

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І КРІОМЕДИЦИНИ

ПРОКОПЮК ВОЛОДИМИР ЮРІЙОВИЧ

УДК:615.361.013.85.014.41:618.1.21+612.62

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

14.01.35 – кріомедицина

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня доктора медичних наук

Науковий консультант –
акад. НАН України,
д.мед.н., професор А.М. Гольцев.

Харків - 2019

Дисертацією є рукопис

Робота виконана в Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України

Науковий консультант: академік НАН України, д.мед.н., професор
А.М. Гольцев Інститут проблем кріобіології і
кріомедицини НАН України

Офіційні опоненти: доктор медичних наук, професор

доктор медичних наук, професор

доктор медичних наук, професор

Захист відбудеться «??» ????? 2019 р. о ??:?? годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 64.242.01 в Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України за адресою: 61015, м. Харків, вул. Переяславська, 23

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України за адресою: 61015, м. Харків, вул. Переяславська, 23

Автореферат розіслано «??» ????? ??? р.

Учений секретар
спеціалізованої вченої ради,
кандидат біологічних наук,
науковий співробітник

Фалько О.В.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Розвиток клітинної, тканинної терапії та експериментальної медицини неможливий без удосконалення методів кріоконсервування та гіпотермічного зберігання клітин, тканин та біоінженерних конструкцій (S. Giwa et al., 2017, S. Thirumala al., 2009). Саме низькотемпературне зберігання може забезпечити наявність необхідної кількості та різноманітності зразків матеріалу, можливість транспортування, біобезпеки, тестування на відсутність збудників інфекційних хвороб та біосумісність (A.N. Goltsev, V.I. Grischenko al., 2007). Однак за відсутності ефективних методів зберігання біологічних структур до половини донорського матеріалу не може бути трансплантовано (A.J. Matas, 2015).

Похідні плаценти (клітини, тканини, біологічно активні речовини) є перспективними об'єктами для експериментального та клінічного застосування (A.R. Silini, O. Parolini, 2018, C. Pipino et al., 2013). По-перше, це обумовлено можливістю отримання великої кількості біоматеріалу з плаценти без шкоди для донорів (R.S. Yoshizawa 2013). По-друге, тканини та клітини плаценти, які регулюють та забезпечують взаємоіснування матері та плоду, мають здатність до синтезу багатьох регуляторних факторів та містять стовбурові клітини (O. Parolini et al., 2008). По-третє, клітини та тканини плаценти пристосовані до існування як в частково генетично чужорідному організмі матері, так і в повністю чужорідному, у випадку програм екстракорпорального запліднення з донацією яйцеклітин (L.H. Sekhon et al., 2014). Описано явище депортації та довгострокового існування екстраплацентарного трофобласту в організмі при фізіологічному перебігу вагітності (K.J. Askelund et al., 2011). Ці процеси забезпечуються зниженою експресією клітинами плаценти ряду антигенів, синтезом регуляторів, що приводить до зміни місцевої і загальної імунної відповіді (A.L.Veenstra van Nieuwenhoven et al., 2003). На даний час 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 та кордової крові (A.R. Silini et al., 2015). Похідні плаценти застосовувались при лікуванні патологій ендокринної, нервової системи, органів зору, кровотворення, при аутоімунних станах, ішемічних, дистрофічних та дегенеративних порушеннях (J. Zheng, 2012, C. Pipino et al., 2013, R. Lim , 2017)

Особливістю плацентарних структур є їх тропність до органів жіночої статеві системи, що обумовлено синтезом ряду гормонів та цитокінів (A. Schumacher et al., 2014). Відомо, що під час вагітності та після неї змінюється функціонування організму жінки, та перебіг ряду хвороб (А.П. Зильбер и др., 1997, М.М. Шехтман, 2006, P. Soma-Pillay et al., 2016). Доведена доцільність використання похідних плаценти при передчасному виснаженні яєчників, в тому числі після хіміотерапії, безплідді (О.М.Феськов, 2002, X. Guan-Yu et al., 2014), наслідках запального процесу, спайковій хворобі у малому тазі (В.А. Пітько, 2001, М.Г. Грищенко, 2011), патологічному клімаксі (Y.K. Lee et al., 2009), патології гестаційного періоду (І.В. Лахно, О.В. Грищенко, 1999). Продемонстрована ефективність терапії похідними плаценти при імунологічному конфлікті при

вагітності (Н.С. Луценко, 2005), невиношуванні вагітності (О.М. Аралов, 2004). Однак механізми дії нативних та кріоконсервованих похідних плаценти остаточно не з'ясовані, отримані емпірично на різних об'єктах данні науково не узагальнені, не сформульовано показання та протипоказання до їх застосування (В.І. Грищенко, 2010, A. Fierabracci, et al., 2015, O. Parolini et al., 2017).

Необхідність пошуку нових методів лікування хвороб жіночої статеві сфери, підвищення фертильності обумовлена проблемами захворюваності та депопуляції в Україні та розвинених країнах (WHO:World Health Statistics 2019). Найбільшу соціальну значущість мають непліддя, на яке страждає 10-20% подружніх пар (В.О. Феськов, 2017, A. Zarinara et al., 2016), запальні хвороби та гормональні порушення хоч раз у житті виникають у більшості жінок (О.В. Ромашенко та ін., 2016, B.B. Das et al., 2016, L.I. Rasquin Leon et al., 2017), близько 10% вагітностей завершуються абортами (Н.Я. Жилка та ін, 2018, C. Garrido-Gimenez, et al., 2015). 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 (<http://www.un.org.ua/ua/tsilirozvytku-tysiacholittia/tsili-staloho-rozvytku>). В Україні, незважаючи на реальні успіхи програми «Репродуктивне здоров'я нації», показники жіночого здоров'я ще відстають від європейських (Н.Г. Гойда та ін, 2016, І.Є. Вернера, 2016). Існуючі методи лікування гінекологічної та акушерської патології не достатньо ефективні, потребують вдосконалення та інновацій (W.F. Rayburn et al., 2016, H. Kitchen et al., 2017).

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 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).

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. У дисертаційній роботі застосовано сучасні інформативні методи дослідження. Для отримання, характеристики похідних плаценти та оцінки впливу факторів кріоконсервування застосовували методи культивування клітин, органотипове культивування, світлову, конфокальну лазерну скануючу мікроскопію, проточну цитометрію, біохімічні методи, програмне заморожування, кріомікроскопію. Для оцінки впливу похідних плаценти на жіночу репродуктивну систему застосовували моделювання

патологічних станів на лабораторних тваринах, культуральні, 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 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 тканинно-інженерні 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 надані 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 технічну 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 геріатрії», 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 геріатрів 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), щорічний 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», три розділи власних досліджень, узагальнення, висновки, практичні рекомендації, список посилань, який включає 327 джерел, з них 245 – іноземні, 1 додаток. Робота ілюстрована 31 таблицею і 98 рисунками.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Огляд літератури

У розділі представлено аналітичний огляд наукових публікацій що стосуються сучасних уявлень про плаценту, екстраплацентарні трофобластичні структури та штучні похідні плаценти, їх ембріогенез, структуру, функцію, імунологічні, ендокринологічні особливості, притаманні вагітності. Узагальнено погляди, перспективи та недоліки щодо кріоконсервування, гіпотермічного зберігання плацентарного матеріалу та його застосування у медичній практиці. Проаналізовані сучасні репродуктивні проблеми, та визначено, які з них можуть бути вирішені за допомогою застосування плацентарного матеріалу. На основі проведеного аналізу літературних джерел доведено, що актуальними та невирішеними є проблеми кріоконсервування похідних плаценти, визначення механізмів їх дії на жіночу статеву систему та можливість застосування в лікуванні гінекологічної патології.

Матеріали та методи дослідження

Враховуючи визначену мету та поставлені задачі було заплановано три послідовних етапи досліджень (рис. 1).

На першому етапі отримували, характеризували похідні плаценти вивчали їх особливості кріоушкоджень, можливість низькотемпературного зберігання. Суспензію клітин було обрано як класичний об'єкт регенеративної медицини, клітини в сфероїдах та на альгінатних носіях були обрані як тканиноінженерні структури, сформовані за допомогою міжклітинних зв'язків чи носія. Експланти, що являють собою відокремлені ворсини, розміром до 3 мм є природною структурою плаценти здатною до функціонування у чужорідному організмі.

На другому етапі дослідження оцінювали вплив нативних та кріоконсервованих похідних плаценти на ізольовані компоненти жіночої статевої системи та її регуляторні ланки *in vitro* для виключення їхнього взаємного впливу, дії регуляторних систем та компонентів сполучної тканини. Для дослідження були обрані культура нервових клітин, як елемент центральної регуляції, органотипові культури матки та яєчників, як основні органи мішені, спленоцити, як елемент імунної системи, культура клітин фібробластів для можливості вивчення дії на сполучну тканину органів. Культивування проводили зі середовищами, кондиційованими нативними та кріоконсервованими похідними плаценти.

На третьому етапі вивчали вплив похідних плаценти на перебіг експериментальної гінекологічної патології на моделях найбільш розповсюджених та соціально значущих захворювань. На інтактних тваринах було досліджено вплив похідних плаценти на структуру їх оваріального циклу та фертильність. Було обрано моделі найбільш розповсюдженої та соціально значущої гінекологічної патології: інфекційний процес, аутоімунний процес (антифосфоліпідний синдром (АФС)), ендокринна патологія (на прикладі синдрому полікістозних яєчників (СПКЯ)), травма та ішемія (перекрути яєчників, операційна травма), передчасне виснаження яєчників (на прикладі хіміотерапії (ХТ)).

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), відповідно до положень «Європейської Конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986).

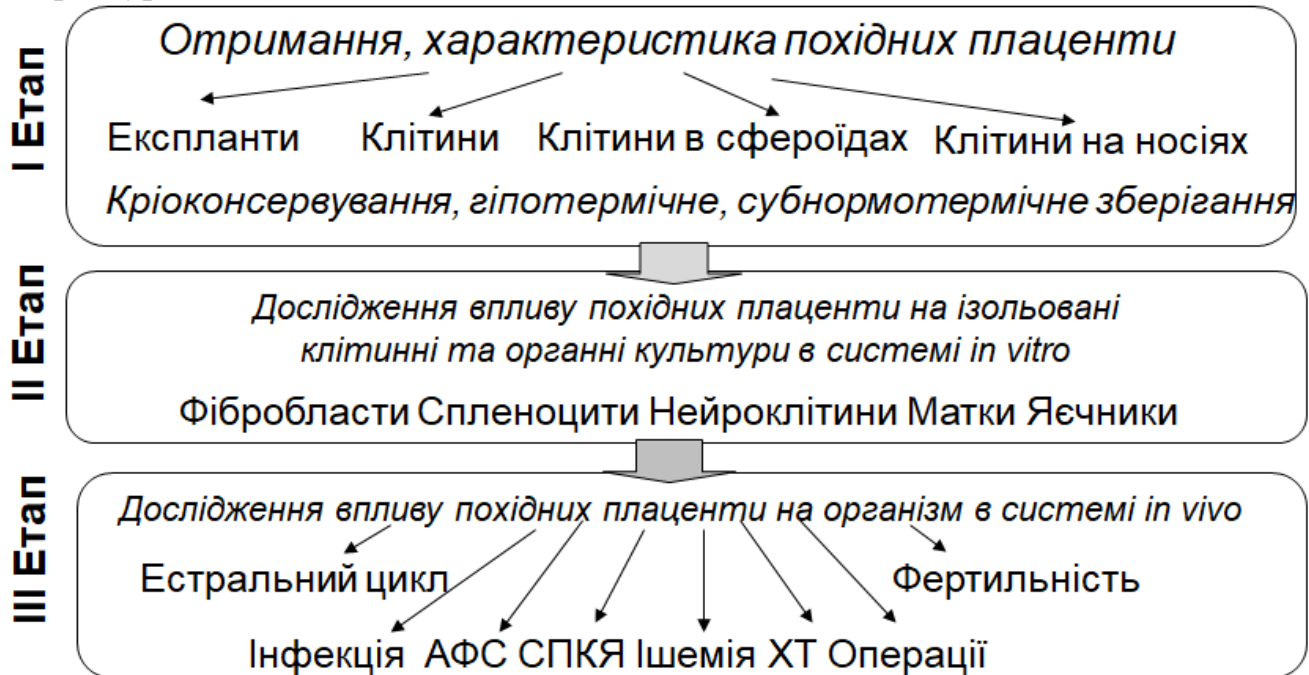


Рис.1. Дизайн дослідження.

Клітини отримували ферментативним методом (O. Parolini et al., 2008), експланти – методом фрагментації, сфероїди методом висячої краплі (R.A. Foty, 2011), альгінатні мікросфери методом інкапсуляції з хлористим кальцієм (A.I. Pravdyuk et al., 2013). Для кріоконсервування застосовували двохетапні програми, на першому етапі охолодження проводили зі швидкістю 1°C/хв до -80°C у ізопропополовому контейнері MrFrosty (Thermo Fisher, USA) чи за допомогою програмного заморожувача ЗП-10 (СКТБ ІПКіК НАН України), з подальшим зануренням у рідкий азот. У якості компонентів кріозахисних середовищ застосовували ДМСО, сахарозу, етіленгліколь, гліцерин, декстран (у формі Поліглюкіну), полівінілпіролідон (у формі Неогемодезу), гідроксиетилкрохмаль (у формі Стабізолу), сорбітол (у формі Реосорбілакту), середовище DMEM, сольові розчини, сироватку крові великої рогатої худоби. Використовували методи культивування, світлову, лазерну скануючу конфокальну мікроскопію, проточну цитометрію, кріомікроскопію, програмне заморожування, методи морфометрії, біохімічні методи (МТТ тест, тест відновлення резазурину, дослідження активності ферментів). У якості позитивного контролю використовували нативні похідні плаценти, у якості негативного – девіталізовані зануренням у рідкий азот.

Для досліджень в системі *in vitro* застосовували методи культивування клітин плаценти (O. Parolini et al., 2008), фібробластів (X. Luan et al., 2002), нейроклітин (A.N. Sukach et al., 2014), спленоцитів (O.B. Стефанов, 2001), органотипового культивування експлантів плаценти (R.K. Miller et al., 2005), маток та яєчників (Y. Yasuda et al., 1998). Глутаматну ексайтотоксичність моделювали за Kanno H, et al. 2014 з модифікаціями. Для оцінки впливу похідних плаценти

елементи статеві системи застосовували метод культивування в середовищах, кондіційованих біоб'єктами (J.A. Pawitan, 2014). Кондіційовані середовища, отримували, культивуючи похідні плаценти протягом доби в звичайній кількості середовища DMEM без додавання сироватки. Потім досліджувані об'єкти (фібробласти, нейроклітини, спленоцити, органотипові культури маток, яєчників) культивували протягом доби в отриманих середовищах та проводили оцінку їх морфофункціональних характеристик.

Для оцінки впливу похідних плаценти на репродуктивну систему в нормі застосовували самиць мишей лінії BALB/c, визначали репродуктивні показники та параметри естрального циклу, морфологічно оцінювали репродуктивні органи. Запалення моделювали на аутбредних мишах (перше покоління BALB/c та CBA) методом пункції та лігування сліпої кишки (D. Rittirsch et al., 2009). АФС у мишей BALB/c моделювали шляхом активної імунізації кардіоліпіновим антигеном (S. Velayuthaprabhu et al., 2007). СПКЯ моделювали на щурах лінії Wistar, введенням мефіпристону (A. Ruiz et al., 1996). Перекрут яєчників моделювали на щурах лінії Wistar тимчасовим накладанням лігатури (Taskin O. et al., 1998). Синдром передчасного виснаження яєчників моделювали введенням бусульфану та циклофосфаміду на мишах лінії BALB/c (G.Y. Xiao et al., 2014). Моделювання оперативного втручання на статевих органах проводили на щурах лінії Wistar, розсікаючи матку на протязі 1 см електрохірургічним пристроєм та зшиваючи вікриловим швом. Дози похідних плаценти розраховували за О.В Стефановим, 2004, спираючись на данні літератури (В.І. Грищенко та ін., 2011). Доза експлантів дорівнювала 10 мг на мишу, та 70 мг на щура.

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

Результати власних досліджень

Вплив факторів низькотемпературного зберігання на похідні плаценти.

При виділенні клітин ензиматичним методом з ворсин плаценти, плідних оболонок на нульовому та першому пасажі культура складається з поліморфних клітин, які на 3 пасажі набувають фібробластоподібної форми, адгезують до пластику, формують моношар у концентрації $2,5 \times 10^5$ клітин/см². При знятті з пластику клітини набувають округлої форми, розмір 20-25 мкм, мають нерівну поверхню. Клітини мають імунофенотип CD90+, CD73+, CD105+, CD34-, здатні до індукованого диференціювання в адипогенному, хондрогенному та остеогенному напрямку, що співпадає з даними літератури (O. Parolini et al., 2008).

При дослідженні суспензії клітин, після субнормотермічного зберігання

(+20°C) у середовищі культивування протягом доби відмічено, що клітини формують рихлі агрегати, розміром 50 - 200 мкм. Визначена можливість субнормотермічного зберігання клітин протягом 48 годин без вірогідної зміни показників їх збереженості, та протягом 72 годин з можливістю відновлення монослою. При гіпотермічному зберіганні (+4°C) клітини не адгезують між собою, та зберігаються до 24 годин, після чого відновлення культури не можливе (Табл. 1.).

Таблиця 1

Збереженість клітин плаценти в суспензії після короткочасного зберігання при субнормотермічних (+ 20°C) та гіпотермічних (+ 4°C) умовах (M±m, n=10)

Час зберігання	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
Субнормотермічне зберігання (+ 20°C)				
24 год	2,0±0,1	82,9±5,5	80,4±6,4	2
48 год	1,8±0,06	78,5±6,8	71,2±5,5	3
72 год	1,5±0,05*	69,3±5,4*	65,2±4,4*	4
96 год	1,2±0,03*	72,5±6,8*	60,5±5,8*	-
Гіпотермічне зберігання (+ 4°C)				
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 $p < 0,05$.

При кріоконсервуванні клітин за двохетапною програмою заморожування та різними кріопротекторами на базі середовища DMEM виявлено, що найбільш ефективним є застосування 10% ДМСО, пропандіолу чи етиленгліколю. Застосування гліцерину, сахарози чи інших концентрацій ДМСО призводить до втрати кількості клітин, чи їх життєздатності, але дозволяє відновити культуру клітин. З речовин, дозволених для клінічного використання, окрім пропандіолу, деякі кріопротекторні властивості мають розчин 6% полівінілпіролідону (Неогемодез) та 6% декстрану (Поліглюкін) проте їх при застосуванні кількість клітин, життєздатність та адгезивні властивості значно знижується. 6% сорбітол (Реосорбілакт) та 6% гідроксиетилкрахмаль (Стабізол) мають низькі кріопротекторні властивості. При заміні середовища DMEM на розчини Хенкса чи Рінгера спостерігається значна втрата клітин. Наявність сироватки в кріозахисному середовищі значним чином не впливає на результати кріоконсервування (Табл. 2.).

При вивченні режимів кріоконсервування визначено, що при охолодженні шляхом прямого занурення у рідкий азот кількість клітин знижується, спостерігається загибель клітин. Визначено, що для збереження культури при кріоконсервуванні з 10% ДМСО в середовищі культивування необхідно проводити

повільне охолодження до температури не вище -40°C , що дає можливість використовувати для кріоконсервування холодильну техніку, яка є на устаткуванні багатьох лікарень.

Таблиця 2

Збереженість клітин плаценти в суспензії після кріоконсервування з різними кріозахисними середовищами ($M \pm m$, $n=10$)

Склад кріозахисного середовища	Кількість клітин $\times 10^5/\text{мл}$	% збереженості за трипановим синім	7 AAD+, %	МТТ, Од ОЩ	% адгезованих клітин	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 DMEM	$5,8 \pm 0,4$	$95,2 \pm 3,8$	$16,5 \pm 0,9^*$	$0,887 \pm 0,07$	$89,5 \pm 5,6$	2
1,2 пропандіол 11,4% DMEM	$6,0 \pm 0,7$	$94,7 \pm 5,6$	$20,3 \pm 2,1^*$	$0,989 \pm 0,1$	$65,8 \pm 7,6^*$	3
Сахароза 6,8% +DMEM	$5,7 \pm 0,3$	$58,4 \pm 3,6^*$	$65,7 \pm 5,8^*$	$0,546 \pm 0,04^*$	$59,5 \pm 4,5^*$	5
Етиленгліколь 9,3% +DMEM	$4,1 \pm 0,2^*$	$85,6 \pm 7,8$	$18,6 \pm 3,0^*$	$1,013 \pm 0,09^*$	$66,5 \pm 5,4^*$	3
Глицерин 13,8% +DMEM	$5,8 \pm 0,3$	$83,4 \pm 5,7$	$45,9 \pm 3,6^*$	$0,539 \pm 0,04^*$	$42,5 \pm 3,8^*$	4
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
10% ДМСО+ DMEM (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
Розчин Хенкса +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
Розчин Рингера + 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
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 позитивним контролем $p < 0,05$

При повторному заморожуванні клітин плаценти було виявлено, що

кількість клітин знижується вдвічі, життєздатність дорівнює $81,2 \pm 8,3\%$ за даними забарвлення трипановим синім, та $36,3 \pm 3,8\%$ при вивченні методом цитометрії з 7AAD. Активність за даними МТТ тесту становить $0,923 \pm 0,09$, адгезували близько 50% клітин та моношар утворювався на 3-4-у добу.

При кріомікроскопічному дослідженні суспензії клітин (рис. 2) зниження температури зі швидкістю $1^\circ\text{C}/\text{хв}$ призводить до швидкого утворення великої кількості дрібних кристалів при -11°C розміром $1,4 \pm 0,12$ мкм з каналами між ними. При подальшому охолодженні кристали зливаються, канали звужуються максимально при -50°C ... -60°C , подальше охолодження не приводить до візуальних змін. Виявлено два типи кристалів: великі - в міжклітинному просторі та невеликі, розташовані навколо клітин. При температурі -100°C в міжклітинному просторі спостерігаються великі кристали з довжиною $11,8 \pm 2,4$ мкм і $33,0 \pm 11,2$ мкм, а навколо клітин розташовуються дрібні - $5,6 \pm 1,6$ мкм. При нагріванні зразка плавлення кристалів візуально спостерігається починаючи з -60°C , та закінчується при температурі близько 7°C з явищами злиття крупних кристалів.

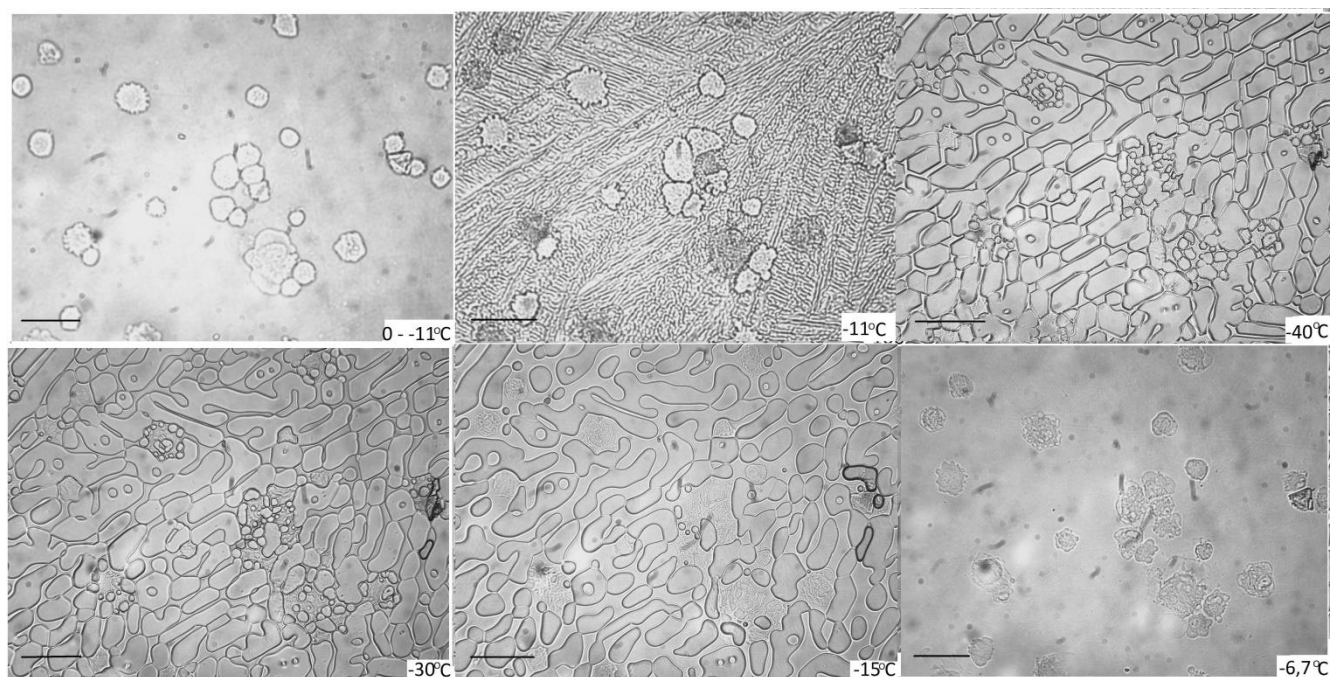


Рис. 2. Суспензія клітин плаценти при кріоконсервуванні, кріомікроскопічне дослідження. Верхній рядок – охолодження, нижній рядок – відігрів. Температура позначена на кожному рисунку в $^\circ\text{C}$. Масштабна лінійка 50 мкм.

При дослідженні впливу коливань температур в кріосховищах, що спостерігаються при довгостроковому зберіганні, на клітини плаценти визначено наступне. При коливанні температур у межах -196°C - -80°C кількість клітин вірогідно знижується після 50 циклів коливань, збереженість за трипановим синім – після 20 циклів, збереженість за пропідієм йодідом – після 10 циклів, показники МТТ тесту знижуються після 5 циклів. При коливанні температур в межах -196°C - -100°C кількість клітин вірогідно знижується після 50 циклів коливань, збереженість за трипановим синім – після 40 циклів, збереженість за пропідієм

йодідом – після 30 циклів, показники МТТ тесту - після 40 циклів. При коливанні температур в межах -196°C - -150°C кількість клітин вірогідно знижується після 50 циклів коливань, збереженість за трипановим синім – після 40 циклів, збереженість за пропідієм йодідом – після 40 циклів, показники МТТ тесту не знижуються. Суттєві апоптотичні зміни, виявлені методом проточної цитметрії за експресією Annexin V на поверхні клітин характерні для коливань в межах -80°C , -100°C , але не -150°C .

Експланти плаценти являють собою відокремлені ворсини. Вони є перспективним об'єктом для кріоконсервування, субнормотермічного та гіпотермічного зберігання, оскільки пристосовані до існування у рідкому середовищі, мають невеликі розміри, що дозволяє проводити органотипове культивування без явищ центрального некрозу, рихлу мезенхіму (сполучну тканину) та вкриті шаром трофобласту, що робить їх проникними для кріопротектору та менш чутливими до формування кристалів льоду.

При субнормотермічних умовах продемонстрована можливість зберігання експлантів плаценти протягом 48 годин. На відміну від субнормотермічного зберігання клітин плаценти, експланти зберігають метаболічну активність, яка відрізняється від негативного контролю протягом 96 годин. При гіпотермічних умовах можливе збереження експлантів плаценти протягом 24 годин (табл. 3.).

Таблиця 3

Характеристика експлантів плаценти після низькотемпературного зберігання ($M \pm m$, $n=10$)

Час зберігання	МТТ тест (Од ОЦ)	Тест відновлення резазурину (% зменшення абсорбції)	Глюкоза (Ммоль/л)
Контроль			
Позитивний	$3,2 \pm 0,31$	$59,2 \pm 5,2$	$1,95 \pm 0,25$
Негативний	$0,2 \pm 0,1$	$4,3 \pm 0,25$	$2,4 \pm 0,2$
Субнормотермічне зберігання ($+ 20^{\circ}\text{C}$)			
24 год	$3,0 \pm 0,41$	$58,2 \pm 0,24$	$2,0 \pm 0,28$
48 год	$2,9 \pm 0,28$	$55,3 \pm 0,49$	$2,1 \pm 0,21$
72 год	$2,5 \pm 0,24^*$	$40,2 \pm 0,43^*$	$2,2 \pm 0,19^*$
96 год	$1,2 \pm 0,34^*$	$20,2 \pm 0,91^*$	$2,3 \pm 0,4^*$
Гіпотермічне зберігання ($+ 4^{\circ}\text{C}$)			
24 год	$2,6 \pm 0,28^*$	$45,3 \pm 0,51^*$	$2,0 \pm 0,15$
48 год	$1,5 \pm 0,32^*$	$21,2 \pm 0,34^*$	$2,2 \pm 0,23^*$
72 год	$0,5 \pm 0,25^*$	$6,2 \pm 0,23^*$	$2,3 \pm 0,21^*$
Кріоконсервування (-196°C)			
	$3,3 \pm 0,25$	$43,4 \pm 3,8^*$	$2,1 \pm 0,18$

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

При кріоконсервуванні експлантів плаценти в середовищі DMEM з 10% ДМСО за двохетапною програмою (повільно до -80°C з наступним зануренням у

рідкий азот) визначено, що типовими ушкодженнями є розриви мезінхіми та десквамація трофобласту, які візуалізуються при забарвленні гематоксилін-еозином, а при забарвленні трипановим синім виявляються затікання барвника в середину ворсин. При забарвленні FDA/EB лише окремі клітини накопичують EB, більшість препарату забарвлена FDA. Зразки, безпосередньо занурені у рідкий азот набувають ознак руйнації (рис. 2). Біохімічні показники в деконсервованих зразках мало відрізняються від показників в нативних експлантах (табл. 3.).

При проведенні кріомікроскопічного дослідження виявлено, що при відігріванні спостерігається злиття (рекристалізація) невеликих кристалів на поверхні та в середині експлантів. Кінцеві розміри цих кристалів співпадають з розмірами розривів мезенхіми, таким чином вони можуть бути основним чинником ушкодження експлантів плаценти (рис. 4).

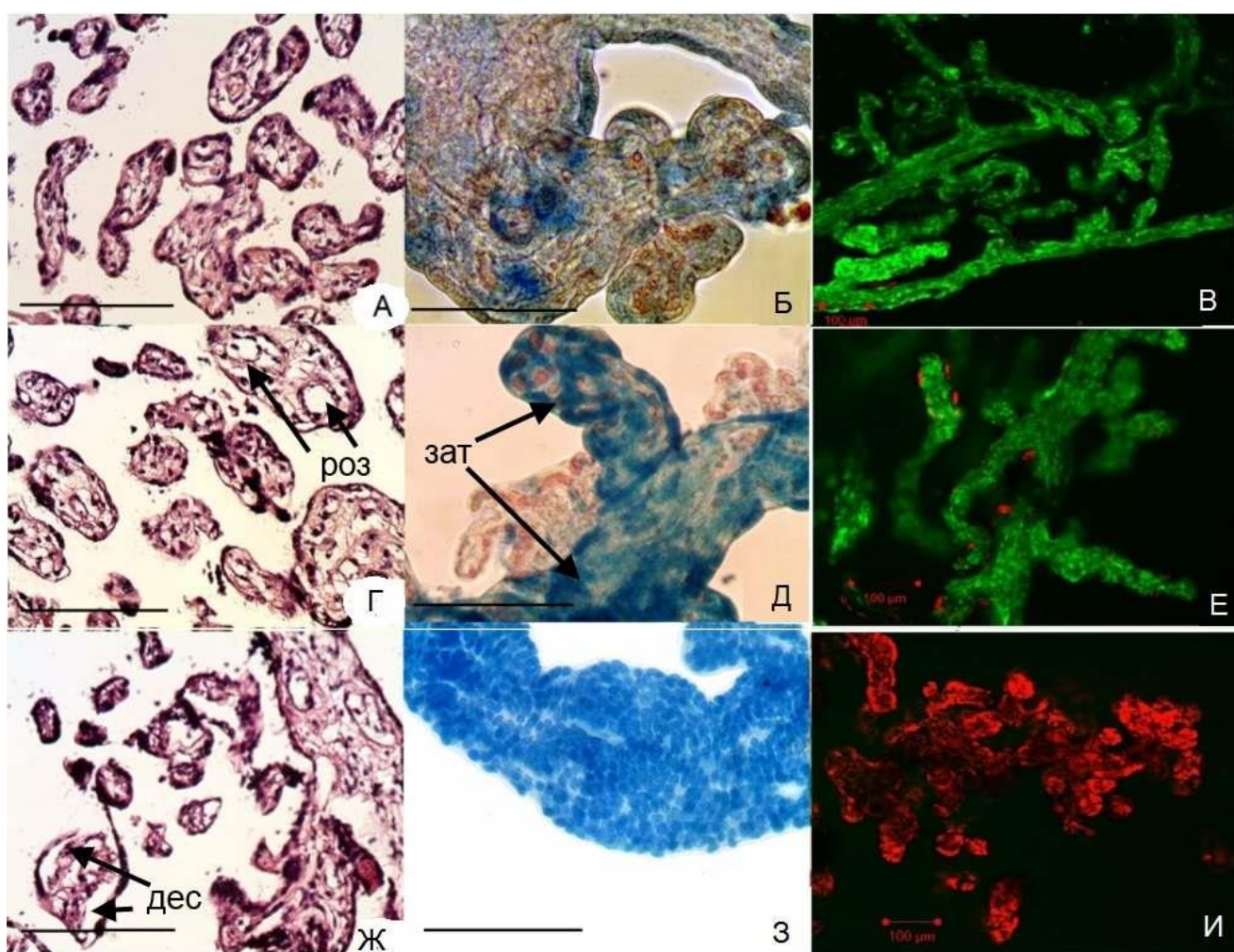


Рис. 3. Експланти плаценти. А, Б, В – нативні, Г, Д, Е – після кріоконсервування, Ж, З, И – негативний контроль, після занурення у рідкий азот. А, Г, Ж – забарвлення гематоксилін-еозином, зрізи, світлова мікроскопія, Б, Д, З – забарвлення трипановим синім, нативний препарат, світлова мікроскопія, В, Е, И – забарвлення FDA/EB нативний препарат, лазерна скануюча конфокальна мікроскопія. Роз – розриви мезенхіми, дес – десквамація трофобласту, зат – затікання барвнику в ворсину. Масштабні лінійки - 100 мкм.

При отриманні сфероїдів методом висячої краплі з 1×10^6 клітин отримано

825,3±56,2 сфероїдів розміром 50-150 мкм та 62,3±5,1 сфероїдів розміром 150-300 мкм, сферичної форми (рис. 5, А) та не забарвлюються трипановим синім. Сфероїди мають здатність адгезувати до пластику та формувати моношар, механічно руйнуються при повторних процедурах відмивання з центрифугуванням.

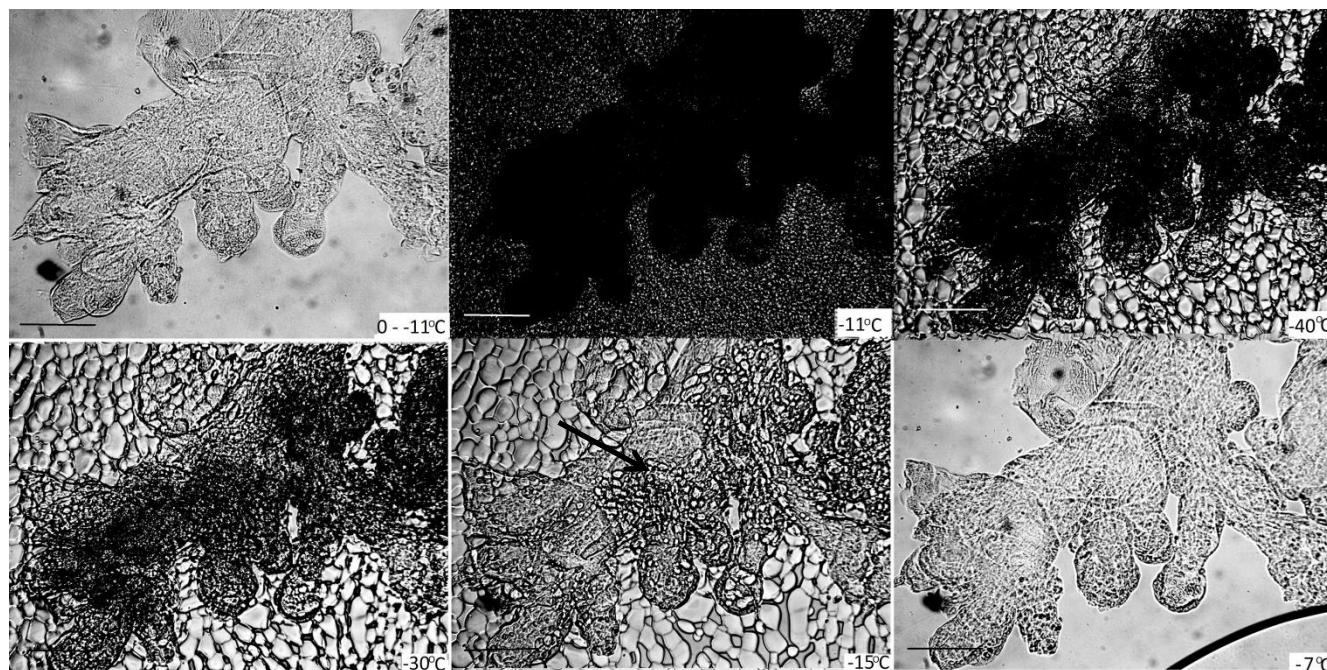


Рис. 4. Експланти плаценти при кріоконсервуванні, кріомікроскопічне дослідження. Верхній рядок – охолодження, нижній – відігрів. Температура позначена на кожному рисунку в °С. Стрілка – збільшенні кристали льоду. Масштабна лінійка 50 мкм.

При короткочасному зберіганні сфероїдів визначена можливість субнормотермічного зберігання не більше 24 годин без вірогідної втрати кількості та метаболічної активності, але з деякою втратою міжклітинної адгезії (табл. 4., рис. 5, Б). При застосуванні гіпотермічних умов не можливе зберігання довше доби через розпад сфероїдів на окремі клітини (табл. 4.)

При кріоконсервуванні за описаною раніше двохетапною програмою з DMEM та 10% ДМСО спостерігається відокремлення клітин, втрата міжклітинної адгезії (рис. 5, В), загибель окремих клітин, розташованих у зовнішніх шарах сфероїдів (рис. 5, Е). Кількість сфероїдів зменшується, метаболічна активність не відрізняється від контрольної, що може свідчити про збереженість більшості клітин, що після їх відокремлення від сфероїдів (табл. 4.).

При проведенні кріомікроскопічного дослідження (рис. 6) найбільше ушкодження спостерігається при розморожуванні, зростання кристалів при рекристалізації відбувається при -20 - -15°C. Після розморожування структура сфероїдів значно змінюється, спостерігається деформація 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 залишаються збереженими.

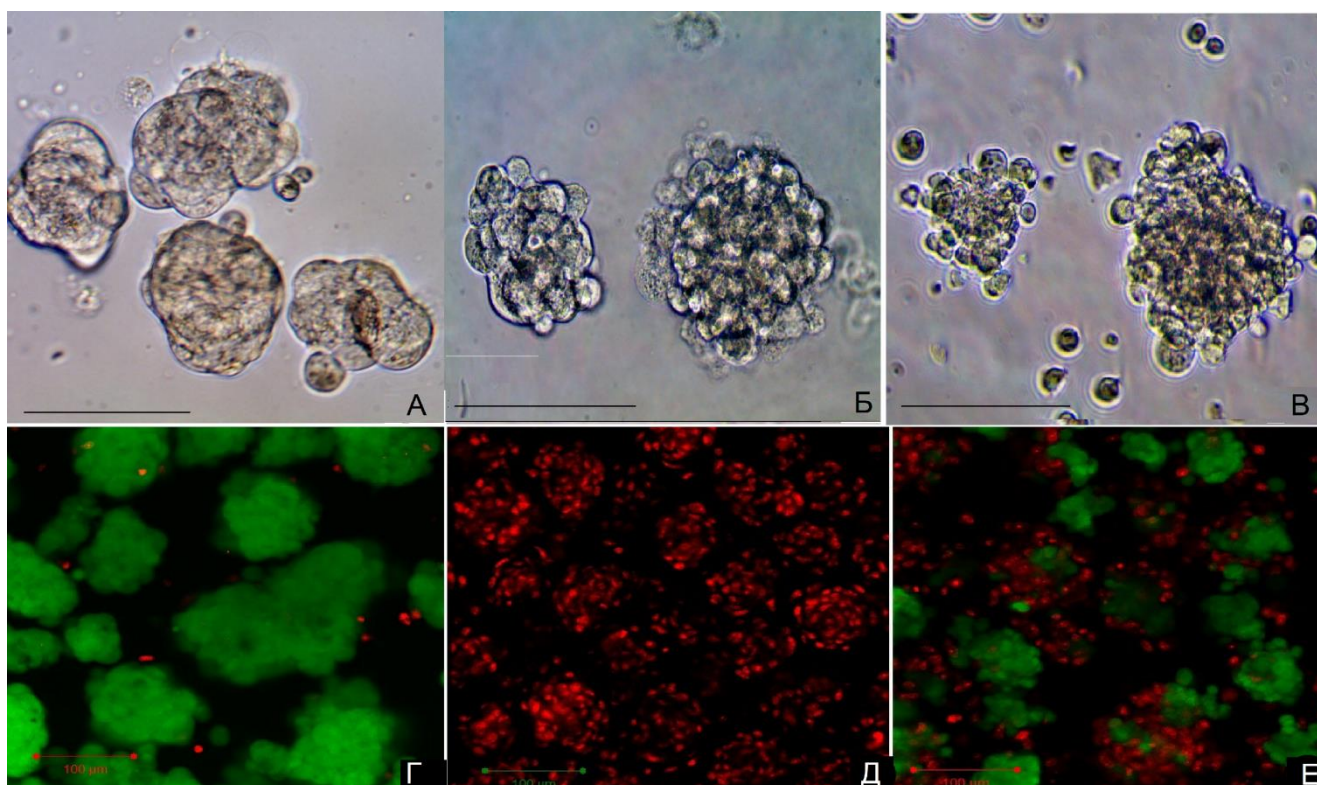


Рис. 5. Сфероїди з клітин плаценти. А, Г – після отримання методом вісячої краплі, Б – після субнормотермічного зберігання, В, Е – після кріоконсервування, Д – негативний контроль. А - В – світлова мікроскопія, фазовий контраст, Г - Е – конфокальна мікроскопія, забарвлення FDA/EB. Масштабні лінійки 100 мкм.

Таблиця 4

Характеристика сфероїдів з клітин плаценти після низькотемпературного зберігання ($M \pm m$, $n=10$)

Час зберігання	Кількість сфероїдів	МТТ тест (Од ОЦ)	Тест відновлення резазурину (% зменшення абсорбції)
Контроль	862,2 $\pm$ 32,5	2,0 $\pm$ 0,05	62,3 $\pm$ 3,5
Субнормотермічне зберігання (+ 20°C)			
24 год	725,8 $\pm$ 28,3	2,1 $\pm$ 0,08	57,8 $\pm$ 4,3
48 год	545,3 $\pm$ 17,2*	1,8 $\pm$ 0,03*	55,4 $\pm$ 2,9*
72 год	458,6 $\pm$ 20,9*	1,2 $\pm$ 0,12*	39,5 $\pm$ 3,8*
96 год	332,1 $\pm$ 18,2*	1,0 $\pm$ 0,07*	18,7 $\pm$ 1,7*
Гіпотермічне зберігання (+ 4°C)			
24 год	550,9 $\pm$ 26,7*	1,8 $\pm$ 0,09*	52,1 $\pm$ 4,1*
48 год	423,6 $\pm$ 17,6*	1,3 $\pm$ 0,07*	30,9 $\pm$ 2,1*
72 год	259,8 $\pm$ 10,2*	0,6 $\pm$ 0,06*	24,6 $\pm$ 1,9*
Кріоконсервування (-196°C)			
	453,7 $\pm$ 32,5*	1,9 $\pm$ 0,08	58,2 $\pm$ 2,1

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

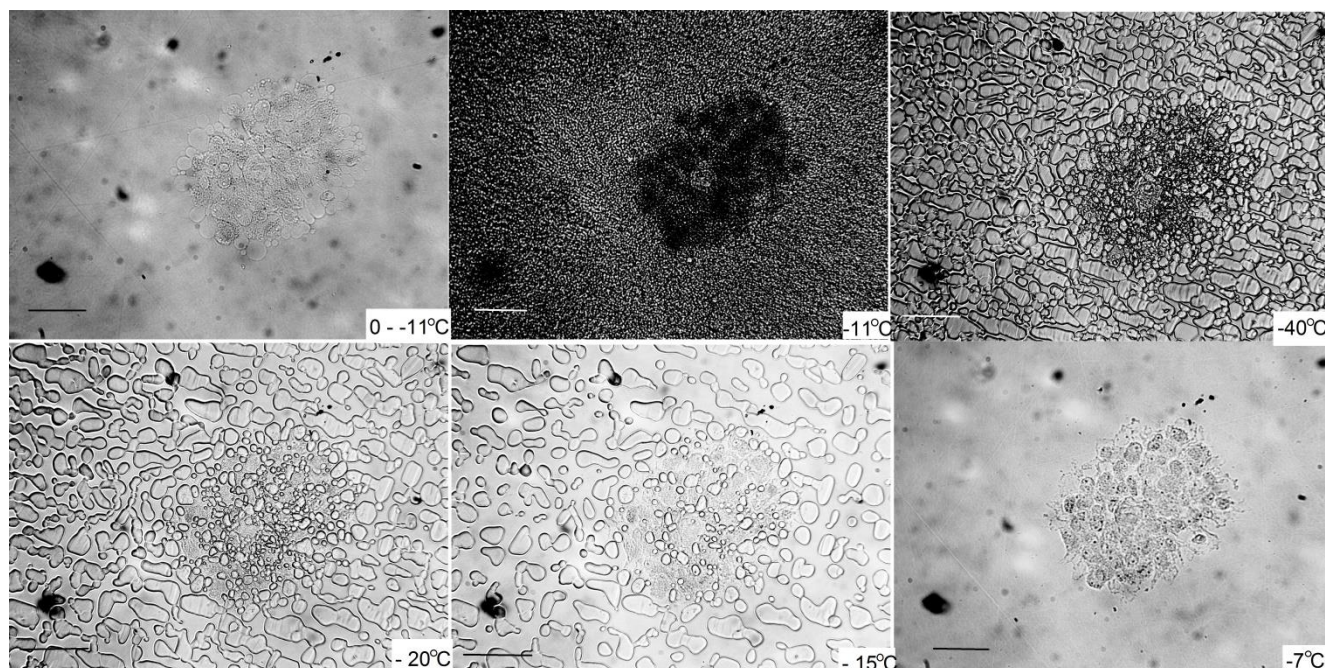


Рис. 6. Сфероїди з клітин плаценти при кріоконсервуванні, кріомікроскопічне дослідження. Верхній рядок – охолодження, нижній – відігрів. Температура позначена на кожному рисунку в °С. Масштабна лінійка 50 мкм.

При інкапсуляції *клітин плаценти у альгінаті натрію* з в концентрації 10^6 /мл з використанням хлористого кальцію отримано мікросфери діаметром 1,5 – 2,0 мм з клітинами плаценти, які знаходилися в окремих комірцях, що розподілені рівномірно (рис. 7, А, Б, В).

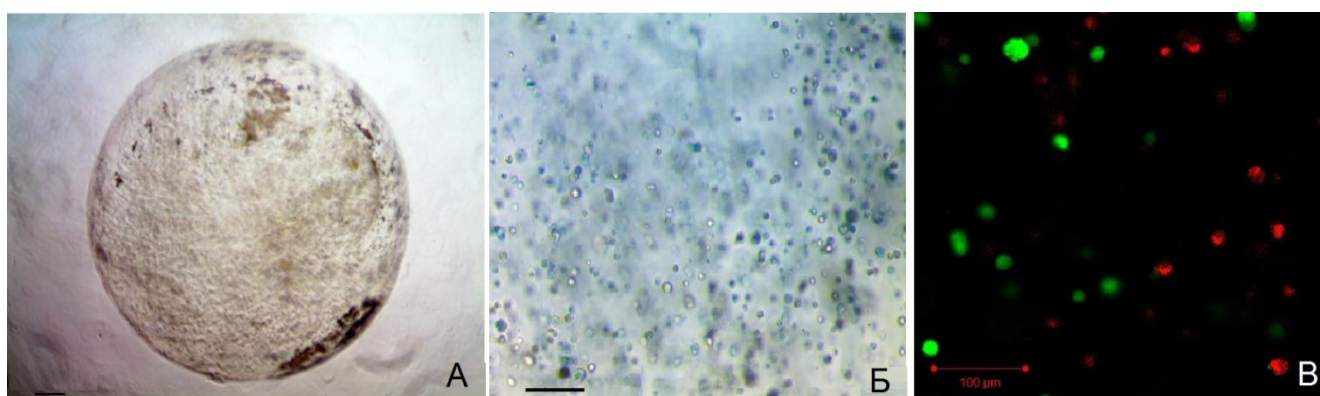


Рис. 7. Клітини плаценти в альгінатних мікросферах. А, В – світлова мікроскопія, С – конфокальна мікроскопія з забарвленням FDA/EB. Масштабні лінійки 100 мкм.

При субнормотермічному зберіганні за даними тесту відновлення резаурину та тесту споживання глюкози клітини плаценти, інкапсульовані в альгінатні мікросфери залишаються збереженими протягом 48 годин, а після 72 годин споживання глюкози та метаболічна активність різко знижуються. При

гіпотермічному зберіганні ці показники не відрізняються від контролю до 24 годин (табл. 5).

Після кріоконсервування клітин плаценти в альгінатних сферах їх метаболічна активність за тестом відновлення резазурину вірогідно не відрізняється від контролю, втім кількість життєздатних клітин, за даними конфокальної мікроскопії при забарвленні FDA знижується з $95,3 \pm 2,1\%$ до $67,3 \pm 5,3\%$. Причини цього виявлені при подальшому кріомікроскопічному дослідженні. Так, при охолодженні альгінатних структур з клітинами плаценти, у середовищі з DMEM та 10% ДМСО спостерігається утворення двох типів кристалів: великих, розмірами до $137,9 \pm 42,2$ мкм, які займають до 75 % площі та малих, розміром до $2,6 \pm 0,38$ мкм. При розморожуванні найбільш ураженими є саме клітини, що розташовуються на межі великих кристалів (рис. 8).

Таблиця 5

Характеристика альгінатних мікросфер з клітин плаценти після зберігання при субнормотермічних (+ 20°C) та гіпотермічних (+ 4°C) умовах ($M \pm m$, $n=10$)

Термін зберігання	Тест відновлення резазурину (% зменшення абсорбції)	Тест споживання глюкози (мМоль/л)
Контроль	$53,2 \pm 2,8$	$1,8 \pm 0,12$
Субнормотермічне зберігання (+ 20°C)		
24 год	$50,6 \pm 3,2$	$1,7 \pm 0,25$
48 год	$48,3 \pm 2,5$	$2,1 \pm 0,18$
72 год	$32,5 \pm 4,1^*$	$2,4 \pm 0,16^*$
96 год	$13,9 \pm 3,4^*$	$2,5 \pm 0,08^*$
Гіпотермічне зберігання (+ 4°C)		
24 год	$47,3 \pm 2,4$	$2,0 \pm 1,5$
48 год	$30,2 \pm 3,8^*$	$2,3 \pm 0,10^*$
72 год	$12,9 \pm 2,1^*$	$2,5 \pm 0,07^*$

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

При охолодженні альгінатних сфер без ДМСО кристалоутворення інше – кристали мають однакову форму, розмір $45,3 \pm 23,2$ мкм. Подібні зміни можуть бути пов'язані зі взаємодією кріопротектору з альгінатом, перерозподілом ДМСО в альгінаті. Було також виявлено, що розчини альгінату желуються при взаємодії з ДМСО в концентраціях 10% та вище, отримані таким чином мікросфери також розчиняються у присутності етилендіамінтетрауксусної кислоти, як і сфери, отримані у розчині хлориду кальцію, що може свідчити про хелатну природу взаємодії.

Враховуючи отримані данні, щодо стабільності морфофункціональних характеристик та можливості ефективного низькотемпературного збереження для подальшого дослідження були обрані суспензія клітин та експланти, як найбільш перспективні для застосування у медичній практиці.

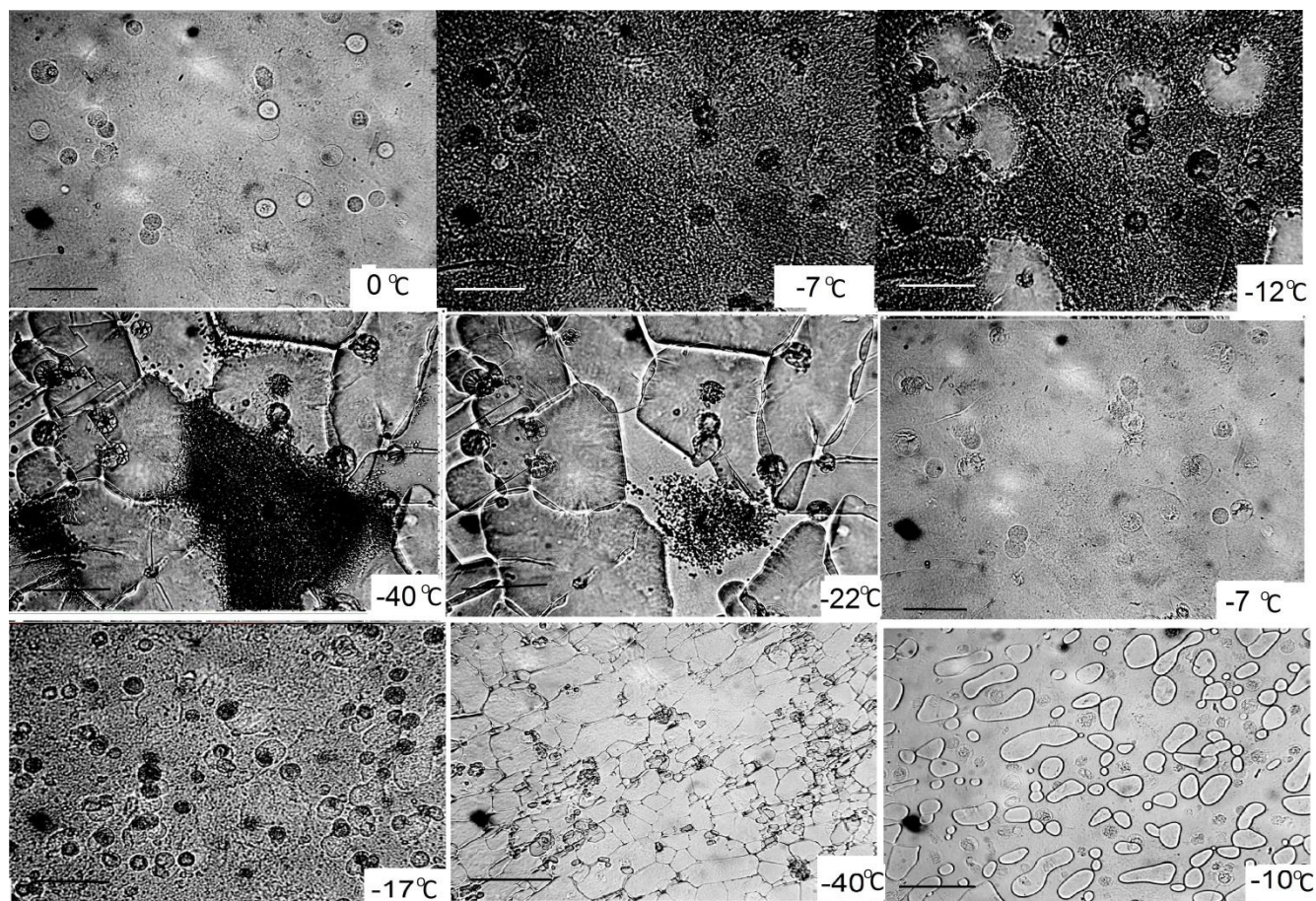


Рис. 8. Клітини плаценти в альгінаті при кріоконсервуванні, кріомікроскопічне дослідження. Верхній рядок – охолодження, середній – відігрів (середовище з ДМСО), нижній – кріоконсервування без ДМСО. Температура позначена на кожному рисунку в °С. Масштабна лінійка 50 мкм.

Вплив нативних та кріоконсервованих похідних плаценти на ізольовані компоненти жіночої статеві системи *in vitro*.

При дослідженні впливу середовищ, кондиційованих нативними та кріоконсервованими похідними плаценти на культуру фібробластів миші виявлено, що середовища, кондиційовані нативними клітинами плаценти (КП), кріоконсервованими клітинами плаценти (ККП), нативними експлантатами плаценти (ЕП), кріоконсервованими експлантатами плаценти (КЕП) не впливають на проліферативну активність (рис. 9, А) та не змінюють показники МТТ тесту (рис. 9, Б).

При культивуванні спленоцитів з середовищами, кондиційованими КП, ККП, ЕП, КЕП виявлено, що всі досліджувані об'єкти знижують їх метаболічну активність (рис. 10, А). При цьому, дія кріоконсервованих експлантів плаценти більш виражена, ніж нативних. При постановці реакції бласттрансформації лімфоцитів (РБТЛ) виявлено зниження трансформації клітин в бластні форми після дії середовищ, кондиційованих похідними плаценти (рис. 10, Б).

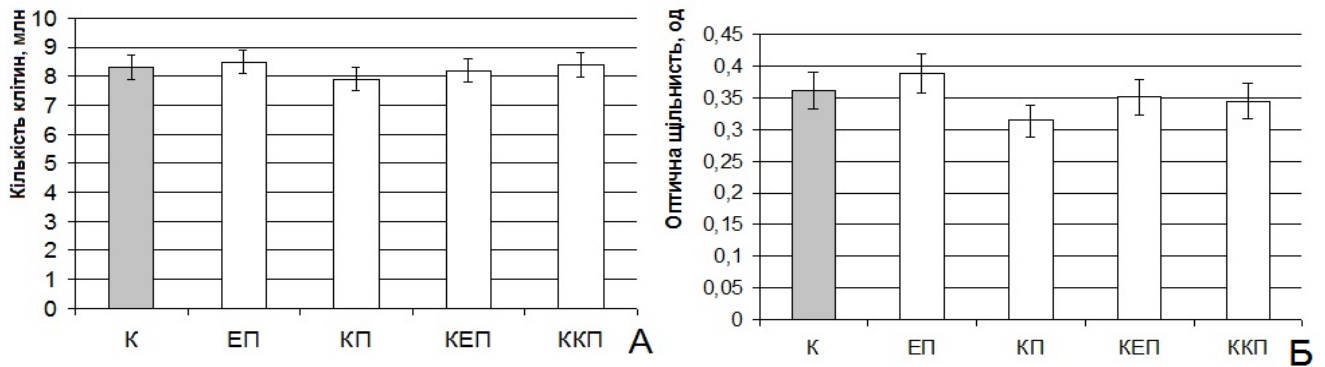


Рис. 9. Показники функціональної активності фібробластів при культивуванні з середовищами, кондиційованими похідними плаценти: А – кількість клітин, Б - МТТ тест. $n=24$. К – контроль.

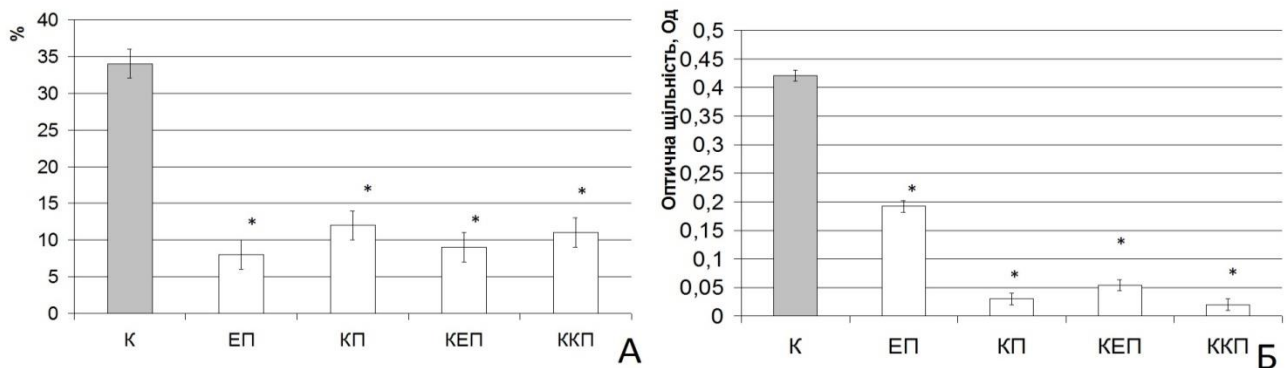


Рис. 10. Показники функціональної активності спленоцитів при культивуванні в середовищах, кондиційованих похідними плаценти: А – РБТЛ, Б - МТТ тест. К – контроль. $n = 24$. *- вірогідність різниці з контролем $p < 0,05$.

При вивченні впливу середовищ, кондиційованих КП та ККП на *нейроклітини* продемонстровано підвищення показників МТТ тесту після культивування з середовищами, кондиційованими КП та ККП (рис. 11, А). Нейропротекторний ефект обох типів середовищ доведено в моделі глутаматної ексайтотоксичності. При цьому нейропротекторна активність середовищ вище за умов їх застосування до ураження нейроклітин глутаматом (рис.11, Б, В).

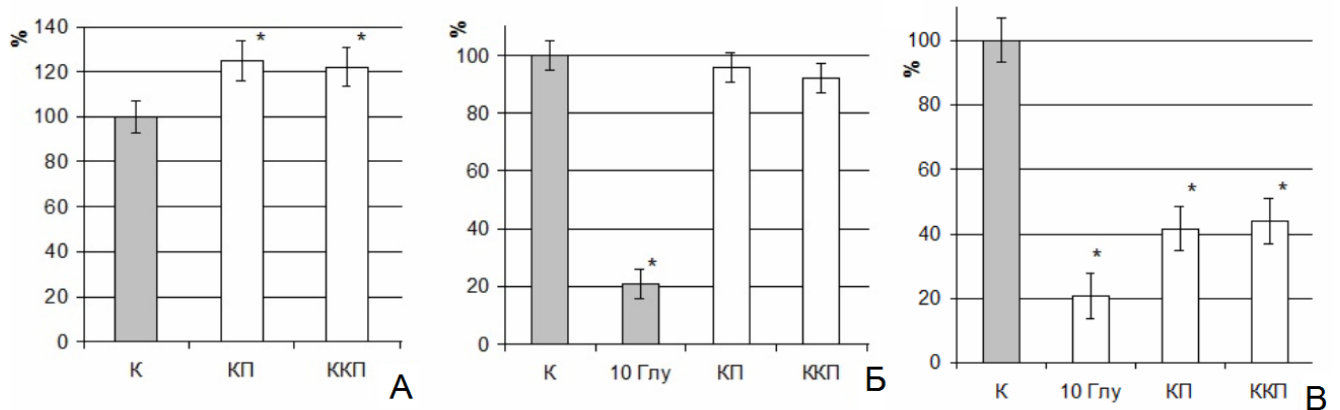


Рис. 11. Показники МТТ тесту нейроклітин при культивуванні зі середовищами, кондиційованими з клітинами плаценти. А – без дії глутамату, Б – до дії глутамату, В – після дії глутамату. К – контроль, 10Глу – додавання 10 мМоль глутамату. $n=24$. *- вірогідність різниці з позитивним контролем $p < 0,05$.

При морфологічному дослідженні *органотипової культури яєчників*, які короткочасно культивували в середовищі, без похідних плаценти спостерігається збереженість загальної структури органу, але з явищами гіпергідратації та розривів в стромі та воротах. Збереженими є жовті тіла та примордіальні фолікули, зміни виявлено у вторинних та третинних фолікулах – яйцеклітини з ознаками руйнування, клітини гранульози відділенні від теки (рис. 12, Б). Структура яєчників тварин, що культивували з додаванням середовищ, кондиційованих похідними плаценти зберігається, з ознаками незначною гіпергідратацією, без розривів тканини. У фолікулах - типове розташування теки та гранульози, частина яйцеклітин не візуалізується, жовті тіла збережені, клітини з гіперхромією ядер (рис. 12, В, Г). Метаболічна активність яєчників після культивування з середовищами, кондиційованими похідними плаценти знижується (рис. 13, А). Визначена подібність дії ЕП, КЕП, КП та ККП.

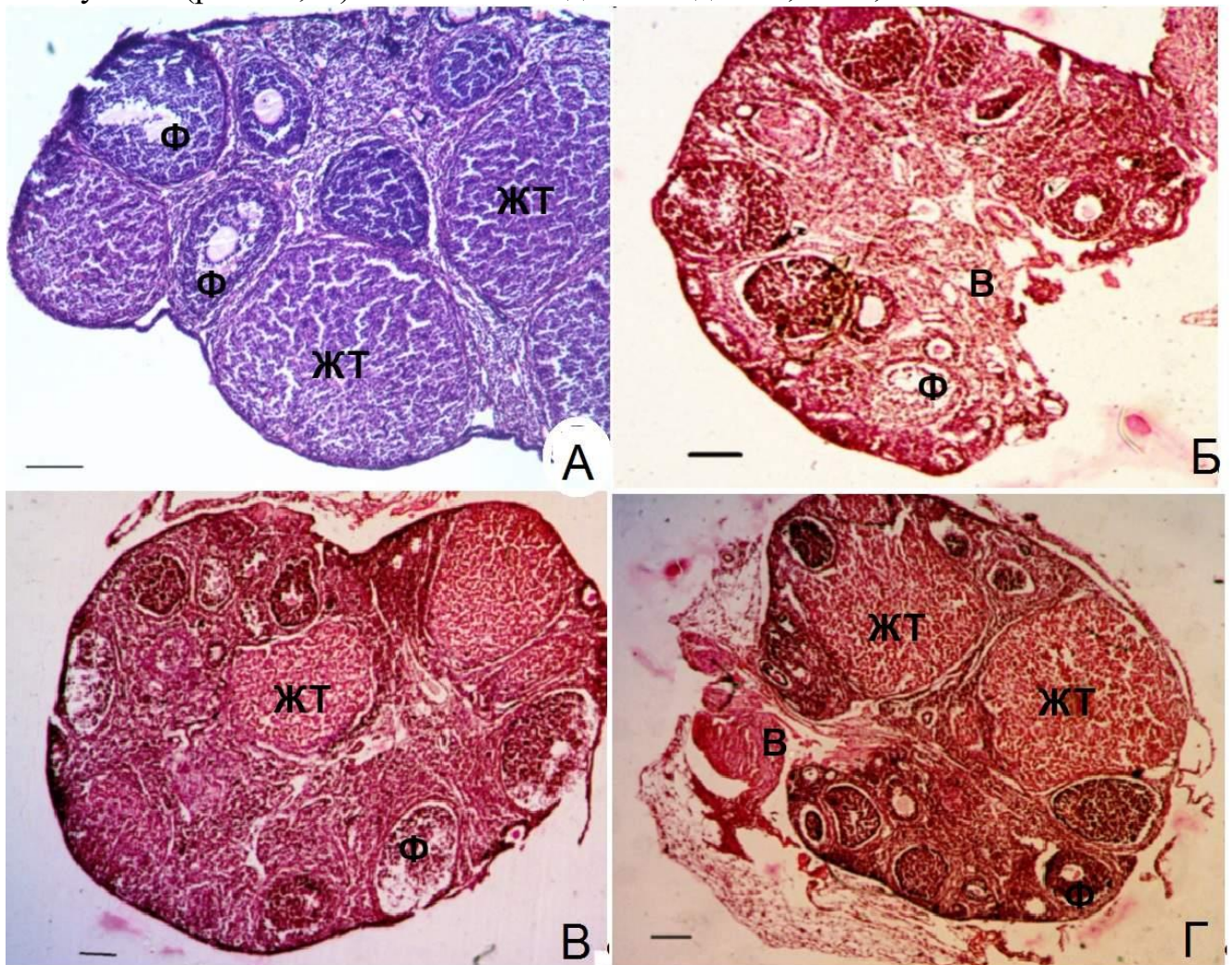


Рис. 12. Яєчники миші після культивування. А– до культивування, Б – без додавання кондиційованих середовищ, В – з середовищем, кондиційованим ККП, Г - з середовищем, кондиційованим КЕП. ЖТ – жовте тіло, Ф – фолікул, В – ворота яєчника. Забарвлення гематоксилін-еозин. Масштабні лінійки 100 мкм.

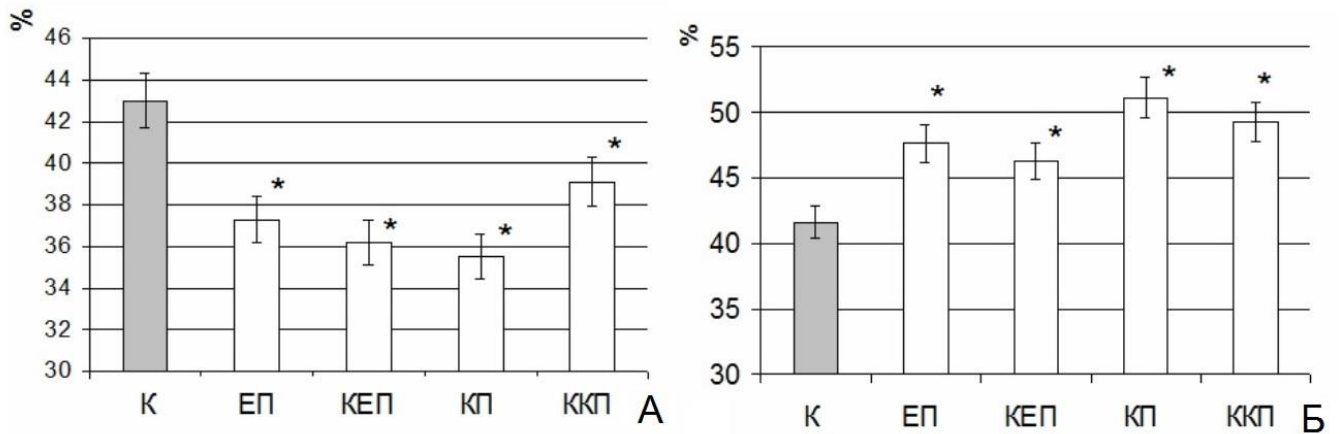


Рис. 13. Показники метаболічної активності яєчників (А) та маток (Б) мишей за даними тесту відновлення резазурину після культивування з середовищами, кондиційованими похідними плаценти. $n=6$. К – контроль, *- вірогідність різниць з позитивним контролем $p<0,05$.

При дослідженні *органотипових культур маток*, без додавання середовищ, кондиційованих похідними плаценти загальна структура зберігається, розміри органу, співвідношення ендометрію, міометрію та серози, але спостерігаються ознаки гіпергідратації, клітини більш округлої форми, ядра зменшені та гіперхромні (рис. 14, Б).

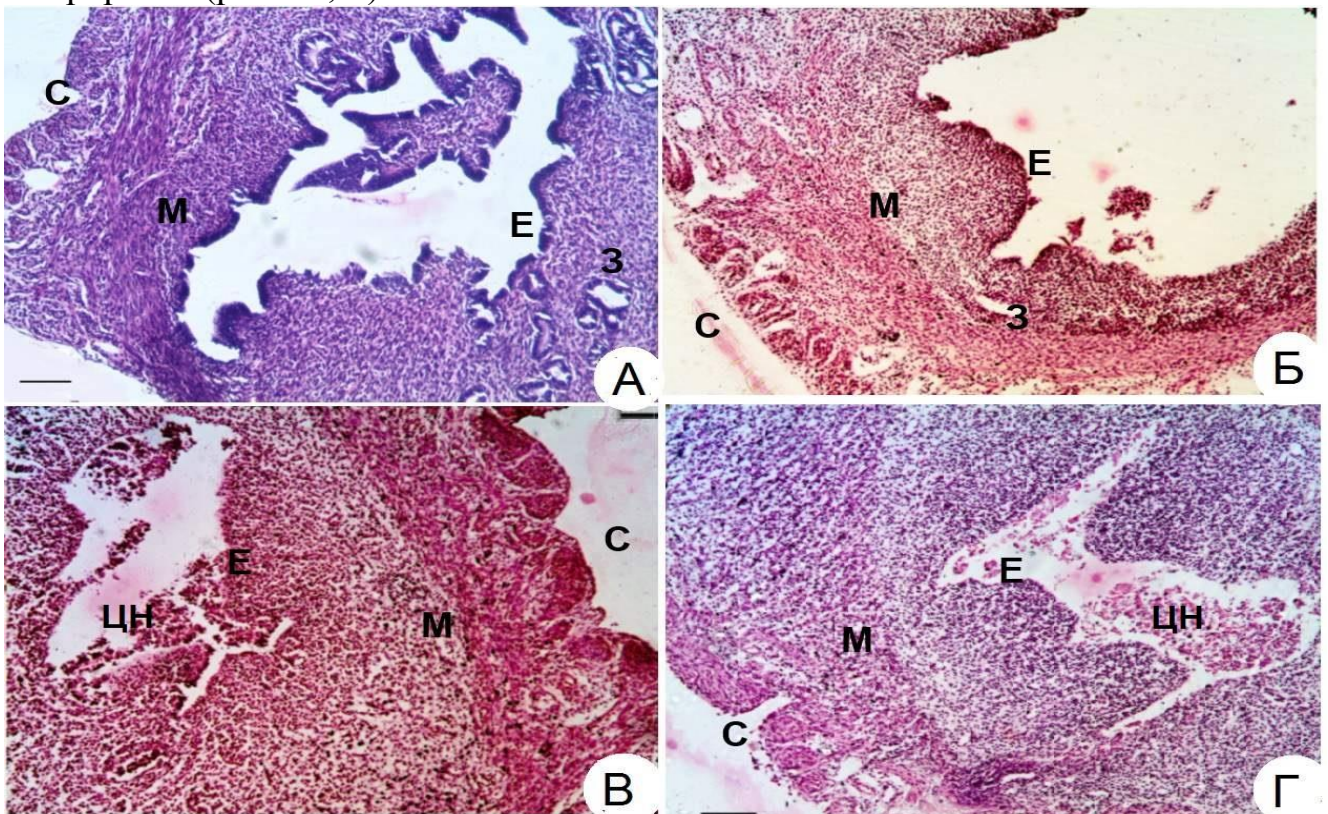


Рис. 14. Матки миші після культивування. А – до культивування, Б – без додавання кондиційованих середовищ, В – з середовищем, кондиційованим ККП, Г - з середовищем, кондиційованим КЕП. Е – ендометрій, М – міометрій, С – сероза, З – залози, ЦН – центральний некроз. Забарвлення гематоксилін-еозин. Масштабні лінійки 100 мкм.

При органотиповому культивуванні в середовищах, кондиційованих ЕП, КЕП, КП, ККП зміни схожі (рис. 14, В, Г): шари матки чітко не відокремлені один від одного, помітні явища центрального некрозу. Показники тесту відновлення резазурину для органотипових культур маток, які культивували з середовищами, кондиційованими з нативними та кріоконсервованими похідними плаценти вірогідно відрізняються від контролю, за рахунок більшої метаболічної активності (рис. 13, Б).

Стимулюючий вплив плаценти та її похідних на матку та пригнічуючий на яєчники є природним, та необхідним для забезпечення процесів вагітності.

Враховуючи встановлену високу біологічну активність кріоконсервованих експлантів плаценти в системі *in vitro*, можливість їх отримання без застосування складних технологій, наявність в них всіх складових плаценти, високу збереженість при кріоконсервуванні їх було обрано для подальших експериментальних досліджень *in vivo*.

Біологічна дія кріоконсервованих похідних плаценти на організм лабораторних тварин в нормі та при експериментальній гінекологічній патології.

При дослідженні впливу КЕП на статеву систему та фертильність здорових самиць виявлено, що вони не змінюють структуру естрального циклу, призводять до гіпертрофії ендометрію, збільшення кількості маткових залоз, тимчасового зменшення кількості зростаючих фолікулів в яєчниках з наступною їх гіпертрофією. Виявлені ефекти співпадають з даними отриманими на органотипових культурах маток та яєчників. При дослідженні репродуктивних показників встановлено подовження часу від початку спарювання до настання вагітності та пологів при застосуванні КЕП, що можна пояснити затримкою овуляції (табл. 6).

Таблиця 6

Вплив КЕП на репродуктивні показники ($M \pm m$, $n=10$ у кожній групі)

Група тварин	Час від спарювання до пологів	Кількість плодів	Середня вага плодів
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, $p < 0,05$

Після моделювання інфекційного процесу у лабораторних тварин встановлено, що у групі з застосуванням КЕП кількість тварин, які завагітніли, значно менша, ніж у контрольній групі та групі тварин з запаленням без КЕП. Вагітність після лікування настає пізніше, кількість плодів значно зменшена, маса плодів не змінена (табл. 7).

Після закінчення експерименту під час аутопсії виявлено поодинокі спайки І – ІІ ступенів у хибнооперованих тварин. У мишей групи з запаленням без лікування спайки спостерігаються практично в усіх випадках. У тварин групи з запаленням та введення КЕП важкість спайкового процесу вища, часто з

включенням у конгломерат яєчників та матки (табл. 7). У трьох тварин виявлено міжпетлеві абсцеси, септичні явища. Ці ознаки свідчать про загострення та пролонгування інфекційного процесу у тварин після введення КЕП, що може бути пояснено ефектом імуносупресії, характерною для вагітності та корелює з даними, отриманими на суспензії спленоцитів.

Таблиця 7

Репродуктивні показники та ступінь спайкового процесу в досліджуваних групах при моделюванні інфекційного процесу (n=10 у кожній групі)

Група тварин	Запалення	Запалення + КЕП	Хибнооперовані
Репродуктивні показники			
Кількість тварин, які завагітніли, %	80,0	40,0*	90,0
Час від спарювання до пологів, діб	25,4±2,2	62,3±5,4*,**	26,4±2,1
Кількість плодів	6,1±0,3*	5,0±0,2*,**	7,9±0,4
Середня маса плодів, г	1,3±0,5	1,2±0,2	1,1±0,2
Ступень спайкового процесу			
I (поодинокі спайки), %	20	0	20
II (спайки біля матки та яєчників), %	50	60	20
III (спайки з кишківником), %	20	10	0
IV (конгломерат у черевній порожнині), %	0	30	0

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

При порівнянні груп тварин з АФС виявлено, що у мишей без лікування спостерігається підвищення швидкості згортання крові, тромбоцитопенія та підвищення показників РБТЛ. Застосування КЕП призводить до зниження швидкості згортання крові та РБТЛ до рівня інтактних тварин. При цьому залишається тромбоцитопенія, але кількість тромбоцитів значно вища, ніж у тварин з АФС без лікування (табл. 8). При гістологічному дослідженні репродуктивних органів виявлена різка гіпертрофія матки та деяка гіпертрофія яєчників у тварин з КЕП.

Під час дослідження репродуктивних показників виявлено, що у тварин з АФС значно зменшені маса і кількість плодів, підвищена кількість резорбцій та мертвих плодів, маса плаценти вірогідно не змінена. Після застосування КЕП у тварин із АФС вдалося досягти значного підвищення кількості живих плодів, резорбцій не виявлено, але залишалися самиці з мертвими плодами, маса плодів знижена (табл. 9). Таким чином, КЕП покращує перебіг АФС при вагітності, але не можуть бути застосовані у якості монотерапії.

Таблиця 8

Лабораторні та репродуктивні показники експериментальних тварин ($M \pm m$, $n=10$ у кожній групі)

Показники	Група тварин		
	АФС	АФС+КЕП	Інтактні
Згортання крові за Моровіцем, хв	4,1 $\pm$ 0,7*	5,9 $\pm$ 0,9*,**	8,1 $\pm$ 0,5
Тромбоцити $\times 10^3$ /мл	86,5 $\pm$ 13,7*	168,2 $\pm$ 17,0*,**	236,3 $\pm$ 17,2
РБТЛ, %	15,3 $\pm$ 1,2*	7,2 $\pm$ 1,1	9,8 $\pm$ 0,7
Кількість плодів	5,2 $\pm$ 0,3*	6,8 $\pm$ 0,5	8,3 $\pm$ 0,7
Тварин з резорбцією, %	50*	0	0
Тварин з мертвими плодами, %	20*	40*	0
Середня маса плоду, г	0,7* $\pm$ 0,04	0,7* $\pm$ 0,05	1,06 $\pm$ 0,03
Середня маса плаценти, г	0,18 $\pm$ 0,007	0,19 $\pm$ 0,003	0,22 $\pm$ 0,02

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

Після моделювання СПКЯ у щурів спостерігається різке збільшення яєчників за рахунок кіст, зменшення маток без стоншення їх шарів (за рахунок розширення порожнини маток), матковий коефіцієнт не змінювався. Жодна нелікована тварина не завагітніла (табл. 9). У тварин, яким проводили терапію КЕП через місяць реєстрували регулярні зміни естрального циклу, 40% тварин завагітніло, час до пологів подовжується, кількість плодів зменшується. При морфологічному аналізі репродуктивних органів виявлено збільшення матки, але масові коефіцієнти не відрізнялися від контрольної групи, спостерігали поодинокі кісти у яєчниках, масові коефіцієнти яких наближені до норми.

Таблиця 9

Репродуктивні показники тварин з моделлю СПКЯ ($n=10$ у кожній групі)

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 $\pm$ 0,003	0,28 $\pm$ 0,05	90	40	32,8 $\pm$ 2,3*	3,2 $\pm$ 0,2*
СПКЯ	0,078 $\pm$ 0,008*	0,24 $\pm$ 0,08	50	0	-	-
Інтактні тварини	0,042 $\pm$ 0,005	0,23 $\pm$ 0,04	100	90	25,3 $\pm$ 0,3	7,2 $\pm$ 0,7*

Примітка:* – різниця статистично значуща у порівнянні з інтактними тваринами.

При моделюванні ішемічного ураження (перекруту) яєчників на момент повторної лапаротомії через 4 години після моделювання перекруту у тварин виявляються крововиливи у яєчники та матку. Яєчники збільшені за рахунок крововиливів до 10–15 мм в діаметрі. При гістологічному дослідженні виявлено

масивні крововиливи у паренхімі, фолікулах, жовтих тілах та воротах яєчника. У матці - крововиливи у внутрішніх шарах, ближче до ендометрію. Під час повторного дослідження після лікування перекруту без КЕП, наприкінці експерименту, яєчники та матка не мали слідів крововиливів, але на місці перекруту різко зменшена кількість жовтих тіл, місць імплантації та живих плодів. Середня маса плацент та плодів не відрізнялася від контрольних показників. Спайки спостерігали рідко. У самиць з перекрутом та КЕП кількість жовтих тіл, живих плодів, місць імплантації, а також маса плодів та плаценти не відрізняється від хибно оперованих, але кількість спайок у черевній порожнині є збільшеною (табл. 10).

Таблиця 10

Репродуктивні показники у піддослідних тварин на боці перекруту (n=10 у кожній групі)

Група тварин	Кількість жовтих тіл	Кількість місць імплантації	Кількість плодів	Середня вага плоду, г	Середня маса плаценти, г	Кількість тварин зі спайками, %
Перекрут, КЕП	6,2±0,5	5,1±0,5	4,8±0,8	2,3 ± 0,3	0,7 ± 0,06	60*
Перекрут	3,5±0,2*	3,3±0,3*	3,5±0,2*	2,2 ± 0,5	0,8 ± 0,09	20
Хибно-оперовані	7,5±0,6	6,9±0,7	6,2±0,6	2,3 ± 0,8	0,7 ± 0,1	20

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

При моделюванні *передчасного виснаження яєчників* внаслідок хіміотерапії протягом 2-х тижнів вага тварин всіх груп різко знижується. У групі без лікування миші відновлювали вагу до групи інтактних протягом 8 тижнів. Тварини, яким вводили КЕП відновлювали вагу на 5 тижнів після хіміотерапії (рис. 15, А). Циклічність естрального циклу та статеву активність тварин, які отримували КЕП також покращувались (рис. 15, Б, В).

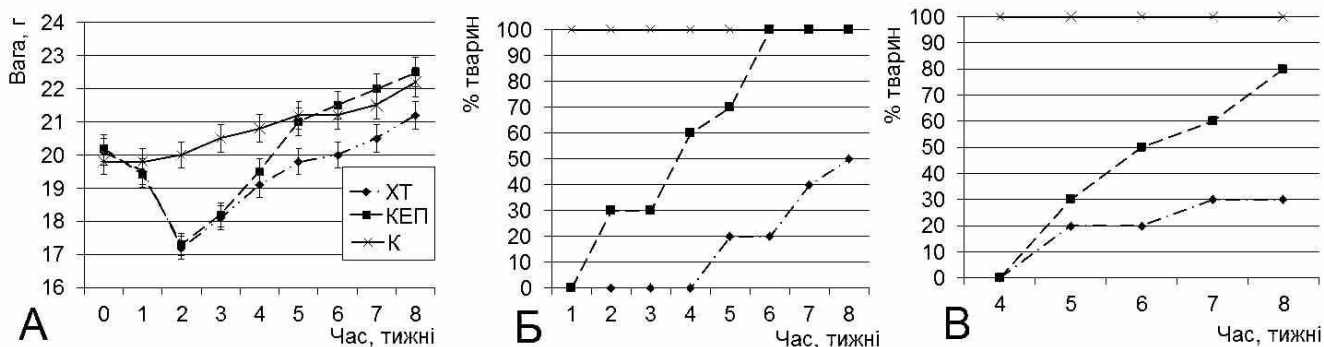


Рис. 15. Вага тварин (А), наявність естрального циклу (Б), статеву активність (В). ХТ – група після хіміотерапії без лікування. n=10. К – контроль. Примітка:* – різниця статистично значуща у порівнянні з тваринами без хіміотерапії, $p < 0,05$.

При морфологічному дослідженні внутрішніх органів тварин одразу після хіміотерапії спостерігали різку атрофію яєчників (рис. 16, А) та маток (рис. 16, Б), набряк нирок, печінки.

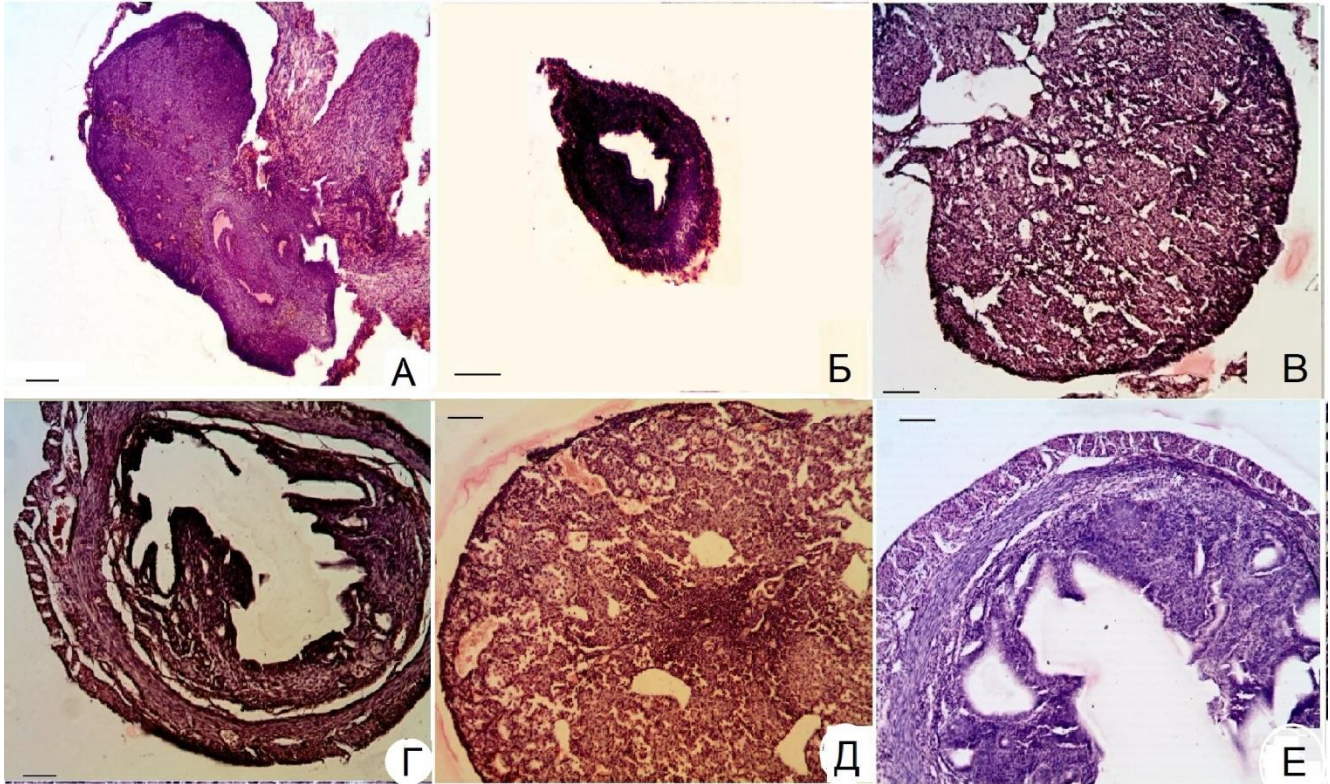


Рис. 16. Структура яєчників та маток тварин. А, Б – через тиждень після хіміотерапії без лікування, В, Г – через 12 тижнів після хіміотерапії без лікування, Д, Е – лікування КЕП через 12 тижнів. Забарвлення гематоксилін-еозин. Масштабні лінійка 100 мкм.

Через 12 тижнів у тварин після хіміотерапії без лікування спостерігали збільшення кількості жирової тканини, зменшення розмірів яєчників з загибеллю яйцеклітин та відсутністю фолікулів та жовтих тіл (рис. 16, В), атрофію маток (рис. 16, Г), відновлення структури нирок та залишки циротичних змін в печінці. У тварин, яких лікували за допомогою КЕП яєчники збільшені у порівнянні з нелікованими тваринами, але яйцеклітини, фолікули та жовті тіла не відновлені, спостерігали окремі округлі утворення, можливо на місці фолікулів (рис. 16, Д), матка цих тварин мало відрізнялась від здорових (рис. 16, Е), нирки та печінка були збережені.

При моделюванні операційної травми матки з наступним її ушиванням виявлено, що в групах, які були проліковані з застосуванням КЕП формується більш повноцінний рубець на матці (рис. 17, А), практично не знижена кількість плодів в оперованій половині матки, але дещо збільшена кількість спайок. При лікуванні без похідних плаценти зміни в матці мають фіброзний характер (рис. 17, Б). У тварин в групах з використанням КЕП збільшена кількість жовтих тіл, що дещо компенсує репродуктивні втрати внаслідок травми та спайкоутворення. Це свідчить про необхідність профілактики спайкоутворення при застосуванні КЕП за

умов оперативного втручання.

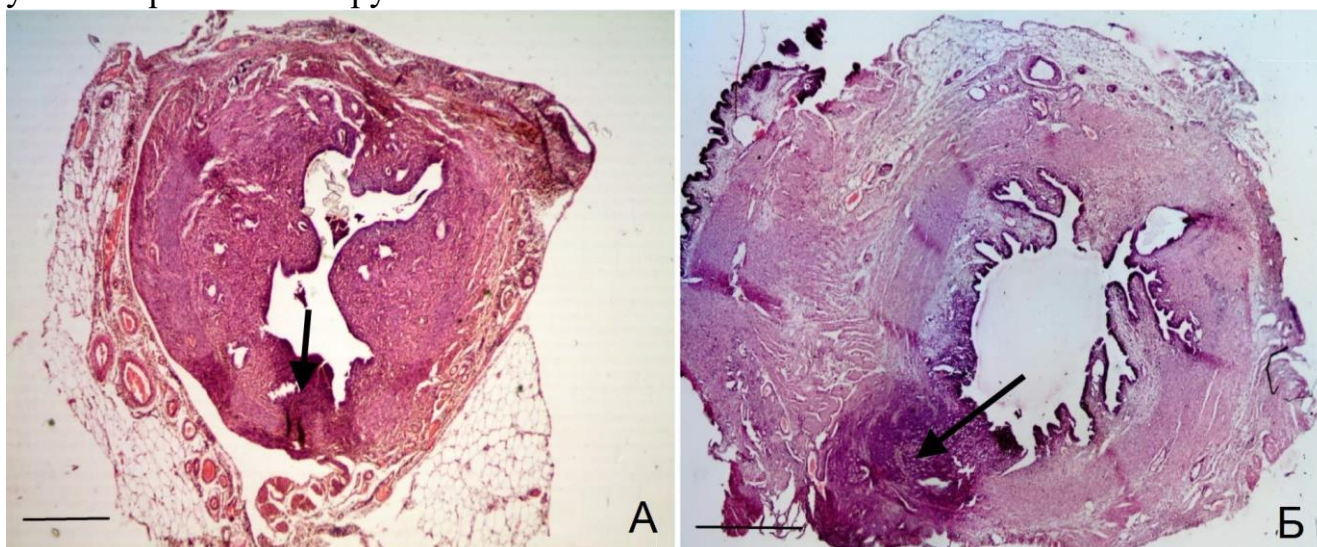


Рис. 16. Мікроскопічна оцінка відновлення оперованих рогів матки. А – повноцінний рубець у тварини після КЕП, Б – фіброзний рубець без лікування похідними плаценти. Стрілками позначені місця операції. Забарвлення гематокстнін-еозином. Масштабні лінійки 100 мкм.

Таким чином, експериментально доведено, що кріоконсервовані експланти плаценти не чинять негативного впливу на репродуктивну систему здорових тварин, призводять до деякої гіпертрофії матки, яєчників, можуть вести до підвищеного спайкоутворення при гострому інфекційному процесі та операційній травмі, покращують перебіг синдрому полікістозних яєчників, синдрому передчасного виснаження яєчників, антифосфоліпідного синдрому, ішемічного ураження яєчника.

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, Рінгеру 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 функція, 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 ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у наукових фахових виданнях.

1. Трифонов В.Ю. Экспериментальное обоснование возможности прегравидарной профилактики антифосфолипидного синдрома / В.Ю. Трифонов, В. Ю. Прокопюк, О.С. Прокопюк, О.В. Липина, В.В. Волина, Л.И. Зуб, О. В. Фалько, А. В. Прокопюк // Таврический медико-биологический вестник. – 2010. – Т.13, № 4 (52). – С. 188-192.
2. Трифонов В.Ю. Современные представления об акушерском антифосфолипидном синдроме / В.Ю. Трифонов, В.Ю. Прокопюк // Экспериментальна і клінічна медицина. – 2010. – № 2. – С. 50-55.
3. Прокопюк О.С. Вплив імплантації кріоконсервованої хоріальної тканини на морфофункціональний стан міокарда старих щурів / О.С.Прокопюк, В.В.Чижевський, В.Ю. Прокопюк // Медицина сьогодні і завтра. – 2011. – Т. 50-51, № 1-2. – С. 242-245.
4. Prokopyuk VYu Cryopreserved chorionic tissue in maternal and fetal infection therapy (clinical and experimental research) / V.Yu. Prokopyuk // Problems of cryobiology. – 2011. – V. 21, № 3. – P.338 - 249.
5. Прокопюк В.Ю. Экспериментальная оценка эффективности прегравидарной подготовки и лечения антифосфолипидного синдрома / В.Ю. Прокопюк // Клінічна та експериментальна патологія. – 2011. – Т. X, № 2 (36), Ч. 1. – С. 79-82.
6. Мусатова И.Б. Создание многокомпонентных сред для криоконсервирования ткани плаценты /И.Б. Мусатова, О.С. Прокопюк, В.В. Волина, В.Ю. Прокопюк// Биофизика живой клетки. – Т. 10. – 2014. – С. 126-128.
7. Прокопюк В. Ю. Аналіз методологічних підходів при моделюванні гестаційного антифосфоліпідного синдрому / В.Ю.Прокопюк, О.В.Фалько, О.С. Прокопюк, В.В.Волина, В.Ю. Трифонов // Патологія. – 2015. – Т. 32, №2. – С.4-10.
8. Prokopyuk V.Yu. Low temperature preservation and storage of placental biological derivatives / V.Yu. Prokopyuk , O.V. Falko, I.B. Musatova, O.S. Prokopyuk, O.O. Royenko, O.O. Terekhova, O.V. Chub // Probl. Cryobiol. Cryomed. – 2015. – V. 25, № 4. – P. 291-310.
9. Прокопюк О.С. Вплив кріоконсервованих біоб'єктів плацентарного

- походження на культуру клітин / О.С.Прокопюк, Н.О. Шевченко, В.Ю. Прокопюк, О.В. Чуб, О.О. Терехова // Вісник проблем біології і медицини. – 2015. – Вип. 3, Том 1 (122). – С. 160 - 164.
10. Pogozhykh D. Influence of factors of cryopreservation and hypothermic storage on survival and functional parameters of multipotent stromal cells of placental origin [Електронний ресурс] / D. Pogozhykh, V. Prokopyuk, O. Pogozhykh, T. Mueller, O. Prokopyuk // PLoS One. – 2015. – Vol.10, №10. – Режим доступу до журн.: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0139834>
 11. Prokopyuk V. Yu. Safety of placental, umbilical cord and fetal membrane explants after cryopreservation / V.Yu. Prokopyuk, O.S. Prokopyuk, I.B. Musatova, N.A. Shevchenko, A.A. Roenko, E.A. Terehova, V.V. Volina // Cell and organ transplantology. – 2015. – Vol.3, №1. – P. 34-38.
 12. Schevchenko N.O. Dynamics of activity and duration of functioning of cryopreserved cryoextract, placental cells and fragments in the organism of experimental animals / N.O.Shevchenko, K.V.Somova, V.V.Volina, V.Yu.Prokopiuk, O.S. Prokopiuk // Morphologia. – 2016. – Vol.10, № 2. – P. 93-98.
 13. Пасієшвілі Н.М. Вплив імуномодуляторів на перебіг вагітності при експериментальних інфекційно-запальних ураженнях матері та плоду/ Н.М. Пасієшвілі, В.Г. Карпенко, В.Ю. Прокопюк, О.В. Фалько // Sciences of Europe. – 2016 – V. 1, №. 3. – С. 15-23.
 14. Прокопюк В.Ю. Внеплацентарные трофобластические структуры: изучение, структура, функции, свойства, диагностическое и терапевтическое значение /В.Ю. Прокопюк //Акушерство и гинекология. – 2016. – № 2. – С. 49-54.
 15. Роєнко О. О. Використання кріоконсервованих оболонок плода в терапії трофічних виразок в експерименті / О.О.Роєнко, В.Ю.Прокопюк, О.В.Фалько, Н.О. Шевченко, О.С. Прокопюк // Клінічна хірургія. – 2016. – № 5. – С. 69-72.
 16. Козуб М.М. Порівняльна характеристика різних методик оперативного лікування, профілактики спайкоутворення та післяопераційної реабілітації у щурів з моделлю трубної вагітності в експерименті / М.М. Козуб, В.Ю. Прокопюк, М.І.Козуб, В.Ю. Прокопюк, К.П. Скібіна // Збірник наукових праць співробітників НМАПО ім. П.Л. Шупіка. – 2016. – Т. 27, № 2. – Р. 224-31.
 17. Falko O.V. Comparative analysis of limbs' trophic ulcers modeling methods in mice / O.V. Falko, N.A. Shevchenko, V.Y. Prokopyuk, A.A. Roenko, O.S. Prokopyuk // Novosti Khirurgii. – 2017. – V. 25, №6. – P. 561-6.
 18. Kozub M.M. Comparison of various of tissue and cell therapy approaches when restoring ovarian, hepatic and kidney's function after chemotherapy-induced ovarian failure /M.M. Kozub, V.Yu. Prokopyuk, K.P. Skibina, O.V. Prokopyuk, N.I. Kozub // Exp Oncol. – 2017. – V.39, № 3. – P. 181-185.
 19. Musatova I. B. Effects of implantation of cryopreserved placental explants on the behavioral indices and morphological characteristics of the cerebral structures in senescent mice / I.B. Musatova, V.V. Volina, O.V. Chub, V.Yu. Prokopyuk, O.S. Prokopyuk // Neurophysiology. – 2017. – V. 49, №. 5. – P. 363-371.
 20. Pogozhykh D. Influence of temperature fluctuations during cryopreservation on vital parameters, differentiation potential, and transgene expression of placental multipotent stromal cells [Електронний ресурс] / D. Pogozhykh, O. Pogozhykh, V.

- Prokopyuk, L. Kuleshova, A. Goltsev, R. Blasczyk, T. Mueller // *Stem Cell Research & Therapy*. – 2017. V.8, № 66. – Режим доступу до журн.: <https://stemcellres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13287-017-0512-7>
21. Prokopyuk O. S. Implantation of cryopreserved human placental fragments restores prooxidant-antioxidant balance in experimental animals of late ontogeny / O.S. Prokopyuk, V.Yu. Prokopyuk, N.M. Pasieshvili, V.V. Chyzhevskiy, V.Yu. Trifonov, V.G. Karpenko, O.O. Loginova // *Cryobiol. Cryomed.* – 2017. – V.27, № 1. – P. 61-70.
 22. Prokopyuk V.Yu. Cryopreserved placental explants increase lifespan of male mice and change survival features of female mice / V.Yu. Prokopyuk, O.V. Chub, N.A. Shevchenko, O.V. Falko, I.B. Musatova, V.V. Lazurenko, A.N. Tischenko, O.S. Prokopyuk // *Probl Cryobiol Cryomed.* – 2017. – V. 27, № 2. – С. 143-150.
 23. Prokopyuk V.Yu. Effect of cryopreserved placental explants on female reproductive system under normal and pathological conditions (experimental study) / V.Yu. Prokopyuk, O.V. Grischenko, O.V. Prokopyuk, N.O. Shevchenko, O.V. Falko, A.V. Storchak, A.O. Schedrov // *Probl Cryobiol Cryomed.* – 2017. – V.28, № 3. – P. 250-265.
 24. Prokopyuk V.Yu. Placental stem cells, organotypic culture and human placenta extract have neuroprotective activity / V.Yu. Prokopyuk, O.V. Chub, M.V. Shevchenko, O.S. Prokopyuk // *Cell and Organ Transplantology*. – 2017. – V.5, № 1. – P. 39-42.
 25. Pogozhykh O. Placenta and placental derivatives in regenerative therapies: experimental studies, history and prospects [Електронний ресурс] / O. Pogozhykh, V. Prokopyuk, C. Figueiredo, D. Pogozhykh // *Stem Cells International*. – 2018. – V. 2018, №14. – Режим доступу до журн. : <https://www.hindawi.com/journals/sci/2018/4837930/>
 26. Prokopiuk V.Yu. Influence of media conditioned by cryopreserved and fresh placental explants and cells on murine uterine and ovarian organotypic cultures / V.Yu. Prokopiuk // *Probl Cryobiol Cryomed.* – 2018. – V. 28, № 2. – P. – 139-150.
 27. Прокопюк В.Ю. Вплив кріоконсервованих експлантів плаценти на перебіг експериментального синдрому полікістозних яєчників / А.М. Гольцев, О.С. Прокопюк, К.В. Сомова, О.О. Логінова // *Вісник проблем біології і медицини*. – 2018. – Т. 142, № 1. – С. 167-171.
 28. Прокопюк В.Ю. Вплив кріоконсервованих експлантів плаценти на відновлення яєчників після лікування перекруту. / О.О. Логінова, О.В. Прокопюк, Є.В. Сомова // *Світ біології та медицини*. – 2018. – Т. 63, № 1. – С. 150 - 153.
 29. Прокопюк В.Ю. Корекція інволютивних змін репродуктивної системи самиць старих щурів імплантацією кріоконсервованих фрагментів плаценти / В.Ю. Прокопюк, О.С. Прокопюк, І.Б. Мусатова, І.В. Сорокіна, О.О. Логінова, К.В. Сомова // *Фізіол. журн.* – 2018. – Т. 64, № 4. – С. 74-81.
 30. Prokopiuk V.Yu. Influence of native and cryopreserved placental derivatives on the splenocyte functional characteristics in vitro / O.V. Falko, V.G. Karpenko, O.V. Chub, O.O. Loginova // *Bulletin of problems in biology and medecine*. – 2018. – V. 144, № 2. – P. 221-223.
 31. Pogozhykh O. Towards biobanking technologies for natural and bioengineered multicellular placental constructs / V. Prokopyuk, O. Prokopyuk, L. Kuleshova, A.

- Goltsev, C. Figueiredo, D. Pogozhykh // *Biomaterials*. – 2018. – V. 185. – P. 39-50.
32. Прокопюк В.Ю. Оцінка можливості короткочасного зберігання експлантів плаценти для регенеративної медицини / В.Ю. Прокопюк, М.В. Шевченко, О.С. Прокопюк, І.Б. Мусатова, К.Ю. Смоляник // *Вісник наукових досліджень*. – 2019. – № 2. С. 53-57.
33. Прокопюк В. Ю. Вплив кріоконсервованих експлантів плаценти на прояви ускладнень після операцій на матці в експерименті / В.Ю. Прокопюк, Н.М. Пасієшвілі, О.В. Прокопюк, В.Г. Карпенко, О.О. Логінова // *Вісник проблем біології і медицини*. – 2019. – Т. 2, № 151. С. 151-155.
- Тези конференцій.**
34. Prokopyuk O.S. Cryopreservation effect on morfofunctional integrity of human placental tissue / O.S. Prokopyuk, V.Yu. Prokopyuk, V.V. Volina, V.V. Chizevsky // *Speaker Abstract 47th Annual Meeting of Cryobiology “Cryo-2010”, 17-20 July 2010. – Bristol, 2010 – P. 77.*
35. Прокопюк В.Ю. Опыт работы низкотемпературного банка аутологичных и донорских препаратов кордовой крови и плаценты в регенеративной медицине / В.Ю. Прокопюк, В.И. Грищенко, О.С. Прокопюк, В.В. Чижевский // *Сборник тезисов Всероссийской научной школы-конференции «Стволовые клетки и регенеративная медицина» – 25-26 октября 2010. – Москва, 2010. – С. 58-59.*
36. Прокопюк О.С. Кріоконсервовані плацентарні біооб'єкти в тканинному аутобанку / О.С. Прокопюк, В.Ю. Прокопюк // *Сборник тезисов IV Всероссийского симпозиума с международным участием «Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии».* – 21-22 апреля 2010, Санкт-Петербург, 2010 – С. 24.
37. Прокопюк В.Ю. Механізми впливу кріоконсервованих препаратів плаценти на репродуктивну функцію в періоді пізнього онтогенезу / В.Ю. Прокопюк, О.С. Прокопюк // *Холод в біології і медицині. – Тезиси доповідей 36-ї щорічної конференції молодих учених «Холод в біології і медицині», Харків, 22-24 травня 2012. – Харків, 2012. – С. 31.*
38. Прокопюк В.Ю. Експериментальне обґрунтування прегравідарної підготовки кріоконсервованими плацентарними препаратами / В.Ю. Прокопюк, А.Н. Гольцев, О.С. Прокопюк, В.Ю. Трифонов // *V Всероссийский симпозиум с международным участием «Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии» – Сборник тезисов и программа симпозиума, Уфа, 17-18 мая 2012. – Уфа, 2012. – С.184-185.*
39. Прокопюк О.С. Плацентарна терапія геріатричних змін репродуктивної функції / О.С. Прокопюк, В.Ю. Прокопюк, В.Г. Карпенко // *V Всероссийский симпозиум с международным участием «Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии» – Сборник тезисов и программа симпозиума, Уфа, 17-18 мая 2012. – Уфа, 2012. – С.185-186.*
40. Prokopyuk O.S. Morphofunctional integrity of placental fragments after using different cryopreservation protocols / O.S. Prokopyuk, V.Yu. Prokopyuk // *Problems of cryobiology*. – 2012. – V. 22, № 3. – С. 264.
41. Прокопюк О.С. Використання кріоконсервованих препаратів плаценти для корекції вікових змін / Прокопюк О.С., Прокопюк В.Ю.

- //Матеріали конференції «Актуальні питання геронтології та геріатрії», присвяченій пам'яті В.В. Фролькіса. – Київ, 25 січня 2013 року. – Київ, 2013. – С.48.
- 42.Прокопюк В.Ю. Етико-правові проблеми отримання, дослідження і застосування плацентарних препаратів / В.Ю. Прокопюк // Тези п'ятого конгресу з біоетики – 23-25 вересня, 2013, Київ. – Київ, 2013. – С. 146-147.
 - 43.Прокопюк О.С. Низкотемпературный банк плацентарных биообъектов: научные перспективы развития в сфере медицинских биотехнологий / О.С.Прокопюк, А.А.Ронко, В.Ю.Прокопюк, В.В. Чижевський // Материалы III международной научно-практической конференции „Академическая наука – проблемы и достижения” - 20-21 февраля, 2014, Москва, – С. 43-46.
 - 44.Prokopyuk V.Yu. Preservation assay for placental, umbilical and membrain tissues in low temperature bank /V.Yu.Prokopyuk, O.S.Prokopyuk, I.B.Musatova, A.N.Roenko, E.A. Terekhova // Abstracts and program «Freezing biological time» Society for Low Temperature Biology 50th Anniversary Celebration, Annual Scientific Conference & AGM 2014 London 8-10 October 2014. – London, 2014. – P.74.
 - 45.Pogozhykh O. Parametrs for accurate estimation of survival rates of multipotent stromal cells after long-term criopreservation simulation /O. Pogozhykh, D. Pogozhykh, V. Prokopiuk, T. Muller// Abstracts and program «Freezing biological time» Society for Low Temperature Biology 50th Anniversary Celebration, Annual Scientific Conference & AGM 2014 London 8-10 October 2014. – London, 2014. – P.80.
 - 46.Pogozhykh D. Mimicked long term cryopreservation of transgenic multipotent stromal cells affects viability but not transgene expression / D. Pogozhykh, O. Pogozhykh, V. Prokopiuk, T. Mueller// Abstracts and program «8th International Meeting Stem Cell Network North Rhine-Westphalia» April 21-22, 2015, Bonn, Germany. – Bonn, 2015. – P.95.
 - 47.Prokopuk V.Y. Placental cryoextract rescue ovarian function of mice with premature ovarian falure induced by chemoterapy / V.Y. Prokopuk, N.I. Kozub, K.P. Skybina, M.N. Kozub // Prezeglad lekarski. – 2016. – № 73, Supplement 1. – P5.
 - 48.Skybina K. P. Placental factors protects neural cells from glutamate-induced toxicity / K.P. Skybina, O.V. Chub, V.Yu. Prokopyuk, M.V. Shevchenko // Topical issues of new drugs development: Abstracts of XXIII International Scientific And Practical Conference Of Young Scientists And Student (April 21, 2016) in 2 vol. V. 2. – Kharkiv: Publishing Office NUPh, 2016. – P. 106.
 - 49.Прокопюк В.Ю. Экстракт плаценты ускоряет восстановление половой и репродуктивной функции после химиотерапии в эксперименте (пилотное исследование) / В.Ю.Прокопюк, К.П.Скибина, А.В.Прокопюк, М.Н.Козуб // Український радіологічний журнал. – 2016. – Т. XXIV, вып.1, доп. 1 – С. 159.
 - 50.Чуб О.В. Нейропротекторный эффект факторов плацентарного происхождения в модели глутамат-индуцированной токсичности клеток головного мозга новорожденных крыс / О.В. Чуб, М.А. Шевченко, В.Ю. Прокопюк //Тези доповідей 40 щорічної конференції молодих учених «Холод в біології та медицині», Харків, 23-24 травня 2016. – Харків, 2016. – С. 26.

51. Pogozhykh D. Mimicking long-term biobanking of placental multipotent stromal cells by temperature fluctuations during cryopreservation /D. Pogozhykh, O. Pogozhykh, V. Prokopyuk, A. Goltsev, C. Figueiredo, T. Müller // SLTB 2016 in Dresden on Wednesday September 7th. – Dresden, 2016. – P.7.
52. Prokopyuk V. Yu. Influence of cryopreservation on survival of placental, umbilical cord, and fetal membrane explants, as well as placental cells within spheroids and alginate microspheres /V. Yu. Prokopyuk, D. Pogozhykh, O. Pogozhykh, I. B. Musatova, L. G. Kuleshova, O. S. Prokopyuk // SLTB 2016 in Dresden on Wednesday September 7th. – Dresden, 2016. – P.27.
53. Прокопюк В.Ю. Глутаматна ексайтотоксичність як метод вибору оцінки нейропротекторної дії лікарських препаратів *in vitro* / В.Ю. Прокопюк, О.В. Чуб, М.А. Шевченко // Патофізіологія і фармація: шляхи інтеграції: тези доповідей VII Національного конгресу патофізіологів України з міжнародною участю 5 – 7 жовтня 2016. – Харків.: Вид-во НФаУ, 2016. – С. 187.
54. Чуб О.В. Кріоконсервовані плацентарні біопрепарати в профілактиці і корекції дисфункцій ЦНС в пізньому онтогенезі (експериментальне дослідження) / О.В. Чуб, В.Ю. Прокопюк, О.С. Прокопюк, І.Б. Мусатова, М.В. Шевченко // Проблемы старения и долголетия. – 2016. – Т.25. – С. 44.
55. Чуб О. В. Кріоконсервовані експланти плаценти підвищують тривалість життя самців і знижують імовірність смерті самиць в репродуктивний період / О.В. Чуб, В.Ю. Прокопюк, І.Б. Мусатова, О.С. Прокопюк // Тези доповідей XIV Міжнародної наукової конференції студентів, аспірантів, докторантів, молодих вчених та фахівців «Актуальні питання сучасної медицини» 30–31 березня 2017 року, м. Харків, Україна. – Харків, 2017. – С. 88-89.
56. Prokopiuk V. Yu. Placental MSCs, explants, extract protect neural cells against glutamate-induced toxicity / V. Yu. Prokopiuk, I. B. Musatova, M. V. Shevchenko, O. V. Chub, N. O. Shevchenko, O. S. Prokopiuk // Program and Abstract Book 8 th International Symposium on Experimental and Clinical Neurobiology Kosice, Slovakia June 18 – 21, 2017. – Kosice, 2017. – P. 72.
57. Pogozhykh O. Characterisation of cells derived from cryopreserved placental tissues / O. Pogozhykh, D. Pogozhykh, V. Prokopyuk, C. Figueiredo // Abstract book: SLTB Science meeting Cambridge 19 - 20 th September 2017. – Cambridge, 2017.
58. Prokopiuk V. Yu. Experimental study of cell and tissue therapy protocols in rehabilitation after chemotherapy-induced ovarian failure / V. Yu. Prokopiuk, M. M. Kozub, K. P. Skibina, O. V. Prokopyuk // Exp Oncol. – 2017. – Vol. 39, № 3. P. – 250-251.
59. Прокопюк В.Ю. Вплив кріоконсервованих мезенхімально стромальних клітин та експлантів плаценти на ізолювані тканини та клітини жіночої репродуктивної системи *in vitro* / В.Ю. Прокопюк, А.М. Гольцев, О.В. Прокопюк, О.В. Фалько, М.В. Шевченко // «Досягнення та перспективи експериментальної і клінічної ендокринології» (Сімнадцяті данілевські читання). – 1-2 березня 2018 року. – Харків, 2018. – 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. Volume 42 Issue

8, August 2019. P. 398.

Глави монографій.

61. Прокопюк О.С. Глава 16. Криоконсервирование плацентарных биообъектов, содержащих стволовые клетки / Прокопюк О.С., Грищенко В.И., Бабийчук Л.А., Прокопюк В.Ю., Зубов П.М. // Стволовые клетки и регенеративная медицина / Под. ред. В.А. Ткачука. – М.: МАКС Пресс, 2011. – 320 с. – С.289-303.
62. Прокопюк О.С. Глава 5. Верификация биобезопасности и сохранности криоконсервированных плацентарных биообъектов / О.С. Прокопюк, В.В. Чижевский, В.Ю. Прокопюк, В.В. Волина // Плацента: криоконсервирование, структура, свойства, перспективы клинического применения. Под. ред. В.И. Грищенко, Т.Н. Юрченко. – Харьков: СПД ФЛ Бровин А.В., 2011. – 292 с.
63. Чижевский В.В. / В.В. Чижевский, О.С. Прокопюк, М.И. Грошевой, О.В. Липина, В.Ю. Прокопюк // 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. Патент № 62029 Україна, МПК G09B23/28. Спосіб моделювання акушерського антифосфоліпідного синдрому / Прокопюк В.Ю., Прокопюк О.С., Трифонов В.Ю., Зайченко Г.В., Фалько О.В.; Заявник і патентовласник ІПКіК НАН України - № 201100372; заявл. 12.01.11; опубл. 10.08.11, Бюл. № 15.
65. Патент № 72117 Україна, МПК A61B 17/00, A61P 15/00 Спосіб корекції вікових порушень репродуктивної функції/ Прокопюк В.Ю., Прокопюк О.С., Карпенко В.Г., Пасієшвілі Н.М., Фалько О.В.; Заявник і патентовласник ІПКіК НАН України - № 201200310; заявл. 10.01.2012, опубл. 10.08.2012, Бюл. № 15, 2012.
66. Патент № 79009 Україна, МПК A01N 1/2 Спосіб кріоконсервування тканини плаценти / Прокопюк В.Ю., Прокопюк О.С., Чижевський В.В.; Заявник і патентовласник ІПКіК НАН України - № 201210931; заявл. 19.09.2012, опубл. 10.04.2013, Бюл. № 7.
67. Патент № 91122 Україна, МПК A61K 35/16, A61P 15/06 Спосіб профілактики первинної плацентарної недостатності / Прокопюк В.Ю., Пасієшвілі Н.М., Прокопюк О.В., Карпенко В.Г., Прокопюк О.С Патент на корисну модель.; Заявник і патентовласник ІПКіК НАН України - № 201315049; заявл. 23.12.2013, опубл. 25.06.2014 Бюл. № 12.
68. Патент № 107968 Україна, МПК A61K 35/50, A61P 15/08 Спосіб лікування передчасної недостатності яєчників / Прокопюк В.Ю., Скібіна К.П., Козуб М.М., Прокопюк О.В., Пасієшвілі Н.М.; Заявник і патентовласник ІПКіК НАН України - № 201600058; заявл. 04.01.2016. опубл. 24.06.2016, Бюл. № 12.

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 наукового ступеня доктора медичних наук за спеціальністю 14.01.35 – «криомедицина». Інститут проблем кріобіології та кріомедицини НАН України, Харків, 2019.

Дисертаційна робота присвячена дослідженню впливу факторів низькотемпературного зберігання на морфофункційні характеристики похідних плаценти та їх біологічної дії перебіг експериментальної гінекологічної патології. Застосування кріоконсервованих похідних плаценти для клітинної та тканинної терапії гінекологічної патології обумовлена біологічною тропністю плаценти до структур жіночої статеві системи, низькою імуногенністю, великою кількістю матеріалу, можливістю аутобанкінгу.

На першому етапі роботи дослідженні властивості природних та штучних похідних плаценти (експлантів, сфероїдів, клітин в суспензії та альгінатних сферах). Виявлена можливість ефективного кріоконсервування похідних плаценти з застосуванням диметилсульфоксиду та менш токсичних, дозволених для клінічного використання пропандіолу, полівінілпіролідону. Показані особливості кріоушкоджень в залежності від типу об'єкту, міжклітинних контактів та взаємодії кріопротектору з матеріалом скафолду. Виявлено, що більш стійкими до дії субнормотермічних (+20°C), гіпотермічних (+4°C) та низьких (-196°C) температур є клітини та експланти, що робить їх більш перспективними об'єктами для медичного застосування.

На другому етапі порівняна дія нативних та кріоконсервованих похідних плаценти на ізольовані елементи жіночої статеві системи та регуляторні елементи *in vitro*. Доведено однонаправленість дії нативних та кріоконсервованих об'єктів. Виявлено стимулюючий вплив на органотипову культуру матки, нейроклітини, нейропротекторний ефект, негативний (пригнічуючий) ефект на спленоцити та яєчники, відсутність впливу на культуру фібробластів.

На третьому етапі визначено, що кріоконсервовані похідні плаценти прииводять до тимчасової затримки овуляції, деякої гіпертрофії матки у інтактних тварин. При моделюванні патологічних процесів кріоконсервовані похідні плаценти покращують перебіг аутоімунної патології (антифосфоліпідний синдром), ендокринної (синдром полікістозу яєчників), травми та ішемії (перекрути яєчників, операційна травма), синдрому виснаження яєчників внаслідок хіміотерапії. Втім застосування кріоконсервованих похідних плаценти при гострій інфекційній патології (перитоніт, сальпінгоофорит) призводить до обтяження перебігу інфекційного процесу, підвищеного спайкоутворення.

На основі проведеного дослідження можна вважати кріоконсервовані похідні плаценти перспективними для застосуванні в терапії гінекологічної патології аутоімунного, ендокринного, токсичного чи травматичного генезу.

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

АННОТАЦИЯ

Прокопюк В.Ю. Криоконсервирование и низкотемпературное хранение производных плаценты и их влияние на течение экспериментальной гинекологической патологии. – Квалифицированная научная работа на правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 14.01.35 – «криомедицина». Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков, 2019.

Диссертационная работа посвящена изучению влияния факторов низкотемпературного хранения на морфофункциональные характеристики производных плаценты и их биологического действия на репродуктивную систему в норме и при экспериментальной гинекологической патологии. Применение криоконсервированных производных плаценты для клеточной и тканевой терапии гинекологической патологии обусловлена тропностью плаценты к структурам репродуктивной системы, низкой иммуногенностью, большим количеством материала, возможностью аутобанкинга.

На первом этапе работы исследованы свойства естественных и искусственных производных плаценты (эксплантов, сфероидов, клеток в суспензии и альгинатных сферах). Клетки, экспланты и альгинатные микросферы обладали стабильными характеристиками, сфероиды были менее стойкими, адгезировали к пластику, легко разрушались при механическом воздействии. При субнормотермичных условиях при температуре 20°C в среде культивирования возможно сохранение производных плаценты без значительной потери жизнеспособности в течение короткого времени, достаточного для транспортировки. Клетки, альгинатные микросферы и сфероиды хранятся 48 часов, экспланты 72 часа. При снижении температуры до гипотермических условий 4°C срок хранения снижается до 24 часов. Криоконсервирование при стандартных условиях с применением среды культивирования с 10% диметилсульфоксидом и двухэтапным режимом позволяет получить сохранность клеток и эксплантов на уровне более 90% по разным показателям, клеток в альгинатных сферах - около 70%, сфероидов - около 50%. Сохранность при криоконсервировании зависит от состава среды (преимущество имеют более близкие по составу к среде культивирования), типа и концентрации криопротекторов, колебаний температур в криохранилище (колебания более 100°C снижают характеристики меньше, чем за 10 циклов), межклеточных связей и межклеточного вещества, из-за значительного специфического влияния на льдообразование (альгинат и прямые связи в сфероиде ухудшают сохранность, а межклеточное вещество в эксплантах улучшают). Создание нетоксичных криозащитных сред из разрешенных к клиническому использованию, целесообразно проводить на основе пропандиола, поливинилпирролидона на основе многокомпонентных кристаллоидных растворов (раствор Хэнкса, Рингера). При этом возможно снижение сохранности на 15-20% по сравнению с 10% диметилсульфоксидом.

На втором этапе сопоставлено действие нативных и криоконсервированных производных плаценты на изолированные элементы женской половой системы и

регуляторные элементы *in vitro*. Доказано однонаправленность действия нативных и криоконсервированных объектов. Выявлено стимулирующее влияние на органотипическую культуру матки, нейроклетки, наличие нейропротекторного эффекта. Угнетающий эффект наблюдался при воздействии на спленоциты и яичники. Констатировали отсутствие влияния на культуру фибробластов. Наблюдаемый эффект характерен как для плаценты во время беременности, так и для использования стволовых клеток.

На третьем этапе определено, что криоконсервированные производные плаценты приводят к временной задержки овуляции, некоторой гипертрофии матки у интактных животных. При моделировании патологических процессов криоконсервированные производные плаценты улучшают течение аутоиммунной патологии (антифосфолипидный синдром), эндокринной (синдром поликистозных яичников), травмы и ишемии (перекрут яичников, операционная травма), синдрома истощения яичников вследствие химиотерапии. Однако применение криоконсервированных производных плаценты при острой инфекционной патологии (перитонит, сальпингоофорит) приводит к отягощению инфекционного процесса, повышенному спайкообразованию.

На основе проведенного исследования можно рекомендовать при разработке тканеинженерных конструкций и криоконсервировании многоклеточных структур, тканей, органов учитывать характер межклеточных взаимодействий, возможное взаимодействие материала скафолда или межклеточного вещества со средой криоконсервирования. Криоконсервированные экспланты плаценты являются перспективными для применения в терапии гинекологической патологии аутоиммунного, эндокринного, токсического или травматического генеза, но противопоказаны при остром воспалительном процессе или повышенном риске спайкообразования.

Ключевые слова: плацента, МСК, экспланты, сфероиды, криоконсервирование, гипотермия, субнормотермия, культуры, гинекология, недостаточность яичников, инфекция, поликистоз, 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.

The dissertation is devoted to the study of the low temperature storage factors influence on placental derivative's morphofunctional characteristics and their biological effects on the course of experimental gynecological pathology. The application of cryopreserved placental derivatives for treatment of gynecological pathology is stipulated to the natural placenta's biological tropism to the female reproductive system, low immunogenicity, a large amount of material, the possibility of auto-banking.

At the first stage of the study, the properties of natural and artificial placental derivatives (explants, spheroids, cells in suspension and in alginate spheres) were

studied. The possibility of effective cryopreservation of placental derivatives using dimethyl sulfoxide and less toxic ones, allowed for clinical application propanediol, polyvinylpyrrolidone was proved. Mechanisms of cryoinjury depended on the type of object, intercellular contacts, interaction of the cryoprotectant with the scaffold's material. Cells and explants are more resistant to subnormothermic (+ 20°C), hypothermal (+ 4°C) and low (-196°C) temperatures, which makes them more perspective objects.

At the second stage, the effect of native and cryopreserved placental derivatives on the isolated elements of the female reproductive system and their regulatory elements were compared *in vitro*. The similar effect of freshly isolated and cryopreserved objects was proved. The stimulating effect on the organotypic culture of the uterus, neurocells; negative (suppressive) effect on splenocytes and ovaries; absence of influence on the culture of fibroblasts was revealed.

At the third stage, it was determined that cryopreserved derivatives of the placenta were used to temporarily delay ovulation, some uterine hypertrophy in intact animals. When modeling pathological processes, cryopreserved placental derivatives improve the course of autoimmune pathology (antiphospholipid syndrome), endocrine (polycystic ovarian syndrome), trauma and ischemia (ovarian torsion, surgical injury), premature ovarian failure syndrome due to chemotherapy. However, the application of cryopreserved placental derivative in acute infectious pathology (peritonitis, salpingoophoritis) leads to aggravation, adhesion's formation.

Thereby cryopreserved placental derivatives can be considered as promising for application in treatment of gynecological pathology of autoimmune, endocrine, toxic or traumatic genesis.

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

СПИСОК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

DMEM – Dulbecco's modified eagle medium

EB – etidium bromide

FDA – fluoriscine diacetate

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

PBS – Phosphate buffer saline

АФС – антифосфоліпідний синдром

ДМСО – диметилсульфоксид

ЕП – експланти плаценти

КЕП – кріоконсервовані експланти плаценти

ККП – кріоконсервовані клітини плаценти

КП – клітини плаценти

Од ОЩ – одиниці оптичної щільності

РБТЛ – реакція бласттрансформації лімфоцитів

СПКЯ – синдром полікістозних яєчників

УО – умовні одиниці

ХТ – хіміотерапія