopreserved placental tissues. In: Abstract book. SLTB Science meeting Cambridge. 2017 September 19 – 20, Cambridge (Uk).
 58. Prokopiuk VYu, Kozub MM, Skibina KP, Prokopyuk OV. Experimental study of cell and tissue therapy protocols in rehabilitation after chemotherapy-induced ovarian failure. Exp Oncol. 2017; 39(3): 250-1.
 59. Прокопюк ВЮ, Гольцев АМ, Прокопюк ОВ, Фалько ОВ, Шевченко МВ Вплив кріоконсервованих мезенхімально стромальних клітин та експлантів плаценти на ізолювані тканини та in vitro клітини жіночої репродуктивної системи. Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю: «Досягнення та перспективи експериментальної

та клінічної ендокринології» (Сімнадцяті Данілевські читання). 2018 березень, 1 – 2 Харків. Харків. С.115.

60. Pogozhykh D, Prokopyuk V, Pogozhykh O, Goltsev A, Blasczyk R, Börgel M, Figueiredo C Low temperature storage of natural and bioengineered multicellular placental constructs. The International Journal of Artificial Organs. 2019; 42 (8): 398.

Глави монографій.

61. Ткачук ВА, редактор. Стволовые клетки и регенеративная медицина: Сб статей. Москва: МАКС Пресс, 2011. Прокопюк ОС, Грищенко ВИ, Бабийчук ЛА, Прокопюк ВЮ, Зубов ПМ. Глава 16. Криоконсервирование плацентарных биообъектов, содержащих стволовые клетки; с. 289-303.
62. Грищенко ВИ, Юрченко ТН, редактор. Прокопюк ОС, Чижевский ВВ, Прокопюк ВЮ, Волина ВВ. Плацента: криоконсервирование, структура, свойства, перспективы клинического применения. Харьков: СПД ФЛ Бровин А.В., 2011. Глава 5. Верификация биобезопасности и сохранности криоконсервированных плацентарных биообъектов; с. 207-245.
63. Чижевский ВВ, Прокопюк ОС, Грошевой МИ, Липина ОВ, Прокопюк ВЮ. Низкотемпературный банк биологических объектов: научно-методические основы и перспективы развития. В: Гольцев АН, редактор. Актуальные проблемы криобиологии и криомедицины. Харьков: издательский дом „Райдер”, 2012, с. 469-486.

Патенти.

64. Прокопюк ВЮ, Прокопюк ОС, Трифонов ВЮ, Зайченко ГВ. Спосіб моделювання акушерського антифосфоліпідного синдрому. Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України. Патент України № 62029. 2011 серпень 10.
65. Прокопюк ВЮ, Прокопюк ОС, Карпенко ВГ, Пасієшвілі НМ, Фалько

- ОВ. Спосіб корекції вікових порушень репродуктивної функції. Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України. Патент України № 72117. 2012 серпень 10.
- 66.Прокопюк ВЮ, Прокопюк ОС, Чижевський ВВ Спосіб кріоконсервування тканини плаценти. Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України. Патент України № 79009. 2013 квітень 10.
- 67.Прокопюк ВЮ, Пасієшвілі НМ, Прокопюк ОВ, Карпенко ВГ, Прокопюк ОС. Спосіб профілактики первинної плацентарної недостатності. Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України. Патент України № 91122. 2014 червень 25.
- 68.Прокопюк ВЮ, Скібіна КП, Козуб ММ, Прокопюк ОВ, Пасієшвілі НМ. Спосіб лікування передчасної недостатності яєчників. Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України. Патент України № 107968. 2016 червень 24.