

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І КРІОМЕДИЦИНИ НАН УКРАЇНИ**

ШЕПІТЬКО ВОЛОДИМИР ІВАНОВИЧ

УДК 611-013.85:611.1/.4:616-089.843

**СТРУКТУРНО-ФУНКЦІОНАЛЬНІ ПОКАЗНИКИ КРІОКОНСЕРВОВАНОЇ ПЛАЦЕНТИ І
ВПЛИВ ЇЇ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ НА МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН РЯДУ
ВНУТРІШНІХ ОРГАНІВ**

14.01.35 – кріомедицина

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня доктора медичних наук

Харків – 2004

Дисертацією є рукопис

Дисертація виконана в Інституті проблем кріобіології і кріомедицини Національної Академії наук України.

Науковий консультант: академік НАН України, доктор медичних наук, професор
ГРИЩЕНКО Валентин Іванович, Інститут проблем кріобіології і кріомедицини Національної Академії наук України, директор

Офіційні опоненти:

доктор біологічних наук, старший науковий співробітник **Розанов Леонід Федорович**, Інститут проблем кріобіології і кріомедицини Національної Академії наук України, провідний науковий співробітник відділу НТІ;

доктор медичних наук, професор **Масловський Сергій Юрійович**, Харківський державний медичний університет МОЗ України, завідувач кафедри гістології, цитології і ембріології;

Лауреат Державної премії в галузі науки і техніки України, доктор медичних наук, професор **Григор'єва Тамара Григорівна**, Харківська медична академія післядипломної освіти МОЗ України, професор кафедри травматології, ортопедії і комбустіології, керівник клініки термічної та пластичної хірургії.

Провідна установа

Національний медичний університет ім. акад. О.О.Богомольця МОЗ України, кафедра оперативної хірургії і топографічної анатомії, м. Київ.

Захист відбудеться „_____” _____ 2004 р. о „_____” годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 64.242.01 при Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (61015, м. Харків, вул. Переяславська, 23).

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (61015, м. Харків, вул. Переяславська, 23)

Автореферат розісланий „_____” _____ 2004 р.

Вчений секретар спеціалізованої вченої ради

член-кореспондент НАН України,

доктор медичних наук, професор

Гольцев А.М.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Особливо інтенсивний розвиток клітинної і тканинної трансплантації як фактора, що впливає на гомеостаз організму, спостерігається в останні 10–15 років (В.И.Грищенко, 1993, 1999, 2001; В.И.Кулаков и соавт., 1994; В.С.Репин, 1998; Г.Т.Сухих, 1998; Г.Т.Сухих и соавт., 1998; В.И.Грищенко, А.Н.Гольцев, 2002). Це відкриває нові можливості в терапії важко виліковних станів, бо в деяких випадках фармакологічні засоби не мають ефекту, що спонукає до пошуку альтернативних шляхів впливу на організм із метою активації природного потенціалу адаптивних та репаративних можливостей цілісного організму (Н.В.Васильев и соавт., 1996; А.Ю.Петренко, А.Н.Сукач, 1998).

Актуальність теми. Досягнення сучасної кріобіології, яка розробляє методи низькотемпературного консервування клітин і тканин, визначають успіхи трансплантології. Значною мірою на результати трансплантації впливає ступінь ушкодження біологічних об'єктів під час їхньої підготовки до консервування. Для клінічного застосування використовується тільки функціонально повноцінний донорський матеріал. Вивчення процесів, які відбуваються в тканинах на етапах кріоконсервації та гіпотермічного зберігання, надзвичайно важливе з практичних позицій. Це дозволяє встановити ті безпечні терміни використання трансплантаційного матеріалу, при яких зберігається його достатня життєздатність. Остання необхідна для їхнього повноцінного функціонування в організмі реципієнта (Т.Н.Юрченко и соавт., 1998, 2001; И.П.Высеканцев и соавт., 2001; А.Ю.Петренко и соавт., 2001; А.А.Цуцаева, 2001). Короткострокове гіпотермічне і низькотемпературне консервування та подальше тривале низькотемпературне зберігання з метою трансплантації становлять загальнобіологічний інтерес і вимагають усебічних досліджень. Дані літератури про вплив низьких температур суперечливі, а в окремих випадках і прямо протилежні. Це пояснюється тим, що експерименти проводилися на різних біологічних об'єктах. Крім того, варіація швидкостей охолодження, застосування різних кріопротекторів при заморожуванні, а також швидкість відігрівання впливають на отримані результати дослідження (В.И.Грищенко, 1993).

Плацента – це високоактивна залоза внутрішньої секреції, що містить велику кількість ростостимулюючих факторів як природне „депо” різних біологічно активних речовин (В.И.Грищенко и соавт., 1996, 1999; В.С.Репин, 1998). Вони забезпечують ріст і розвиток організму плоду. Нині показаний позитивний вплив трансплантації плаценти при ішемічній хворобі серця (К.В.Шепітько, 2004) та цукровому діабеті (Л.С.Бобирьова, 2003; І.Л.Дворник, 2004). Плацента –це імуногенний орган з яскраво вираженими імунними функціями за рахунок репродуктивних протеїнів (С.В.Ширшев, Н.Н.Кеворков, 1991; В.И.Говалло, 1996; Г.Т.Сухих и соавт., 1998). Хоріонічний гонадотропін активує Т-лімфоцити і діє як активатор імунної системи в цілому, а хоріонічний адренотропний гормон забезпечує прямий і зворотний зв'язок між

нейроендокринною та імунною системами; ендорфінам і енкефалінам притаманний також імуномодельючий ефект (В.Е.Радзинский и соавт., 1982; А.Ю.Анишин и соавт., 1994; А.В.Дацюк и соавт., 1996). У плаценті відбувається синтез білків із класу інтерлейкінів, однією з функцій яких є індукція гуморальних факторів неспецифічної резистентності та стимуляції репарації за рахунок активації мезенхімальних клітин і процесів неоваскуляризації (С.В.Ширшев, 1993). Таким чином, трансплантація плаценти може етіопатогенетично впливати на клінічні прояви хвороби і стабілізацію основних показників гомеостазу.

Експериментальні, зокрема, морфологічні дані дозволяють констатувати, що після трансплантації фрагментів плаценти виникає стимуляція ендокринних органів, тканини печінки, селезінки, яєчників, поліпшення трофіки серцево-судинної системи, підвищення здатності тканин до репарації. Трансплантація пацієнтам кріоконсервованих фрагментів плаценти впливає на органи-мішені, стимулюючи їхню функцію і підвищуючи неспецифічну резистентність організму до несприятливих факторів зовнішнього середовища і стресових ситуацій (И.Ю.Кузьмина и соавт., 1995; А.И.Аутеншлюс и соавт., 1997; В.И.Грищенко, 1999; О.В.Прибылова 1997).

Отже, виникає проблема системного аналізу дії трансплантованої нативної і кріоконсервованої плаценти на морфогенез органів і, зокрема, з'ясування відмінності їхньої дії. Даних літератури щодо цієї проблеми надто мало, що, з урахуванням імуномодельючої і гормонопродукуючої функції плаценти, зумовлює необхідність додаткових досліджень.

Як відомо, запалення - центральна проблема медицини, оскільки лежить в основі більше 70% патологій у людей. Наразі важливе місце в розв'язанні цієї проблеми займає розробка нових методів протизапальної терапії – шляхом створення і дослідження дії тканинних препаратів, особливо плаценти. Наявність великої кількості біологічно активних речовин забезпечує значний біостимулюючий ефект цих препаратів і широко використовується в клінічній практиці як протизапальний засіб. При цьому велике значення має дослідження похідних показників стану плаценти як основи розробки надійних методів збереження біологічних властивостей тканин і використання низьких температур як фактора, який екстрагує біологічно активні речовини (Н.П.Суббота и соавт., 1996; В.И.Грищенко, 1999).

В Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України розроблений метод кріоконсервації плаценти. В Українському банку біологічних об'єктів накопичена велика кількість зразків цієї тканини. Лабораторні дослідження показують, що після кріоконсервування в тканині плаценти не відбувається зниження рівня біологічно активних речовин, а робота на базі Банку біологічних об'єктів дозволяє провести ретельне тестування матеріалу для гарантування безпеки реципієнта.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота виконана в рамках комплексної науково-дослідної теми Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України

2.2.6.72. „Вплив охолодження на структурно-функціональні показники клітин з різною проліферативною активністю”, а також проблеми 2.28.7.4. в темі 2.2.6.02. Національної Академії наук України „Структурно-метаболический і функціональний стан клітин фетоплацентарного комплексу після кріоконсервування та гіпотермічного збереження” та „Розробка нових кріобіологічних технологій, використання кріоконсервованих ембріональних клітин, тканин людини та тварини в медицині”, № державної реєстрації 0199U000323.

Мета і завдання дослідження. Метою даного дослідження є обґрунтування впливу гіпотермії та низьких температур на морфофункціональну характеристику плаценти і біологічно активних речовин, що містяться в ній, оптимізація технології кріоконсервування і довгострокового її зберігання, експериментально-морфологічне визначення динаміки реакції внутрішніх органів (печінки, селезінки, тимуса, надниркових залоз, яєчників) на трансплантацію аlogenної нативної і кріоконсервованої плаценти, а також вплив біологічно активних речовин плаценти на перебіг запалення.

Завдання дослідження:

1. Вивчити структурно-функціональні показники плаценти, яка виділена після кесаревого розтину, як вихідного матеріалу для подальшої кріоконсервації.
2. Визначити вплив термінів гіпотермічного зберігання як підготовчого етапу до кріоконсервації на активність деяких дегідрогеназ у плаценті.
3. Визначити вплив кріопротектора (диметилсульфоксиду) на активність дегідрогеназ плаценти при її кріоконсервації та низькотемпературному зберіганні.
4. Визначити вплив різних режимів гіпотермічного та низькотемпературного зберігання на вміст деяких ферментів і біологічно активних сполук у кріоконсервованій плаценті.
5. Вивчити стан прооксидантно-антиоксидантної системи, білка і гормонів у кріоконсервованій плаценті в різних режимах гіпотермічного та низькотемпературного зберігання.
6. Дослідити характер морфологічних перебудов у внутрішніх органах (печінка, селезінка, надниркові залози, яєчники, тимус) та виявити закономірності їхньої реакції в експериментальних тварин після трансплантації нативного і кріоконсервованого фрагмента плаценти в системі алотрансплантації в різні (до 60 діб) терміни післяопераційного періоду.
7. Дослідити зміни клітинної динаміки в осередку запалення, викликаного введенням λ -карагіненом, а також динаміку деяких показників периферичної крові експериментальних тварин на тлі дії біологічно активних речовин плаценти.
8. Виявити вплив біологічно активних речовин плаценти на реакцію тучних клітин при асептичному запаленні, викликаному введенням λ -карагіненом.

Об'єкт дослідження. Нативний і кріоконсервований препарати плаценти; регенерація органів (печінка, селезінка, надниркові залози, яєчники, тимус); експериментальний запальний

процес.

Предмет дослідження. Вплив охолодження різної глибини на структурно-функціональні показники плацентарної тканини та оптимізація процесів її холодового зберігання. Вплив трансплантації алогенної нативної і кріоконсервованої плаценти на фізіологічну регенерацію органів (печінку, селезінку, надниркові залози, яєчники, тимус) і перебіг експериментального запального процесу.

Методи дослідження. Для проведення дослідження використані методи морфологічного, гістохімічного, біохімічного та статистичного аналізу.

Наукова новизна одержаних результатів. Уперше на підставі отриманих даних науково обґрунтовані режими довгострокового зберігання плаценти, що дозволило вдосконалити відомі способи її кріоконсервації.

Уперше встановлені зміни активності деяких дегідрогеназ (сукцинатдегідрогенази, лактатдегідрогенази, α -гліцерофосфатдегідрогенази, нікотинаміддинуклеотиддегідрогенази, нікотинаміддифосфатнуклеотиддегідрогенази), а також зміни прооксидантно-антиоксидантної системи (первинних, вторинних і кінцевих продуктів ПОЛ) у різних режимах гіпотермічного та низькотемпературного зберігання фрагментів плаценти. Виявлений вплив різних режимів гіпотермічного та низькотемпературного зберігання на вміст деяких біологічно активних речовин (пролактин, тестостерон, кортизол), що дозволило оптимізувати процес заготівлі та зберігання плацентарної тканини для подальшого клінічного застосування. Встановлені оптимальні режими низькотемпературного зберігання.

Уперше встановлено, що підшкірна трансплантація нативної і кріоконсервованої плаценти супроводжується вираженим стимулюючим впливом на структурні елементи досліджених органів, що пояснюється наявністю в її тканині великої кількості фетальних білків та біологічно активних речовин. При трансплантації кріоконсервованої плаценти реакції регенераторного типу в тварин більш виражені, ніж при трансплантації нативної плаценти, але в обох випадках вони перебувають у межах фізіологічної регенерації.

Уперше проведене комплексне порівняльне дослідження деяких показників стану периферичної крові, а також морфологічних змін у вогнищі запалення у тварин з експериментальним асептичним запаленням при трансплантації біологічно активних речовин плацентарного походження та експериментально обґрунтована доцільність їх застосування, завдяки чому розвинуті теоретичні уявлення про перебіг запалення та способи його лікування.

Практичне значення одержаних результатів. Установлені оптимальні умови низькотемпературного зберігання кріоконсервованої плаценти: а) зберігання 1 добу при -20°C ; б) зберігання 1 добу при -20°C та 1 рік - при -196°C .

Одержані результати поглибили уявлення про регенераторно-репаративні процеси у

внутрішніх органах (печінці, селезінці, надниркових залозах, яєчниках, тимусі) при трансплантації нативної і кріоконсервованої плаценти.

Розвиток запалення на тлі застосування похідних плаценти проявляється помітним пригніченням нейтрофільної і підсиленням макрофагально-фібробластичної реакції. Протизапальний ефект після трансплантації плаценти проявляється пригніченням альтеративних і посиленням репаративних процесів.

Результати дослідження дали можливість обґрунтувати (Патент України № 59266 А) доцільність застосування трансплантації кріоконсервованої плаценти на тлі базисної терапії у хворих на ІХС стабільної стенокардії напруження.

Проведене дослідження дало можливість розробити нові ефективні методи комплексного лікування хворих на інсулінозалежний цукровий діабет (Патенти України № 32254 А, 32255 А, 32295 А, 39046 А).

Теоретичні положення і практичні рекомендації дисертаційної роботи впроваджені в навчальний процес кафедр оперативної хірургії і топографічної анатомії, патологічної анатомії, патологічної фізіології, ендокринології, факультетської терапії Української медичної стоматологічної академії, патологічної фізіології Харківського державного медичного університету.

Особистий внесок здобувача. Отримані дані є результатом самостійної роботи автора. Дисертантом самостійно розроблена експериментально-дослідна програма, персонально проаналізована наукова література з вивченням проблеми, проведений інформаційний пошук, сформульовані мета і завдання дослідження, а також засоби їх вирішення. Всі експериментальні операції на тваринах із подальшими морфологічними дослідженнями (гістологічним, гістохімічним та морфометричним) виконані за безпосередньої участі автора. Проведений аналіз результатів дослідження, обґрунтування основних положень дисертаційної роботи, висновків та практичних рекомендацій.

З огляду на широке використання суміжних дисциплін, робота виконана за консультативної та методичної допомоги відділу кріоморфології ІПКіК НАН України (завідувачка відділу д.мед.наук, професор Т.М.Юрченко); кафедри патологічної фізіології ХДМУ МОЗУ (завідувач кафедри д.мед.наук, професор М.О.Клименко), за що автор висловлює їм щиру подяку. Самостійно проведена статистична обробка результатів і зроблені попередні висновки. Дисертантом спільно з науковим консультантом були інтерпретовані отримані результати і зроблені остаточні висновки. Опубліковані основні результати досліджень у фахових виданнях, запатентовані винаходи.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертації доповідалися та обговорювалися на II Всесвітньому конгресі тканинних банків і VIII Міжнародній конференції

Європейської асоціації тканинних банків (Польща, Варшава, 1999); на I Національному з'їзді трансплантологів України (Київ, 2000); на II Російському конгресі патофізіологів із міжнародною участю „Патофизиология органов и систем. Типы патологического процесса” (Москва, 2000); на симпозіумі з проблем тканинних банків із міжнародною участю „Биоимплантология на пороге XXI века” (Москва, 2001); на Всеукраїнській науковій конференції „Успехи и перспективы развития криобиологии и криомедицины” (Харків, 2001); на науково-практичній конференції з міжнародною участю „Сучасні методи наукових досліджень у морфології та патології” (Полтава, 2003); на Пленумі Асоціації ендокринологів України (Львів, 2003); на Міжнародній науково-практичній конференції „Проблеми клітинної і тканинної трансплантації” (Ів.-Франківськ, 2003); на IV Національному конгресі патофізіологів України з міжнародною участю (Чернівці, 2004); на Пироговських читаннях (Вінниця, 2004).

Публікації. Результати дисертаційного дослідження викладені в 35 друкованих працях. 19 друкованих праць, з яких 10 одноосібних, опубліковані в центральних фахових виданнях, ліцензованих ВАК України. Отримано 5 патентів України. Опубліковано 11 тез доповідей у матеріалах і тезах з'їздів, конференцій, конгресів, симпозіумів.

Основні положення дисертаційної роботи увійшли в наукову працю „Розробка на базі фундаментальних досліджень нових біотехнологій одержання клітинних і тканинних алотрансплантатів”, відзначену Державною премією України в галузі науки і техніки за 2002 рік.

Структура дисертації. Дисертаційна робота викладена на 326 сторінках машинописного тексту, складається з вступу, розділів „Огляд літератури”, „Матеріал і методи дослідження”, 4-х розділів власних досліджень, обговорення результатів дослідження, висновків, списку використаних літературних джерел. Список літератури містить 490 назв, із них 358 кирилицею і 132 латиницею. Робота ілюстрована 96 рисунками (з них 19 графіки), які представлені за текстом, та 16 таблицями, з яких 11 представлені за текстом.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали та методи дослідження. Дослідження проведене на 332 об'єктах, із них виявлення структурно-функціональних показників нативної і кріоконсервованої плаценти без застосування кріопротектора та під його захистом проведене на 160 плацентах; морфофункціональна характеристика внутрішніх органів (печінки, селезінки, тимуса, надниркових залоз, яєчників) на трансплантацію алогенної нативної та кріоконсервованої плаценти проведена на 58 кроликах-самках породи „Шиншила”; вивчення впливу біологічно активних речовин плаценти на перебіг запалення проведене на 114 щурах лінії Вістар.

Морфологічна характеристика плаценти, яка використовувалася для кріоконсервування та трансплантації. Вихідним матеріалом для одержання кріоконсервованих

препаратів служила плацента, взята після кесаревого розтину при доношеній вагітності. Збір матеріалу проводився на базі 5-го міського пологового будинку м. Харкова в гінекологічному відділенні № 2 згідно з вимогами законодавчих актів України та Європейської асоціації тканинних банків із дотриманням відповідних етичних і юридичних норм. Протипоказаннями для одержання біоматеріалу були: наявність в анамнезі матері вірусного гепатиту, туберкульозу, сифілісу, гонореї, СНІДу, цитомегаловірусної інфекції, токсоплазмозу, герпесу, а також перенесених у період вагітності кору і краснухи.

Зразки тканин підлягали гістологічному дослідженню з використанням гістологічних та гістохімічних методів. Серійні парафінові та свіжозаморожені зрізи використовували для імунофлюоресцентного дослідження. Препарати вивчалися за допомогою люмінесцентного мікроскопа МЛ-9 (Г.А.Меркулов, 1961).

Дослідження біологічних характеристик кріоконсервованої плаценти. Білки. Для визначення розподілу білків за молекулярною масою у плаценті використовували метод електрофорезу. Відносну кількість білків у смужках визначали вимірюванням оптичної щільності гелю при довжині хвилі 610 нм. Вимірювання проводились на денситометрі АФ-1. Використовували фосфорилазу, альбумін, карбонгідразу, інгібітор трипсину. **Екстракцію ліпідів** проводили за допомогою хлороформ-метанолової суміші. Висушену плівку ліпідів розчиняли двома порціями хлороформу і переносили у флакони, які тримали в морозильнику холодильника до початку проведення аналізу ліпідного складу методом тонкошарової хроматографії. **Нейтральні ліпіди і фосфоліпіди** розділяли на пластинках із шаром селікогелю G-0,25 (Merck, Німеччина) методом одно- і двовимірного ТСХ. **Прогестерон та естрадіол** визначали радіоімунологічним методом, **пролактин і ХГ** - імуоферментним методом. **Кальцій, неорганічний фосфор, мідь, магній** визначали уніфікованими клінічними методами за допомогою реактивів Lachemia (Чехія). Вміст **калію і натрію** досліджували методом плазмової (полум'яної) фотометрії, **хлору** – методом меркуриметричного титрування.

Дози препаратів: кріоконсервована плацентарна тканина була розмірами 1,5x1,5 см, об'ємом 1,7–2,0 мл. Екстракт плаценти – об'ємом 1 мл, уміст білка (1,5 мг/мл).

Гістохімічне дослідження активності дегідрогеназ. У контрольну групу увійшли зразки нативної плаценти. У другу групу увійшли зразки плаценти, які витримувалися 1 добу при 4°C. У третю групу – зразки, які витримувалися 2-ї доби при 4°C. Зразки закладали в холодильну камеру (4°C) з метою їхнього гіпотермічного зберігання протягом 1-ї і 2-х діб.

Дослідження проводилося на кріостатних зрізах плаценти жінок, де дозувалися субстрати, а також розчин нітросинього тетразолію (НСТ) для сукцинатдегідрогенази (СДГ), лактатдегідрогенази (ЛДГ), α -гліцерофосфатдегідрогенази (α -ГФДГ), а також НАДН і НАДФН-дегідрогеназ (НАДНДГ, НАДФНДГ). Розрахунок кількості диформагану проводився за

допомогою телевізійного мікроскопа-фотометра із застосуванням методу кількісної гістохімії і фотометричного аналізу, які традиційно використовуються для оцінювання активності окислювально-відновних ферментів.

Паралельно ці зрізи інкубували з диметилсульфоксидом, порівнювали активність дегідрогеназ із контрольними зрізами після заморожування-розморожування.

Дослідження перекисного окислення ліпідів (ПОЛ). Зразки плаценти були отримані після кесаревого розтину. З кожної плаценти бралось по 5 зразків розмірами 3,0 на 3,0 см. Контролем була нативна плацента. У другу групу ввійшли зразки, які витримувалися 1 добу при 4°C. У третю групу – зразки, які витримувалися 1 добу при –20°C. У четверту групу – зразки, які витримувалися 1 добу при –20°C, а потім 1 рік - при –196°C. У п'яту – зразки, які витримувалися 1 добу при –196°C, а потім 1 рік - при –20°C.

Визначення первинних і кінцевих продуктів перекисного окислення ліпідів (ПОЛ). У гептаноізопропіловому екстракті плаценти визначали ступінь ненасиченості подвійних зв'язків у ліпідах на спектрофотометрі СР-46 (кількість подвійних зв'язків (ПЗ) при 220 нм), уміст первинних продуктів пероксидації (дієнових кон'югатів (ДК) при 233 нм, триєнових кон'югатів (ТК) при 265 нм, оксидієнових (ОДК) при 287 нм). Вторинні продукти пероксидації визначали за їхньою реакцією в кислому середовищі з 2-тіобарбітуровою кислотою з подальшим спектрофотометруванням триметинового комплексу при 532 нм (до 40% вторинних продуктів пероксидації складає малоновий діальдегід (МДА). Кінцеві продукти пероксидації (шифові основи (ШО) визначали спектрофотометрично при 400 нм у ліофільному екстракті плаценти. Використовувались реактиви фірми „Серва" (Німеччина). Для визначення одного з основних антиоксидантів – відновленого глутатіона - використовували реактив Елмана з подальшим спектрофотометруванням при 412 нм.

Визначення біологічно активних речовин (БАР). Уміст біологічно активних речовин у плаценті (гормони: пролактин, тестостерон і гідрокортизон) вимірювали методом твердофазного імуноферментного аналізу, використовуючи готові тест-системи „Алькор-біо" (С.-Петербург, Росія).

Визначення білка. Визначення кількості білка проводили біуретовим методом (Державна Фармакопея ХІ, вип. 2, С. 35).

Усі вимірені в плаценті абсолютні величини, а також уміст продуктів ПОЛ були віднесені до 1 г білка у пробі.

Морфологічні методи дослідження реакції внутрішніх органів на трансплантацію нативної і кріоконсервованої плаценти. Для дослідження реакції структурних елементів внутрішніх органів на трансплантацію нативної і кріоконсервованої плаценти були виділені органи: печінка, селезінка, надниркові залози, яєчники і тимус.

Експеримент проведений на 58 статевих зрілих кролицях-самках породи „Шиншила” вагою 1500–1650 г. Вік – 8–9 місяців. Контролем служили органи інтактних тварин. У другій групі – (Розріз) – проводився розріз шкіри в межах спини довжиною 3 см з подальшим накладанням кетгутового шва без трансплантації плаценти. У третій групі проводилась трансплантація нативної плаценти (ТНП). У четвертій групі проводилась трансплантація кріоконсервованої плаценти (ТКП). Трансплантація ТНП і ТКП проводилась у підшкірний карман у межах спини методом, розробленим в Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (м. Харків). Нативна і кріоконсервована плацента була розмірами 1,5х1,5 см об'ємом 1,7–2,0 мл. Трансплантація проводилась під загальним тіопенталовим наркозом. У терміни 2, 7, 14, 30, 60 діб після трансплантації тварин піддавали евтаназії згідно з „Правилами використання лабораторних експериментальних тварин” (1984, додаток 4) і Гельсінською декларацією про гуманне ставлення до тварин.

Гістологічне дослідження органів проведене загальноприйнятими методами.

Характеристика експериментальних об'єктів дослідження при експериментальному запаленні. У роботі використані 114 щурів-самців лінії Вістар масою 220–250 г., які знаходились у віварії Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАНУ на стандартному утриманні. Для виключення сезонних і добових коливань досліджуваних показників усі дослідження проведені в осінній період у ранковий час.

Моделлю запалення служило гостре асептичне запалення м'яких тканин стегна щурів, що виникало внаслідок введення 5 мг λ -карагінену ("Sigma", США) в 1 мл ізотонічного розчину хлориду натрію (Н.П.Александров, Т.В.Сперанская, 1988). Карагінен – це сульфатизований глікозаміноглікан, який виділений з ірландського морського моху Chondrus і використовується в ролі флогогена, що активує нейтрофіли.

Препарат плаценти вводився внутрішньом'язово дозою 0,5 мл із умістом білка 1,5 мг/мл 1 раз за добу протягом усього експерименту. Контрольним тваринам вводився 1,0 мл фізіологічного розчину. Тварин піддавали евтаназії (під ефірним наркозом) через 6, 12 годин, на 1-у, 2-у, 3-ю, 5-у, 7-у, 10-у, 14-у добу після введення λ -карагінену. На кожний термін брали по 6 тварин.

Статистичний аналіз отриманих результатів проводили за критерієм Ст'юдента.

Результати дослідження

Дослідження зміни морфологічної характеристики і біохімічного складу плаценти в різних режимах кріоконсервування і низькотемпературного зберігання. Для трансплантації використовувалась плацента з центральної та крайової зон. Проводився загальний огляд, визначались об'єм хоріальної та базальної пластинок, строми ворсин, судинного русла, хоріального епітелію, а також зон інфарктів, крововиливів, кальцифікатів плаценти, вага плаценти,

плацентарно–плодовий коефіцієнт. Гістологічне дослідження проведене з використанням гістологічних та гістохімічних методів.

Загальним візуальним дослідженням контрольної групи виявлено, що практично в усіх випадках плаценти мали округлу чи овальну форму, однорідну губчасту консистенцію. Плодові оболонки були тонкі, еластичні, блискучі, рожевого кольору. При огляді материнської поверхні наявних дефектів не виявлено, часточковість була добре вираженою. Плодова поверхня була гладкою, блискучою. Будова котиледонів залежить від особливостей гілок пуповинних артерій і місця прикріплення пуповини. Прикріплення пуповинного канатика в 78,6% випадках було парацентральною, у 9,4% – центральним, у 12% – периферичним або оболонковим. Розрізняють три типи розподілу судин пуповини: магістральний, розсипний і змішаний. Найпоширеніші змішаний і розсипний типи, які спостерігаються при парацентральному прикріпленні пуповини в 65,8% спостережень. Магістральний тип частіше зустрічається за периферичного або оболонкового прикріплення пуповини (34,2%). За розсипного типу будови основні (котиледонні) артерії першого порядку розташовуються в центральній частині стовбурної ворсини. Вони розгалужуються на 2–7 артерій другого порядку, що поділяються на тонші гілки третього порядку (інтракотиледонні) й утворюють сферичну судинну систему – субкотиледон. У так званій магістральній плаценті основні артерії можуть відразу розгалужуватися на тонкі стовбури третього порядку.

Епітелій містить клітини зі слабо базofilною цитоплазмою, ядра клітин містять еухроматин, на мембрані нашаровуються глікопротеїди. Амніон лежить на колагенових волокнах хоріальної пластинки. Встановлено, що деякі розширення амніон-хоріального простору зумовлені набряком. Судини повнокровні, навколо судин розташовані колагенові волокна. Хоріон має крупні стовбурові ворсини з центрально розташованими судинами. Дефекти епітелію крупних ворсин закриті фібриноідом, серед якого є веретеноподібні, інколи двох'ядерні, клітини, що вказує на наявність адаптаційних процесів та велику інтенсивність обміну речовин. Виявляються фігури мітозу. Велика інтенсивність обміну речовин підтверджується багатоядерністю (5–7) синцитіотрофобласта. Наявні кислі глікозаміноглікани. Виявляються малі частки інфарктів і кальцифікатів, що відповідає ознакам доношуваності. У цілому наявні значні відмінності адаптаційних процесів між крайовою та центральною частинами плаценти.

Нами встановлено, що численні функції плаценти пов'язані з виробленням речовин білкової природи. Розділення білків за молекулярною масою проводили в градієнтному гелі 8–25% акриламід у при загальній концентрації білків 1,9–2,4 мг/мл. Після електрофоретичного фракціонування білків їх умовно можна розділити на 3 групи: 1) високомолекулярні, з м.м. 100 кДа, як правило, такі білки є складовою частиною цитоскелета клітин, 2) білки з м.м. 30–100 кДа, які здебільшого функціонально представлені білками-ферментами, що беруть участь у

забезпеченні життєдіяльності клітин і тканин, і 3) низькомолекулярні білки і пептиди з м.м. менше 30 кДа, які належать до секретованих регуляторними або біологічно активними компонентами тканин. На електрофограмі наявні три основні білкові піки, що відповідають молекулярним масам 14,5 кДа, 28,5 кДа і 67 кДа, а також фракція 55 кДа. Білки молекулярною масою від 28 кДа і вище складають біля 50% усіх білків зразка плаценти, причому максимальна кількість їх міститься в білковій смузі, що відповідає 29 кДа. Уміст середньомолекулярних білків 50 кДа складає приблизно 30% від загальної кількості білків у зразках. Білковий пік, що відповідає молекулярній масі 67 кДа, складає близько 15% від загальної кількості білка.

Альфа-фетопротейн (АФП) - це специфічний ембріональний білок, що продукується у великих кількостях під час ембріогенезу. Відомо, що він синтезується головним чином клітинами печінки та іншими органами (Г.И.Абелев, 1994). Нами вивчена концентрація АФП у плаценті. Вона складала від 371 до 797 мМО/мл, у середньому – $584,2 \pm 150,5$. Таким чином, показано, що в плаценті наявні високі концентрації АФП, які визначають імуносупресивний ефект плаценти при трансплантації і відсутність імунологічних реакцій в організмі реципієнта. Безсумнівно, що це один із важливих механізмів дії трансплантації плаценти.

На хроматограмі ліпідного екстракту плаценти представлені фосфоліпіди, моногліцериди, холестерин, вільні жирні кислоти, тригліцериди й ефіри холестерину; виявляються також невеликі плями лізофосфатиділхоліну і цереброзидів, представлені двома класами цих видів молекул із жирними оксикислотами; наявні також плями фосфатидної кислоти – найпростішого представника природних фосфогліцеридів – і деякі не ідентифіковані фракції. Таким чином, уміст у препаратах плаценти широкого спектра ліпідів різноспрямованої дії дозволяє припустити, що при введенні в організм вони будуть впливати не тільки на структурну організацію мембранних компонентів клітин, але й на різні метаболічні процеси як попередники вторинних посередників дії гормонів, ейкозаноїдів (діацилгліцерол, інозитолфосфат, арахідонова кислота), а також як енергетичний матеріал.

Біологічна роль вітамінів значна, оскільки вони необхідні для перебігу нормального обміну речовин. Група жиророзчинних вітамінів: А (ретинол) – за нашими даними – його вміст у плаценті $0,67 \pm 0,10$ мкмоль/л – сприяє синтезу протеогліканів та гліколіпідів, як гормон активує поділ та спеціалізацію клітин епітеліальної та сполучної тканини. Вітамін Е (токоферол), за нашими даними, його вміст у плаценті становить $120,33 \pm 2,76$ мкмоль/л, є активним антиоксидантом, стимулює синтез деяких ядерних регуляторних білків, скорочувальних білків скелетних та гладких м'язів, міокарда. Вітамін Д₃ (кальциферол), за нашими даними, його вміст у плаценті складає $100,33 \pm 9,94$ мкмоль/л, активує на генному рівні як гормон синтез кальцій-зв'язувальних білків та стимулює імунну систему.

Водорозчинні вітаміни групи В: В₁ (тіамін), за нашими даними, вміст його в плаценті

складає $32,28 \pm 3,66$ нмоль/л, бере участь в окисному декарбоксилюванні α -кетокислот (пірувата і α -кетоглутаратдегідрогенази) і 2-кетозукрів (транскетолази), сприяє переходу від анаеробної до аеробної енергетики. В6 (піридоксин) , за нашими даними , його вміст у плаценті складає $224,67 \pm 8,75$ нмоль/л, виконує трансамінування і декарбоксилювання (багато амінотрансфераз і декарбоксилаз) для синтезу нейромедіаторів. В12 (кобаламін), за нашими даними, його вміст у плаценті складає $0,73 \pm 0,02$ нмоль/л, потрібен для синтезу метіоніну та гему. Таким чином, проведений аналіз показує, що в плаценті наявні різні водо- і жиророзчинні вітаміни.

Аналіз особливостей будови і функціонування плаценти, використаної нами для одержання препаратів, дає можливість припустити певну спрямованість дії отриманих препаратів. Це значною мірою стосується вмісту в них деяких важливих для життєдіяльності людини гормонів, тому що ендокринній системі в організмі людини належить одна з основних регуляторних функцій (И.А.Волчегорский и соавт., 1989; Н.Н.Скалецкий, В.И.Шумаков, 1996).

Відомо, що хоріонічний гонадотропін (ХГ) (концентрація його в плаценті складає, за нашими даними, $1100,3 \pm 16,05$ мМО/мл) належить до пептидних гормонів і утворюється клітинами Ланганса ворсинок плаценти. Цей глікопротеїд стимулює строїдогенез у жовтому тілі яєчника і його інтенсивність. Концентрація ХГ найбільша на поверхні мікроросинок, клітин периферичного трофобласта і клітинних острівців.

До групи пептидних гормонів належить також пролактин, який необхідний для підтримання функції жовтого тіла. Пролактин - маотропний гормон, концентрація його в плаценті складає, за нашими даними, $25,36 \pm 7,69$ мМО/мл . Це білок, який має широкий спектр дії, підсилює ефект стероїдів на вторинні статеві органи самців, має еритропоетичну дію, регулює жировий обмін і разом з адренкортикотропним гормоном нормалізує водно-сольовий обмін.

Другою групою гормонів, відповідно до хімічної класифікації, є стероїдні гормони, до яких належать плацентарні естрогени (жіночі статеві гормони), синтез яких може відбуватися тільки у разі нормального функціонування плодової і плацентарної систем метаболізму. Найбільш активний естроген – естрадіол, концентрація його в плаценті складає, за нашими даними, $755,0 \pm 47,7$ пг/моль. Як і всі стероїдні гормони, він активує синтез певних білків на генному рівні.

За нашими даними, вміст прогестерону в плаценті складає $325,7 \pm 110,0$ нг/моль. Він виробляється в яєчниках лютеїновими клітинами жовтих тіл (плацентою), сприяє проходженню яйцеклітин через яйцепроводи й утворенню їхньої білкової оболонки. Його фізіологічна дія пов'язана в основному з підготовкою організму самок до вагітності та регуляцією процесів зачаття, пологів і лактації. У матці він викликає секреторні зміни ендометрію.

З огляду на унікальність гормонального складу й особливості функції плаценти, ми використовували її для одержання препарату – фрагмента плаценти, який, як переживаючий, може певний час продукувати в організм реципієнта БАР.

Як відомо, мікроелементи беруть участь у регуляції обміну речовин в організмі, і їхня біологічна роль визначається тим, що вони входять до складу таких біологічно важливих речовин як ферменти, гормони, вітаміни й ін. Іонний склад мінеральних речовин також суттєво впливає на фізико-хімічні властивості білків, змінюючи ступінь їхньої гідратації і розчинності. Виявлені нами високі концентрації іонів у плаценті свідчать про особливості її функції, спрямованої на корекцію метаболічних процесів для введення в організм. Отримані результати цікаві також з погляду, наприклад, тканинного дихання, а саме – процесу окисного фосфорилування, тому що, P_n – один з основних і необхідних компонентів його. Ці іони, виявлені в складі плаценти, входять до складу цитохромоксидази та супероксиддисмутази (Cu), кальцієвої месенджерної системи (Ca) і беруть участь у синтезі АТФ (P_n , Mg). Результати наших досліджень показують, що заморожування-розморожування сприятливо позначається на переході мікроелементів у водний екстракт, впливаючи на ступінь екстракції мікроелементів, що перебувають у більш твердих зв'язках із компонентами клітинних структур. Завдяки консервуванню тканини плаценти при 4°C концентрація мікроелементів стабілізується.

Розвиток автолізу в тканині плаценти розпочинається безпосередньо після отримання матеріалу, однак темпи його розвитку трохи уповільнені в порівнянні з іншими тканинами, що і створило передумови як для гіпотермічного зберігання, так і для низькотемпературної консервації, оскільки на етапах останньої обов'язково наявний фактор зберігання при помірно низьких температурах.

Для функціональної морфології важливе виявлення окислювально-відновних ферментів у клітинах і тканинах. Особливо велике значення має застосування цих методів у вивченні гіпоксичного стану тканини, яка розвивається, при підготовці біологічного об'єкта до трансплантації, у зв'язку з тим, що основним механізмом ушкодження при цьому є зниження споживання кисню, зміна перебігу окислювально-відновних реакцій у клітині та прогресуючі руйнації внутрішньоклітинних структур. Для визначення ступеня автолізу тканини у зв'язку з розвитком гіпотермії визначали гістохімічну активність п'яти дегідрогеназ. Причому враховували, що лактатдегідрогеназа (ЛДГ) локалізована в цитоплазмі, НАДФН-дегідрогеназа (НАДФНДГ) - в ендоплазматичній сітці, а сукцинатдегідрогеназа (СДГ), α -гліцерофосфатдегідрогеназа (α -ГФДГ), НАДН-дегідрогеназа (НАДНДГ) - на внутрішній мембрані мітохондрій.

При кріоконсервації найбільше знижувалась активність ферментів немітохондріального походження (ЛДГ - на 21 % і НАДФНДГ - на 16% на 2-у добу гіпотермії). Мітохондріальні ферменти суттєво не змінили активності, а для НАДНДГ вона навіть трохи збільшилася (рис. 1а). Отже, можна вважати, що виникають деякі порушення процесів гліколізу та мікросомального окислення.

Використання диметилсульфоксиду (Me_2SO) як кріопротектора майже не змінило

активності більшості ферментів, але суттєво збільшило активність НАДНДГ у нативній плаценті. Щодо α -ГФДГ є пояснення стабілізації її активності, пов'язане з активуючим впливом тироксину.

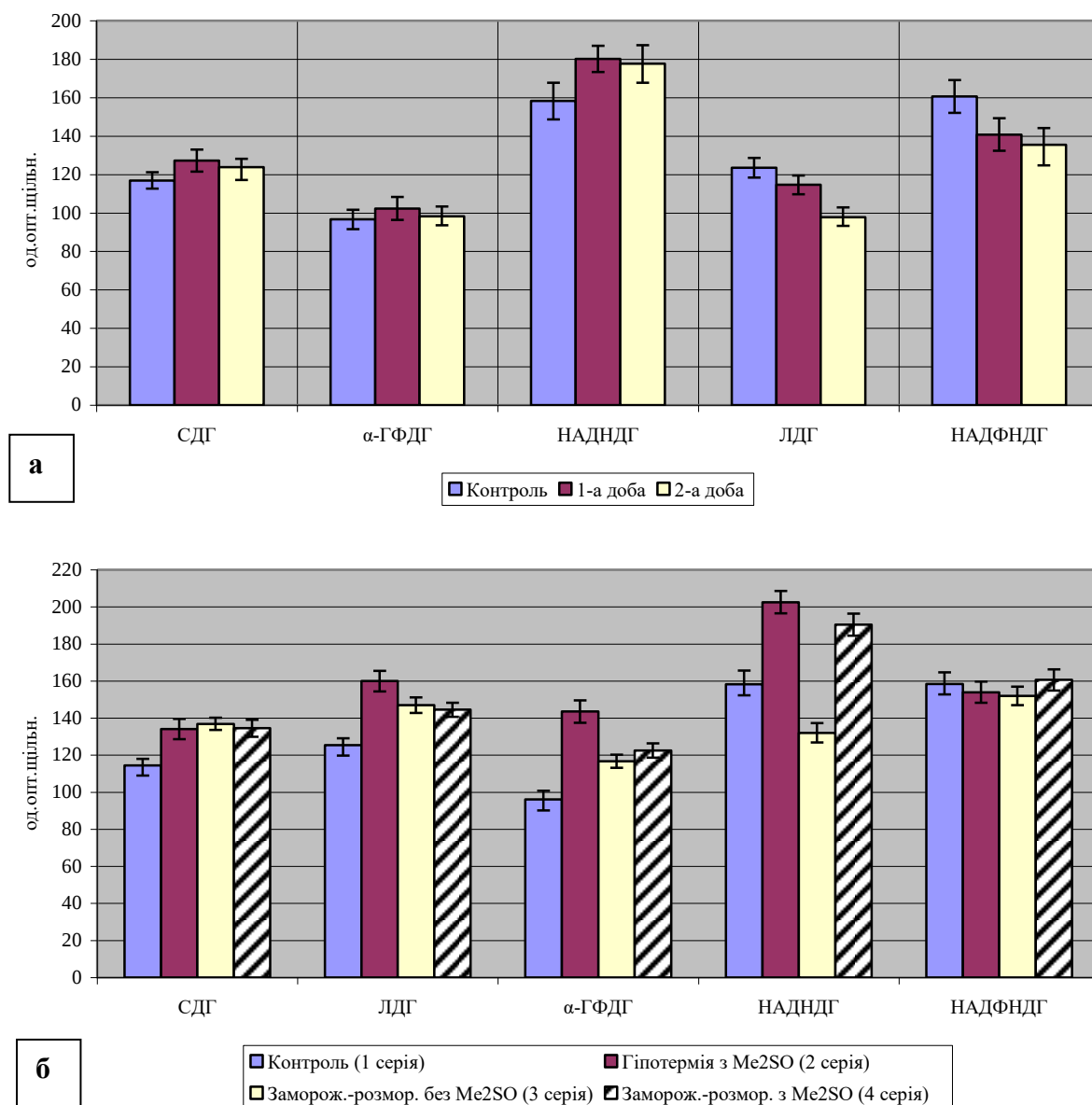


Рис. 1. Характеристика дегідрогеназ при гіпотермічному збереженні (а) та при низькотемпературному збереженні з кріопротектором і без нього (б).

Слід зазначити, що тимчасове зберігання в контрольній групі плаценти з додаванням кріопротектора теж сприяло підвищенню активності всіх досліджуваних ферментів, окрім НАДНДГ. Можна вважати, що диметилсульфоксид сприяє транспортуванню крізь мембрани субстратів цих ферментів. Отже, гіпотермію аеробні ферменти (НАДГДГ) витримують краще, ніж анаеробні (ЛДГ).

Розглядаючи розходження в поведженні ферментів при низькотемпературному консервуванні зразків нативної й обробленої кріопротектором плаценти, було встановлено, що експозиція в розчині кріопротектора Me₂SO приводить до суттєвого підвищення активності всіх

ферментів (за винятком НАДФНДГ, зміна активності якого статистично не вірогідна) на 17–49%, а саме: СДГ – на 17%, ЛДГ – на 28%, α -ГДФГ – на 49% і НАДНДГ – на 28% (рис. 16).

Аналіз наведених вище результатів дозволив запропонувати наше бачення механізму дії кріопротектора на перебіг і результат гістохімічних реакцій. Як проникаючий кріопротектор Me_2SO , вступаючи у взаємодію із субстратом або барвником, забезпечує краще проникнення цих речовин у різні тканинні структури, що забезпечує їхній доступ до активних центрів ферментів, а це приводить до збільшення кількості продукту гістохімічної реакції – диформазану. Після того, як проникаючий кріопротектор Me_2SO забезпечив доступ субстрату і барвника до ферментів і створив оптимальні умови гістохімічної реакції, процедура заморожування-розморожування не призводить до істотної зміни кінетики гістохімічних реакцій і як наслідок спостерігається відсутність достовірних розходжень активності ферментів між групою зразків плаценти після обробки кріопротектором і обробки кріопротектором при заморожуванні-розморожуванні. Можливо, цей кріопротектор сприяє зв'язуванню води біополімерами, внаслідок чого менше утворюється мікрокристалів льоду, що руйнують клітини.

Таким чином, можна стверджувати, що дія низькотемпературного консервування на активність окислювально-відновних ферментів у тканині плаценти аналогічна дії на цю тканину проникаючого кріопротектора Me_2SO .

Універсальним ушкоджувальним механізмом різних клітин при різноманітних впливах є ВРПО. Джерела літератури про вплив кріоконсервованої плаценти на стан ВРПО та АОЗ при кріоконсервації дуже скупі. У наших дослідженнях оцінювався вміст первинних, вторинних та третинних продуктів ВРПО в різних режимах низькотемпературного зберігання. Одночасно в цих плацентах гістохімічними методами визначали активність анаеробних дегідрогеназ, вміст білка та ключових білкових і стероїдних гормонів. Отримані дані зіставляли між собою (табл. 1). У 3-й (1 доба -20°C) та 4-й (1 доба -20°C і 1 рік при -196°C) серіях дослідів спостерігаються зниження вмісту ПЗ, помірне збільшення продуктів пероксидації, найменший приріст МДА та ШО, найменше зниження вмісту глутатіону в порівнянні з контролем. Навпаки, у 2-й (1 доба при 4°C) та 5-й (1-а доба -196°C і 1 рік при -20°C) серіях дослідів суттєво посилені процеси пероксидації, тобто руйнування плаценти. Вважаємо, що, оскільки субстратами ВРПО є всі біополімери (а не тільки ліпіди), вітаміни, то посилення пероксидації (О.И.Цебржинський, 1992) полягає в активній руйнації БАР плаценти.

Продукти ліпопероксидації є регуляторами клітинних реакцій за допомогою зміни проникності клітинних мембран тканин плаценти для різних медіаторів і ефекторних молекул. Їхнє накопичення в тканинах плаценти супроводжується порушенням структури, деградацією клітин. Проведені дослідження показали, що в умовах кріоконсервації відбувається часткова деструкція біологічно активних речовин, яка, однак, не завжди є статистично вірогідною, але

навіть залишкові кількості гормонів виконують свою біологічну роль. Можливо, зміни ВРПО пов'язані з некрозами та апоптозами клітин, активацією фагоцитів.

Таблиця 1

Вміст продуктів перекисного окислення ліпідів у плаценті залежно від режимів зберігання

№	Режими зберігання	n	Подвійні зв'язки (ПЗ), О.О./мг б	Дієнові кон'югати (ДК), О.О./мг б	Триснові кон'югати (ТК), О.О./мг б	Тетраєн. кон'югати (ТТК), О.О./мг б	Оксидієн. кон'югати (ОДК), О.О./мг б	Шифові основи (ШО), О.О./мг б
1	Контроль (1 серія)	10	0,158± 0,017	0,047± 0,005	0,036± 0,003	0,033± 0,004	0,018± 0,002	0,044± 0,004
2	1 д. 4°C (2 серія)	10	0,135± 0,017	0,089± 0,010 ****	0,064± 0,008 ****	0,046± 0,005 **	0,029± 0,003 ***	0,079± 0,007 ****
3	1 д. -20°C (3 серія)	10	0,141± 0,017	0,077± 0,009 *	0,048± 0,004 ***	0,043± 0,005 *	0,025± 0,002 **	0,062± 0,006 **
4	1 д. -20°C і 1 рік -196°C (4 серія)	10	0,109± 0,013 **	0,067± 0,007 *	0,050± 0,005 ***	0,044± 0,005 *	0,024± 0,002 *	0,071± 0,007 ***
5	1 д. -196°C і 1 рік -20°C (5 серія)	10	0,105± 0,012 **	0,102± 0,014 ****	0,067± 0,007 ****	0,055± 0,007 ***	0,037± 0,004 ****	0,095± 0,009 ****
Примітка: Вірогідність різниці (р) контролю з режимами низькотемпературного зберігання * p<0,1, ** p<0,05, *** p<0,01, **** p<0,001								

Дослідження фізіологічних механізмів регуляції росту тканин дозволили виявити факт наявності в органах і тканинах факторів, що специфічно впливають на ріст органів і тканин (С.И.Кусень, Р.С.Стойка, 1985). Вони були виявлені за здатністю трансплантатів і екстрактів тканин вибірково впливати на ріст відповідних органів при введенні в організм у постнатальному періоді (Н.А.Пучковская, 1975).

Важливу інформацію про процеси ліпопероксидації у тканині плаценти дає відносний уміст первинних, вторинних і кінцевих продуктів ПОЛ (рис. 2), який демонструє нам близькі до контрольної величини у випадку використання режиму зберігання плаценти при -20°C і подальшого занурення в рідкий азот. На активацію процесів пероксидації фосфоліпідів у тканині плаценти вказує збільшення відносних показників ДК/ПЗ, ТК/ПЗ, ОДК/ПЗ, ДК/ОДК і ШО/ПЗ у порівнянні з контролем.

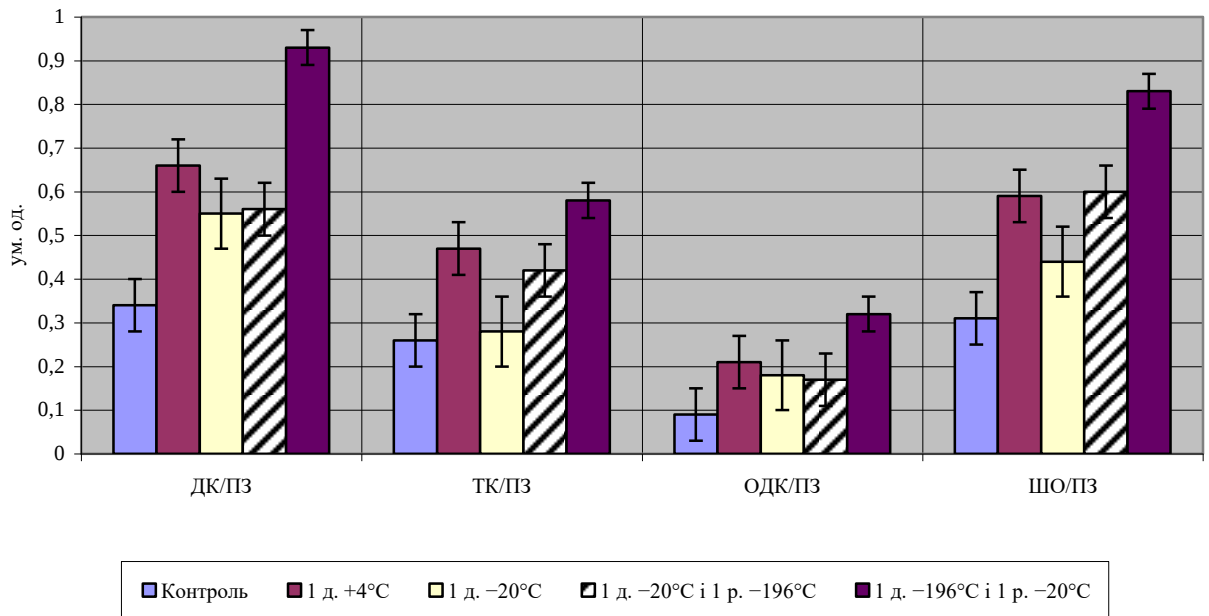


Рис. 2. Відносний уміст первинних і кінцевих продуктів ПОЛ у відношенні до кількості подвійних зв'язків при низькотемпературному зберіганні у плаценті.

Найбільш виражені метаболічні зміни в тканинах плаценти характерні при її зберіганні протягом 1 доби при 4°C (2-а серія) та протягом 1 доби при -196°C з подальшим зберіганням 1 рік при -20°C (5-а серія). Зважаючи на відсутність вірогідних змін досліджуваних показників, найбільш оптимальними способами низькотемпературного зберігання плаценти вважаємо її збереження протягом 1 доби при -20°C (3-а серія) та збереження протягом 1 доби при -20°C з подальшим зберіганням 1 рік при -196°C (4-а серія). Таким чином, руйнацію внутрішньоклітинних структур спочатку забезпечують процеси ПОЛ мембран, зокрема й мембран лізосом, а потім в умовах гальмування ЛДГ накопичується молочна кислота, яка створює умови для функціонування ферментів автолізу з лізосом. Вважаємо, що найбільш виражено ці процеси можуть відбуватися в повторних циклах заморожування-розморожування.

Не виключена можливість втрати біологічно активних речовин унаслідок дії ферментів, які звільнились із лізосом при розриві кристалами льоду їхніх мембран, та можливість активізації протеаз активними формами кисню. У різних умовах низькотемпературного зберігання визначали вміст у плаценті гормонів (пролактину, тестостерону, кортизолу). Вміст білка в цих серіях кріоконсервування та зберігання практично не відрізняється від норми (табл. 2). Але вміст білкового гормону пролактину суттєво зменшувався в умовах зберігання протягом 1 доби при 4°C (2-а серія) та зберігання протягом 1 доби -196°C і 1 рік при -20°C (5-а серія). У цих же серіях експериментів найбільш суттєво зменшується вміст тестостерону та кортизолу (на 63% і 54% відповідно). Можливо, в розпаді цих стероїдних гормонів велике значення має відновлення за допомогою НАДФН-2, який у свою чергу виснажує активність НАДФНДГ, або посилення пероксидації.

Вміст гормонів у плаценті залежно від дії низьких температур

№ п/п	Режими зберігання	n	Білок (мг/мол)	Пролактин (мМО/л мг)	Тестостерон (нМоль/л мг)	Кортизол (нМоль/л мг)
1	Контроль (1 серія)	10	18,8±1,8	1593±151	4,81±0,45	2484±226
2	1 д. 4°C (2 серія)	10	16,0±1,6	815±93 ****	2,94±0,33 ****	1150±96 ****
3	1 д. -20°C (3 серія)	10	14,8±1,6	1553±159	3,65±0,36 **	1534±151 ***
4	1 д.-20°C і 1 рік -196°C(4серія)	10	15,0±1,5	1337±139 *	3,68±0,38 *	1392±144 ****
5	1 д.-196°C і 1 рік -20°C (5 серія)	10	17,1±1,7	1088±121 **	1,79±0,29 ****	1293±117 ****
Примітка: Вірогідність різниці (p) контролю з режимами низькотемпературного зберігання * p<0,1, ** p<0,05, *** p<0,01, **** p<0,001						

Слід підкреслити, що при зберіганні в умовах 1 доба при -20°C (3-а серія) і 1 доба -20°C і 1 рік при -196°C (4-а серія) вміст пролактину, тестостерону і кортизолу в плаценті зменшується помірно, враховуючи те, що вміст білка суттєво та вірогідно не зменшився. Можна вважати помірним зменшення інших БАР білкової природи, таких як АФП, хоріональний глікопротеїд, пептидні гормони.

Вплив трансплантації плаценти на морфогенез окремих органів. Підшкірна трансплантація плаценти має виражений стимулюючий вплив на різні органи і системи, що пояснюється наявністю в її тканині великої кількості біологічно активних речовин. Порушується проблема про системну дію при трансплантації плаценти на морфогенез органів. При цьому варто з'ясувати відмінність ефектів дії нативної і кріоконсервованої плаценти. Щодо цього даних літератури вкрай мало, що, враховуючи імуномодельючу і гормонопродукуючу функції плаценти, вимагає спеціального дослідження.

Розглядаючи отримані результати з погляду можливих ушкоджень і проявів фізіологічної регенерації при трансплантації фрагментів нативної і кріоконсервованої плаценти і дії екзогенного подразника (розріз), виявлено, що в групі тварин (контроль із розрізом) протягом усіх термінів спостереження гістоструктура досліджених органів достовірно не відрізнялася від контролю.

Печінка. Трансплантація нативної і кріоконсервованої плаценти в ранній термін спостереження виявляє стимулюючий ефект на стромальні та паренхіматозні елементи в печінці, що супроводжується посиленням портальної гемодинаміки, розширенням синусоїдних капілярів. Купферові клітини при цьому збільшені, мають зірчастий вигляд і нерідко перетворюються у вільні макрофаги, що свідчить про потенційні можливості захисної функції печінки.

Двох'ядерні гепатоцити печінки

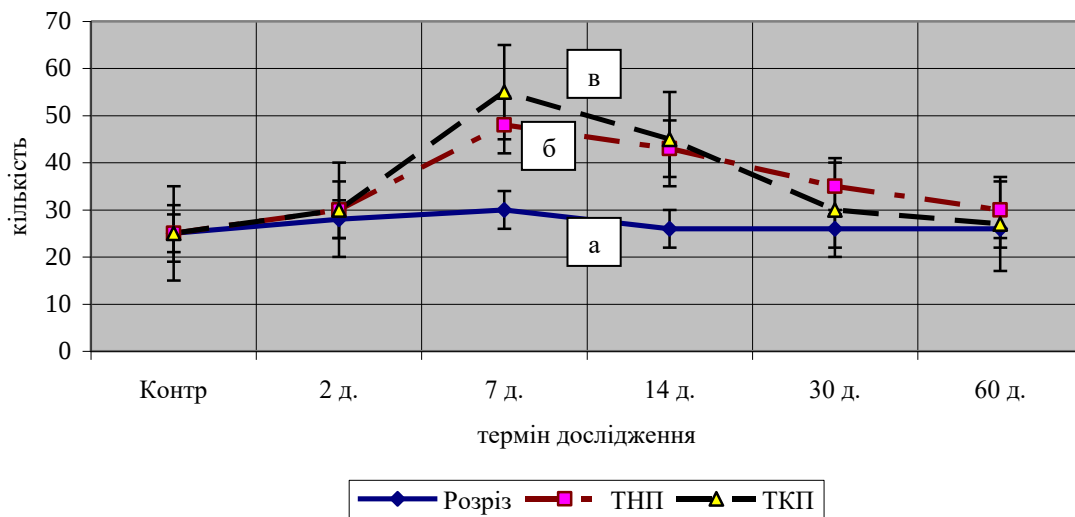


Рис. 3. Порівняльна характеристика двох'ядерних гепатоцитів при дії розрізу (а), трансплантації нативної (б) і кріоконсервованої (в) плаценти.

При ТКП і ТНП у ранній термін спостереження (до 14 доби) виявлена виражена реакція паренхіми у вигляді збільшення кількості двох'ядерних клітин (рис. 3 а–в). Це свідчить, що в органі відбувається фізіологічна перебудова з регенераційними процесами без збільшення маси гепатоцитів. Морфофункціональний стан паренхіми печінки характеризується великими, активно функціонуючими гепатоцитами з округлими світлими ядрами і рівномірно розташованим хроматином. Ознаки репаративної регенерації не спостерігаються, оскільки низький індекс мітозів гепатоцитів не відрізняється від контролю.

Виявлене нами достовірне збільшення (14 доба) кількості двох'ядерних гепатоцитів, а потім їх достовірне зменшення (60 доба) свідчать про активізацію адаптаційних та фізіологічних процесів у печінці.

Алотрансплантація нативної і кріоконсервованої плаценти стимулює структурні елементи печінки, які відповідають за трофічну, захисну та інші функції органа, не викликаючи їхніх ушкоджень. Важливо зазначити, що в печінці не спостерігається розростання міжчасточкової сполучнотканинної основи навіть до кінця експерименту (60 доби). Це характеризує стійкий баланс стромально-паренхіматозних відносин при ініціації різноманітних функцій органа за рахунок дії вільних біологічно активних компонентів, що знаходяться в складі кріоконсервованого фрагмента.

Аналіз морфологічної характеристики препаратів дозволив також зробити висновок, що кількість „темних” і „світлих” клітин протягом експерименту варіює. У літературі „темні” та „світлі” клітини печінки розглядаються як клітини, що перебувають у різному функціональному

стані (С.А.Лепехова и соавт., 1998; З.С.Хлыстова и соавт., 1998). У „світлих” клітинах відбувається інтенсивна секреторна діяльність, яка супроводжується зростанням їхньої фосфорилуючої функції. Завершується процес просвітлення цитоплазми набряканням і редукцією кріст у мітохондріях. „Темні” клітини – це молоді часточки, які перебувають у стані відносного спокою, але в міру наростання метаболічних процесів клітини просвітлюються. Збільшення кількості „темних” гепатоцитів свідчить про помірний перебіг процесів фізіологічної регенерації. До завершального терміну спостереження гістоструктура печінки відповідає своєму звичайному морфофункціональному стану.

Таким чином, у відповідь на введення в організм експериментальних тварин кріоконсервованого і нативного фрагментів плаценти в системі алотрансплантації відбувається інтенсифікація фізіологічної регенерації структурних елементів печінки, що відповідають за трофічну, захисну й інші функції органа, не викликаючи їхніх ушкоджень. Причому, ТКП дає більш виражену реакцію структурних елементів печінки, ніж ТНП.

Тимус. При трансплантації фрагментів нативної і кріоконсервованої плаценти структурні елементи тимуса відповідають реакцією, яка більше виражена в ранні терміни спостереження (2–14 діб). Вона проявляється збільшенням кількості мітозів, макрофагів, судин у міжчасточкових перегородках та незначною функціональною стимуляцією стромы: це свідчить, що в органі відбувається фізіологічна перебудова з активізацією фізіологічної регенерації. Причому, ТКП викликає більш виражену реакцію з боку структурних елементів тимуса, ніж ТНП. Можливо, це пов'язано з реакцією органа на БАР, які знаходяться у великій концентрації в тканині плаценти (А.Хэм, Д.Кормак, 1983).

Таким чином, при трансплантації кріоконсервованої і нативної плаценти виявлена реакція структурних елементів тимуса.

Селезінка. При трансплантації фрагментів нативної і кріоконсервованої плаценти структурні елементи селезінки переживають функціональне напруження, більш виражене в ранні терміни спостереження. Воно проявляється потовщенням капсули за рахунок збільшення колагенових і еластичних волокон із частковою фрагментацією.

Виявлена реакція паренхіми селезінки, яка характеризується змінами в співвідношенні червоної і білої пульпи (рис. 4.1). При трансплантації плаценти в ранні терміни дослідження (2–14 діб) виявляється збільшення білої пульпи за рахунок відносного зменшення червоної. Установлене також збільшення кількості лімфатичних фолікулів білої пульпи, а це свідчить, що в органі відбувається фізіологічна перебудова з активацією фізіологічної регенерації (рис. 4.2 а–в). Можливо, це пов'язано з реакцією органа на антигени, внаслідок чого виробляються лімфоцити, а також незрілі та зрілі плазматичні клітини. Таким чином, у ранні терміни орган активно реагує на трансплантацію плаценти, причому кріоконсервована плацента викликає більш виражену

відповідну реакцію, ніж нативна.

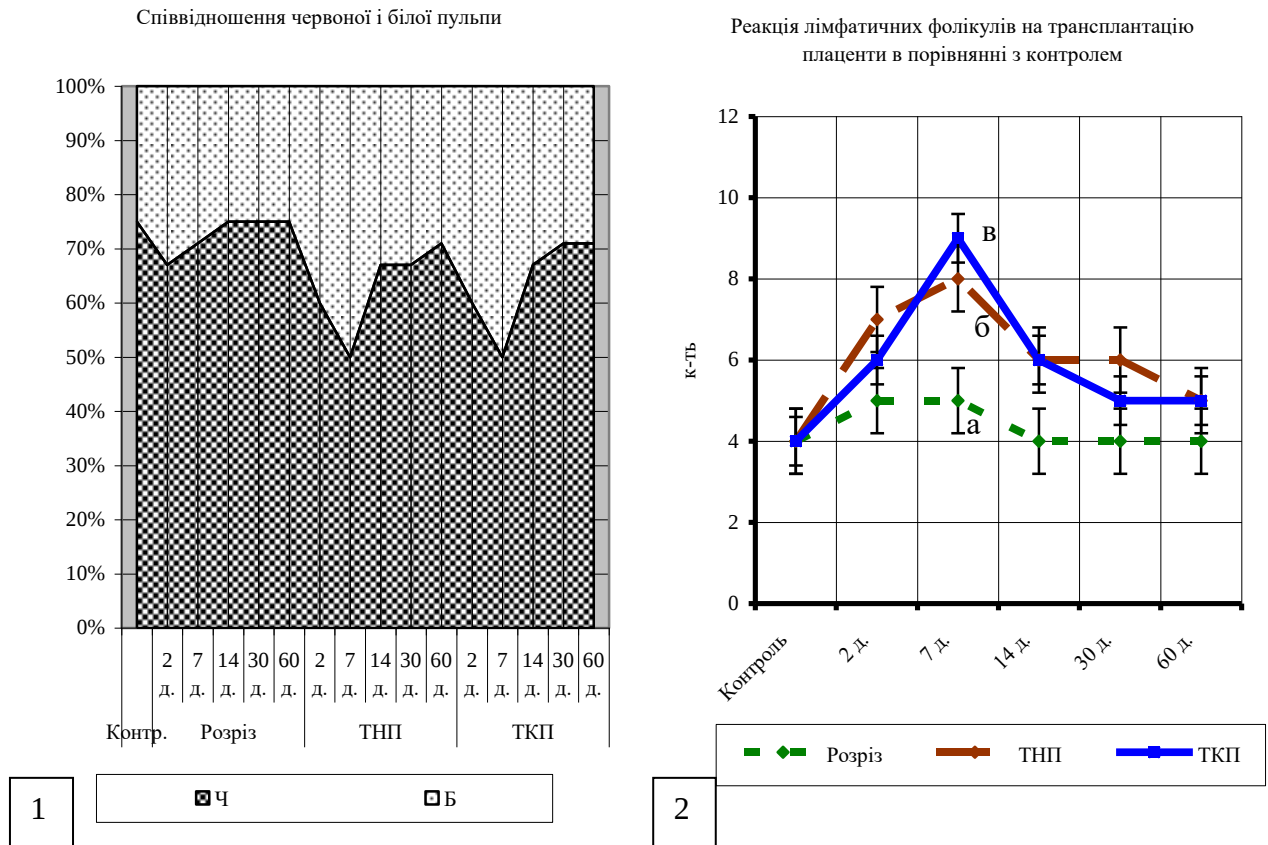


Рис. 4. Співвідношення червоної і білої пульпи селезінки в різні терміни дослідження в порівнянні Контроль, Розріз, ТНП, ТКП (1). Реакція лімфатичних фолікулів селезінки на Розріз (2 а), трансплантацію нативної (2 б) і кріоконсервованої (2 в) плаценти.

Надниркові залози. Трансплантація нативної і кріоконсервованої плаценти викликає активацію секреторних елементів надниркових залоз, яка проявляється в ранній термін спостереження (7–14 діб). Причому ТКП проявляє більш виражену реакцію з боку структурних елементів наднирковика, ніж ТНП. У нормальному стані залози секреція гормонів відбувається переважно в середньому шарі кіркової речовини. Під впливом факторів ця зона може значно розширюватися за рахунок периферичних і більш глибоких шарів. Клітини кіркового шару надниркових залоз проходять визначений цикл розвитку, який починається в клубочковій зоні, продовжується в пучковій і закінчується сітчастою зоною. Гормони на шляху реалізації своєї функції вступають у довгий ланцюг обмінних відносин, включаючи обмін у крові і тканинах, обмін між специфічно зв'язаним у цитоплазмі клітин і позаклітинним гормоном, між похідними гормону різної інтенсивності і незворотних метаболічних перетворень молекул гормону, перехід гормону і його метаболітів в органи виведення (А.А.Виру, 1979). Нами було показано, що система реагування піддається змінам досить швидко. Уже на 2-у добу виявляється гіпертрофія

клубочкової зони, вона стає ширшою, губиться чіткість її меж із пучковою зоною. Клітини клубочкової зони своїми розмірами і виглядом стають схожі на світлі великі клітини пучкової зони. Мозковий шар при цьому чітко виражений, клітини його мають світлу цитоплазму.

Яєчники. При трансплантації фрагментів нативної і кріоконсервованої плаценти з боку структурних елементів яєчника виявлена реакція у вигляді збільшення кількості фолікулів та незначної функціональної стимуляції стромы. Це свідчить про те, що в органі відбувається фізіологічна перебудова з активізацією фізіологічної регенерації, яка більше виражена в ранні терміни спостереження (2–14 діб). Більш виражена реакція структурних елементів у відповідь на трансплантацію нативної і кріоконсервованої плаценти пов'язана, очевидно, із впливом глибоких низьких температур і частковим руйнуванням ізсередини і зовні клітинних структур, тобто на введення з тканиною плаценти великої кількості біологічно активних речовин, гормонів та інших факторів.

Вплив трансплантації плаценти на розвиток запалення. Розвиток карагіненового гострого асептичного запалення м'яких тканин стегна супроводжувався характерними для запалення змінами лейкоцитарної реакції периферичної крові і клітинного складу вогнища (рис. 5).

Загальна кількість лейкоцитів (ЗКЛ) у крові поступово зростала і досягала максимуму на 5-у добу, а на 7-у практично поверталася до початкового рівня. Кількість паличкоядерних нейтрофілів вірогідно збільшувалася на 6-у годину, 3-ю і 5-у добу; сегментоядерних нейтрофілів – на 1-у і на 5-у добу, моноцитів – на 5-у добу. Спостерігалася виражена лейкоцитарна інфільтрація тканин, насамперед нейтрофільна. Відсоткова кількість нейтрофілів була максимальною на 6-у годину, потім поступово зменшувалася, але була набагато більшою від контролю в період з 12-и годин до 5-и діб, а на 7-у–14-у добу вірогідно не відрізнялася від контролю. Відсотковий уміст моноцитів-макрофагів спочатку знижувався на 6-у годину, а потім відновлювався і збільшувався з максимумом на 3-ю добу і повертався до початкового на 7-у добу, зберігаючись далі до 14-ї доби.

Вміст незрілих фібробластів вірогідно був знижений відносно контролю на 6-у годину–1-у добу, але помітно перевищував початкове значення на 2-у–10-у добу, з піком на 5-у добу і повертався до початкового на 14-у. Відсотковий уміст зрілих фібробластів зменшувався з піком кількості на 6-у годину і повертався до рівня контролю на 2-у–10-у добу, а потім збільшувався проти контролю на 3-ю–14-у з максимумом на 7-у добу; відсоткова кількість фіброцитів зменшувалася в усі терміни дослідження з поступовою тенденцією до відновлення на 7-у добу, але їхня кількість була нижче контролю і на 14-у добу.

При запаленні на тлі дії трансплантації плаценти ЗКЛ у крові досягало максимуму вже на 3-ю добу, проти 5-ї доби при звичайному розвитку запалення і на 7-у добу не відрізнялося від контролю. Кількість паличкоядерних нейтрофілів збільшувалася на 6-у і 12-у годину, а на 5-у–14-у

була значно нижчою, ніж за звичайного перебігу запалення. Вміст сегментоядерних нейтрофілів досягав максимуму на 3-ю добу в порівнянні з 5-ю за звичайного перебігу запалення, після чого повертався до початкового. На 5-у і 10-у добу він був меншим, ніж за звичайного перебігу запалення. Кількість моноцитів зростала на 2-у–5-у добу з максимумом на 3-ю. Відсоткова акумуляція нейтрофілів у вогнищі була помітно знижена, у порівнянні з природним перебігом процесу, на 6-у годину–5-у добу, а відсоткове накопичення моноцитів-макрофагів збільшувалося на 1-у і 3-ю добу і зменшувалося на 7-у і 10-у, їхній пік визначався раніше, а саме на 2-у добу, проти 3-ї за звичайного перебігу запалення. Відсоткова кількість незрілих фібробластів була більшою на 2-у–7-у добу, їхній пік спостерігався раніше – на 3-ю добу проти 5-ї, зрілих фібробластів було більше на 3-ю–10-у добу з максимумом на 5-у добу проти 7-ї доби за звичайного перебігу запалення; відсотковий вміст фіброцитів збільшувався на 3–7-у добу і повертався до початкового вже на 10-у добу.

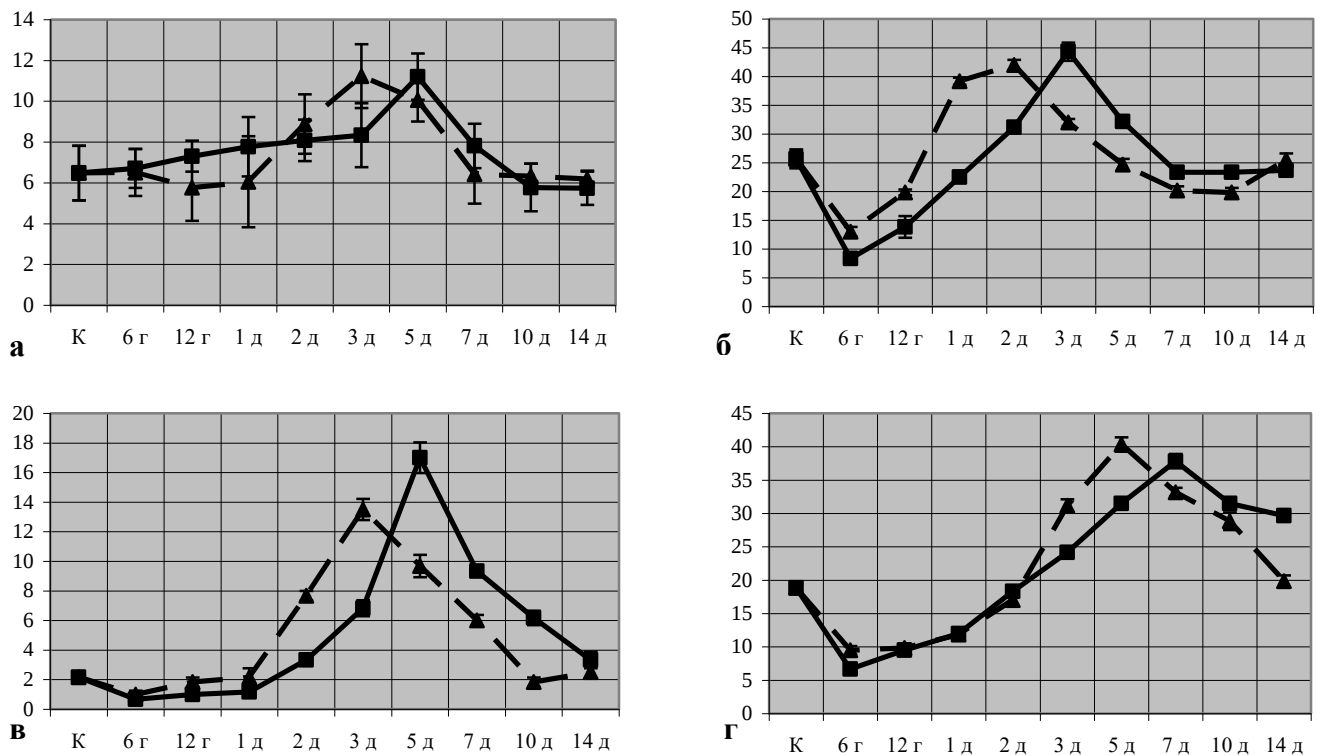


Рис. 5. Динаміка карагіненового гострого асептичного запалення за звичайного розвитку (—) і на тлі застосування трансплантації плаценти (---). Загальна кількість лейкоцитів (а) у периферичній крові щурів ($\times 10^9/l$) у динаміці карагіненового гострого асептичного запалення м'яких тканин стегна. Клітинний склад м'яких тканин стегна щурів (у %): макрофаги (б), незрілі (в) і зрілі (г) фібробласти.

Слід також зазначити, що за звичайного перебігу запалення максимальний розвиток грануляційної тканини спостерігався на 7-у добу, а на 10–14-у вона більш ніж наполовину заміщлася молодою сполучною тканиною. Застосування трансплантації плаценти приводило до

появи великих площ грануляційної тканини вже на 3-ю добу, а її дозрівання і заміщення молодого сполучною тканиною практично завершувалося на 10-у добу.

Як відомо, одним з основних джерел медіаторів і початкових клітин-ефекторів запалення є тучні клітки. Встановлено, що за звичайного перебігу запалення кількість тучних клітин була знижена в усі терміни дослідження (максимально на 2-у і 3-ю добу) з подальшим помітним її відновленням, так що до 14-ї доби вона вірогідно не відрізнялася від початкової. З іншого боку, дегрануляція тучних клітин, що також була посилена в усі терміни дослідження, була найбільшою на 1-у добу з подальшим помітним її зниженням і на 14-у добу ще залишалася більшою, ніж початкова.

При запаленні на тлі введення похідних плаценти кількість тучних клітин на 1-у–5-у добу знижувалася значно менше, ніж за природного його перебігу, і відновлювалася раніше, досягала піка на 7-у добу і вже на 10-у не відрізнялося від контролю, але була більшою, ніж за звичайного перебігу запалення, на 10-у і 14-у добу. Щодо дегрануляції тучних клітин, то вона була порівнянна з такою за звичайного перебігу запалення на 6-у годину–2-у добу, а потім не відрізнялася від початкової.

Отримані результати показують, що застосування трансплантації плаценти помітно пригнічує нейтрофільну і підсилює макрофагально-фібробластичну реакції. З огляду на провідну роль нейтрофілів у розгортанні, а моноцитів-макрофагів і фібробластів – у стиханні запалення, можна вважати, що в цьому разі протизапальний ефект похідних плаценти полягає в обмеженні альтеративних і посиленні репаративних явищ і захисно-приспосувальній ролі запалення в цілому. Механізм протизапального впливу, очевидно, пов'язаний із впливом гормонів: прогестерону, естрадіолу, пролактину, гонадотропіну. Вони можуть впливати на „клітини запалення” (лейкоцити, тканинні макрофаги, фібробласти, тучні клітини, ендотеліоцити), кістковий мозок, мікроциркуляцію як безпосередньо (через специфічні рецептори), так і опосередковано через медіатори і відповідні рецептори для останніх. В обох випадках цей вплив опосередковується змінами концентрації внутрішньоклітинних циклічних нуклеотидів, ферментних систем, іонів, функціонування іонних транспортних систем і т.д.

ВИСНОВКИ

Гіпотермічний та низькотемпературний вплив на тканину плаценти, яка вилучена внаслідок кесаревого розтину, викликає різного ступеня вираженості зміни, які обумовлені режимами охолодження і зберігання; на підставі отриманих даних був удосконалений метод низькотемпературного зберігання, а експериментальна трансплантація свідчить, що реакція введених в організм реципієнта біологічно активних речовин плаценти реалізується через складні механізми їхньої взаємодії зі структурно-функціональним профілем досліджуваних внутрішніх

органів та має виражений вплив на перебіг запалення.

1. Гіпотермічне зберігання плаценти при 4°C терміном дві доби (перший підготовчий етап у проведенні кріоконсервування), а також застосування як кріопротектора диметилсульфоксиду не призводить до суттєвого порушення активності дегідрогеназ у тканинах плаценти людини. Спостерігалася лише невелика зміна процесу гліколізу та перекисного окислення ліпідів. У процесі кріоконсервування активуються ферменти обмеженого протеолізу, які здатні частково розщеплювати білок, зокрема і пролактин. Виявляється вірогідне зниження концентрації низки гормонів (пролактин, тестостерон, кортизол), при цьому в досліджених зразках плаценти, що зберігалися при різних температурах та в різних варіантах кріоконсервування, не спостерігається достовірних змін концентрації білка.

2. Найбільше достовірне посилення вільнорадикального перекисного окислення в тканинах плаценти відбувалося при зберіганні її протягом 1 доби при 4°C (2-а серія) та зберіганні протягом 1 доби при -196°C з подальшим зберіганням 1 рік при -20°C (5-а серія). Відносний уміст первинних, вторинних і кінцевих продуктів перекисного окислення ліпідів характеризується близькими до контролю значеннями у разі використання режиму зберігання плаценти протягом 1 доби при -20°C (3-а серія) та протягом 1 доби - при -20°C та з подальшим зберіганням 1 рік при -196°C (4-а серія). Отже, на підставі отриманих експериментальних даних структурно-функціональних характеристик плацентарної тканини оптимізований технологічний процес низькотемпературного довгострокового її зберігання, й умови кріоконсервування в 3-й та 4-й серіях є оптимальними в порівнянні з умовами 2-ї та 5-ї серій.

3. Морфологічним дослідженням плаценти встановлені три типи розподілу судин пуповини: магістральний, який у 34,2% спостережень зустрічається при периферичному або оболонковому прикріпленні пуповини, та розсипний і змішаний, які в 65,8% спостерігаються при парацентральному прикріпленні пуповини. У крайовій зоні встановлене збільшення стромальних елементів і щільне розташування ворсин, тоді як у центральній зоні виявлене кількісне збільшення судинно-нервового та нечисленного залозистого компонентів. Цей факт дозволяє визначити оптимальні ділянки з найбільшою функціональною активністю, які необхідно враховувати в підготовці матеріалу для подальшого використання в трансплантації.

4. У дослідженій плаценті переважають середньо- і низькомолекулярні білки. Так, кількісний уміст α -фетопротейну складає $584,3 \pm 150,4$ мМО/мл, що підтверджує імуносупресивний механізм дії плацентарних препаратів. Ліпідний склад плаценти містить фосфоліпіди, моногліцериди, тригліцериди, цереброзиди, тобто широкий спектр біополімерів різноспрямованої дії, який впливає не тільки на структуру мембранних компонентів клітин, а й на різні метаболічні процеси. У плаценті знаходяться водо- та жиророзчинні вітаміни (А, Е, В₁, В₆, В₁₂, Д), широкий спектр гормонів (пролактин, тестостерон, кортизол) та мікроелементів (мідь, цинк, залізо, магній,

калій, натрій, кальцій, фосфор).

5. Уведення алогенної плацентарної тканини (нативної і кріоконсервованої) в організм експериментальних тварин стимулює функціональну активність досліджених органів за рахунок біологічно активних речовин, гормонів та інших факторів, що містяться у великих концентраціях у тканині плаценти. При цьому переважають адаптивні процеси в структурних елементах печінки, селезінки, тимуса, надниркових залоз, яєчників. На трансплантацію кріоконсервованої плаценти організм відповідає активною реакцією, яка проявляється в ранні терміни спостереження (7–14 діб). У пізні терміни дослідження (60 діб) ця реакція суттєво не відрізняється від контролю, тоді як трансплантація нативної плаценти в пізні терміни дослідження викликає більш виражену реакцію з боку структурних елементів.

6. Установлені виражені потенційні можливості захисної функції печінки, які проявляються без збільшення маси печінкових клітин і ознак їхнього ушкодження у відповідь на трансплантацію нативної і кріоконсервованої плаценти. Стимулюючий ефект трансплантації на стромальні та паренхіматозні елементи супроводжується посиленням портальної гемодинаміки, розширенням синусоїдних капілярів. Виявлене адаптивне збільшення кількості двох'ядерних клітин. Купферові клітини збільшених розмірів, мають зірчастий вигляд і нерідко перетворюються у вільні макрофаги. У печінці не спостерігається розростання міжчасточкової сполучнотканинної основи в термін експерименту.

7. Виявлено, що в селезінці реакція структурних елементів проявляється збільшенням кількості лімфатичних фолікулів білої пульпи, що пов'язано з реакцією органа на введення алогенної тканини плаценти, внаслідок чого посилюється вироблення лімфоцитів, а також незрілих і зрілих плазматичних клітин, а також потовщення капсули за рахунок збільшення колагенових і еластичних волокон із частковою фрагментацією. Реакція паренхіми селезінки характеризується змінами співвідношення червоної і білої пульпи, виявляється збільшення білої пульпи за рахунок відносного зменшення червоної. Отже, реакція з боку структурних елементів перебуває в межах фізіологічної регенерації.

8. Установлено, що в надниркових залозах при трансплантації алогенної нативної і кріоконсервованої плацентарної тканини реакція структурних елементів також перебуває в межах фізіологічної регенерації. Вона проявлялася гіпертрофією клубочкової зони, причому зникала чіткість її меж із пучковою зоною. Ця зона може значно розширюватися за рахунок периферичних і більш глибоких шарів. Клітини клубочкової зони своїми розмірами і виглядом стають схожі на світлі великі клітини пучкової зони. Мозковий шар чітко виражений, клітини його мають світлу цитоплазму. В цілому це може свідчити про те, що введення плаценти модулює синтез і секрецію стероїдних гормонів та катехоламінів у надниркових залозах.

9. Виявлено, що при трансплантації нативної і кріоконсервованої плаценти у вторинних

фолікулах яєчників також спостерігаються явища фізіологічної стимуляції, які проявляються потовщенням стінки фолікула, появою овоцитів першого порядку з тонкими і дисперсними нитками хроматину, великими і світлими ядерцями. Збільшується кількість первинних фолікулів, виявляються третинні (граафові) фолікули. Сполучнотканинна основа мозкової речовини представлена еластичними волокнами, між якими розташовуються гілусні клітини, та звивистими спіральними артеріями і венами.

10. Установлено, що стимуляція структурних елементів тимуса трансплантованою алогенною нативною і кріоконсервованою плацентою проявляється потовщенням сполучнотканинної капсули, збільшенням кількості судин у перегородках між часточками, в кірковій речовині –кількості мітозів клітин, макрофагів. Епітеліоретикулярні клітини при цьому мають вигляд світлих, оксифільних, зі світлим ядром та великим ядерцем клітин. У мозковій речовині збільшується кількість тілець Гассаля в міжклітинному просторі.

11. При експериментальному запаленні застосування біологічно активних речовин плацентарної тканини дозволяє нормалізувати клітинні реакції у вогнищі запалення і стан периферичної крові. Це проявляється вірогідним пригніченням нейтрофільної і підсиленням макрофагально-фібробластичної реакції в більш короткі (різниця в 2-і доби) терміни в порівнянні зі звичайним перебігом запалення. Отже, протизапальний ефект біологічно активних речовин плаценти проявляється обмеженням альтеративних і посиленням репаративних явищ.

СПИСОК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Шепітько В.І. Дослідження активності деяких дегідрогеназ у тканинах алогенної плаценти при дії гіпотермії // Вісн. проблем біології і медицини. – 2002. – Вип. 5. – С. 101–104.
2. Грищенко В.И., Бобырева Л.Е., Бугаев В.Н., Шепитько В.И., Дворник И.Л., Катеринчук В.И., Бобырев В.Н. Биологические аспекты эмбрионально-тканевой терапии инсулинзависимого сахарного диабета // Вісн. проблем біології і медицини. – 2002. – Вип. 2. – С. 31–38. Дисертантом зроблено: обґрунтування вибраного напрямку, набір матеріалу, обчислення, написання статті.
3. Грищенко В.І., Прокопюк О.С., Шепітько В.І., Страна В.І., Юрченко Т.М., Бобирьова Л.Є., Рязанцев В.В. Використання кріоконсервованої плаценти в лікувальній практиці // Трансплантологія. – 2002. – Т. 3, № 2. – С. 32–37. Дисертантом зроблено: морфологічна характеристика плаценти та біологічно активних речовин, набір матеріалу, обчислення та його обґрунтування, участь у написанні статті.
4. Страна В.И., Юрченко Т.Н., Рязанцев В.В., Шепитько В.И., Прокопюк О.С., Гордиенко А.И. Изучение влияния экстракта плаценты и нейроткани на мембранно-метаболическую функцию митохондрий и микросом из печени крыс в системе *in vitro* // Пробл. криобиологии. – 2002. –

- №4. – С. 24–29. Дисертантом зроблено: активна участь у постановці експерименту, набір матеріалу, обчислення та його обґрунтування, узагальнення результатів.
5. Шепітько В.І. Реакція паренхіми наднирників на введення аlogenної нативної та кріоконсервованої плаценти // Вісн. проблем біології і медицини. – 2003. – Вип. 2. – С. 122–124.
 6. Шепітько В.І. Вплив трансплантації кріоконсервованої плаценти на морфофункціональний стан наднирників // Вісн. морфології. – 2003 – Вип. 9, № 1. – С. 59–61.
 7. Шепітько В.І. Морфофункціональний стан печінки при алотрансплантації нативної і кріоконсервованої плаценти // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісник Української медичної стоматологічної академії. – 2003 – Т. 3, Вип. 1 (5). – С. 26–27.
 8. Шепітько В.І. Морфофункціональний стан селезінки після алотрансплантації плаценти // Вісн. морфології. – 2003. – Т. 9, № 2. – С. 198–200.
 9. Шепітько В.І. Морфофункціональний стан структурних елементів тимуса після алотрансплантації плаценти // Український медичний альманах. – 2003. – Т. 6, № 5. – С. 194–196.
 10. Шепітько В.І. Морфофункціональний стан структурних елементів яєчника після алотрансплантації плаценти / Проблеми екології та медичної генетики і клінічної імунології. – Київ–Луганськ–Харків, 2003. – Вип. 5 (51). – С. 339–346.
 11. Шепітько В.І. Состояние липопероксидации в плаценте в зависимости от разных режимов низкотемпературного хранения // Український медичний альманах. – 2003. – Т. 6, № 6. – С. 180–182.
 12. Шепітько В.І., Юрченко Т.М., Жулікова О.П., Котик Є.О., Білоножко О.П., Прокопюк В.Ю. Структурна характеристика гепато-лієнальної системи після застосування кріоконсервованої плаценти в експерименті / Мат. міжнародної наук.-практ. конф. „Проблеми клітинної та тканинної трансплантації” (Ів.-Франківськ ,2003) // Трансплантологія. – 2003. – Т. 4, № 1. – С. 118–120. Дисертантом зроблено: поставлений експеримент, набір матеріалу, обчислення та його обґрунтування, узагальнення результатів, написання статті.
 13. Юрченко Т.Н., Белоножко А.П., Жуликова Е.П., Шарлай Т.М., Строна В.И., Шепітько В.И. Влияние криопротектора Me₂SO на активность окислительно-восстановительных ферментов в ткани плаценты // Пробл. криобиологии. – 2003. – № 1. – С. 3–6. Дисертантом зроблено: активна участь у постановці експерименту із застосуванням кріопротектора, набір матеріалу, обчислення та його обґрунтування, узагальнення результатів, написання статті.
 14. Шепітько В.І. Реакція структурних елементів печінки на трансплантацію кріоконсервованої плаценти та екзогенний подразник (розріз) // Вісн. проблем біології і медицини. – 2004. – Вип. 1. – С. 96–100.

15. Шепітько В.І. Влияние разных режимов температурного хранения на содержание гормонов в плаценте / Проблемы екології та медичної генетики і клінічної імунології. – Київ–Луганськ–Харків, 2004. – Вип. 6 (59). – С. 463–468.
16. Шепітько В.І., Стецук Є.В., Цебржинський О.І. Прооксидантно-антиоксидантна система плаценти при різних режимах низькотемпературного збереження // Клінічна та експериментальна патологія. – 2004. – Т. 3, № 2, ч. 2. – С. 489–490. Дисертантом зроблено: досліджена прооксидантно-антиоксидантна система плаценти в різних режимах низькотемпературного збереження, набір матеріалу, обчислення та його обґрунтування, узагальнення результатів дослідження, написання статті.
17. Шепітько В.І., Юрченко Т.М., Клименко М.О., Татарко С.В., Стецук Є.В. Вплив кріоекстракту плаценти на клітинні реакції вогнища запалення і периферичної крові // Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісник Української медичної стоматологічної академії. – 2004. – Т. 4, Вип. 1 (7). – С. 31–37. Дисертантом зроблено: поставлений експеримент, набір матеріалу, обчислення та його обґрунтування, узагальнення результатів, написання статті.
18. Шепітько В.І., Юрченко Т.М., Клименко М.О., Татарко С.В., Стецук Є.В. Вплив кріоекстракту плаценти на реакцію тучних клітин при запаленні // Вісн. проблем біології і медицини. – 2004. – Вип. 2. – С. 103–106. Дисертантом зроблено: поставлений експеримент, набір матеріалу, обчислення та його обґрунтування, узагальнення результатів, написання статті.
19. Грищенко В.І., Шепітько В.І., Страна В.І., Юрченко Т.М., Рязанцев В.В., Цебржинський О.І. Зміна активності дегідрогеназ, вміст гормонів та стан ліпопероксидації в алогенній плаценті в залежності від дії низьких температур // Пробл. криобиологии. – 2004. – №. 1. – С. 62–69. Дисертантом зроблено: поставлений експеримент щодо дослідження параметрів плаценти, набір матеріалу, обчислення та його обґрунтування, написання статті.
20. Пат. № 32254А України МПК 6 А 61К31/00. Спосіб лікування хронічного пієлонефриту у хворих на цукровий діабет / Бобирьова Л.Є., Катеринчук В.І., Шепітько В.І., Юрченко Т.М., Бобирьов В.М., Куроедов Л.Ф. Заявл. 29.01.99. Опубл. 15.12. 2000. – Бюл. № 7–II. (Шепітько В.І. самостійно дав морфологічне обґрунтування застосування препаратів фетоплацентарного комплексу в лікуванні цукрового діабету у хворих на хронічний пієлонефрит, брав участь у складанні патенту та оформленні заявки на патент).
21. Пат. № 32255А України МПК 6 А61К31/00. Спосіб лікування цукрового діабету / Бобирьова Л.Є., Дворнік І.Л., Рябушко М.М., Шепітько В.І., Сухачова Л.О., Скрипнікова Т.П., Снурніков О.С., Бобирьов В.М. Заявл. 29.01.99. Опубл. 15.12.2000. – Бюл. № 7–II. (Шепітько В.І. самостійно дав морфологічне обґрунтування застосування препаратів фетоплацентарного комплексу при лікуванні цукрового діабету, брав участь у складанні патенту та оформленні заявки на патент).

22. Пат. № 32295А України МПК 6 А61К31/00. Спосіб лікування порушень фертильності у хворих на цукровий діабет / Бобирьова Л.Є., Гончаренко О.В., Шепітько В.І., Грищенко В.І., Бобирьов В.М., Прокопюк О.С. Заявл. 19.02.99. Опубл. 15.12.2000. – Бюл. № 7–II. (Шепітько В.І. самостійно дав морфологічне обґрунтування застосування препаратів фетоплацентарного комплексу в лікуванні порушень фертильності у хворих на цукровий діабет, брав участь у складанні патенту та оформленні заявки на патент).
23. Пат. № 39046А України МПК 7 А61К38/28 А61К35/48. Спосіб лікування інсулінозалежного цукрового діабету / Бобирьова Л.Є., Дворнік І.Л., Муравльова О.В., Бобирьов В.М., Шепітько В.І., Юрченко Т.М. Заявл. 23.01.2001. Опубл. 15.05.2001. – Бюл. № 4. (Шепітько В.І. самостійно дав морфологічне обґрунтування застосування препаратів фетоплацентарного комплексу в лікуванні інсулінозалежного цукрового діабету, брав участь у складанні патенту та оформленні заявки на патент).
24. Пат. № 59266А України МПК 7 А61К31/60. Спосіб лікування стабільної стенокардії / Шепітько К.В., Шепітько В.І., Гаєвський С.О. Заявл. 23.12.02. Опубл. 15.08.03. – Бюл. № 8. (Шепітько В.І. самостійно дав морфологічне обґрунтування застосування препаратів фетоплацентарного комплексу в лікуванні стабільної стенокардії, брав участь у складанні патенту та оформленні заявки на патент).
25. Шепітько В.І., Козлова В.П., Юрченко Т.М., Строна В.І. Морфологічні аспекти механізму дії нативних і кріоконсервованих трансплантатів плаценти в експерименті // Трансплантологія. – 2000. – Т.1, № 1. – С.294–295. Дисертантом зроблено: набір матеріалу, обчислення та його обґрунтування, написання статті.
26. Грищенко В.І., Бобырева Л.Е., Шепітько В.І., Юрченко Т.Н. Клинические основы применения криоконсервированной фетоплацентарной ткани в комплексной терапии сахарного диабета / II Російський конгрес із патфізіології з між. участю. „Патофизиология органов и систем. Тип. патол. процесса (экспериментальный и клин. аспекты) Тез. докл. – М. , 2000. – С. 315. Дисертантом зроблено: обґрунтування вибраного напрямку.
27. Шепітько В.І., Жуликова Е.П., Юрченко Т.Н., Шенберг М.Г. Реакция структурных элементов печени на имплантацию нативной и криоконсервированной плаценты в эксперименте / Матеріали Всеукраїнської наук. конф. “Успехи и перспективы развития криобиологии и криомедицины” (Харьков, 2001) // Пробл. криобиологии. – 2001. – № 3. – С. 39. Дисертантом зроблено: набір матеріалу, обчислення та його обґрунтування, написання статті.
28. Шепітько К.В., Гаєвський С.О., Потяженко М.М., Шепітько В.І. Лікування стабільної стенокардії із застосуванням кріоконсервованої фетоплацентарної тканинної трансплантації / Матер. Всеукраїнської научн. конф. „Успехи и перспективы развития криобиологии и

- криомедицины” (Харьков, 2001) // Пробл. криобиологии. – 2001.- № 3. – С. 43. Дисертантом зроблено: обґрунтування вибраного напрямку.
29. Грищенко В.И., Бобирева Л.Е., Шепитько В.И., Козлова В.Ф., Юрченко Т.Н., Строна В.И., Прокопчук О.С. Использование криоконсервированной плацентарной ткани в комплексной терапии сахарного диабета и его осложнений / Биоимплантология на пороге XXI века – Симпозіум із проблем тканинних банків з міжнародною участ. (Москва, 2001). – 2001. – С.143. Дисертантом зроблено: обґрунтування вибраного напрямку.
 30. Грищенко В.І., Шепітько В.І., Юрченко Т.М. Вплив трансплантації плаценти на структурні елементи наднирника // Програма і матеріали Пленуму Асоціації ендокринологів України (Львів, 2003). – Львів, 2003. – С. 30–31. Дисертантом зроблено: обґрунтування вибраного напрямку.
 31. Грищенко В.І., Бобирьова Л.Є., Дворнік І.Л., Шепітько В.І. Особливості використання кріоконсервованої фетоплацентарної тканини в комплексній терапії цукрового діабету I типу / Матер. наук.-практ. конф. „Сучасні напрямки розвитку ендокринології”. – Харків, 2003. – С. 51–52. Дисертантом зроблено: обґрунтування вибраного напрямку.
 32. Грищенко В.І., Бобирьова Л.Є., Дворнік І.Л., Шепітько В.І. Вивчення терапевтичної дії кріоконсервованої фетоплацентарної тканини в комплексній терапії цукрового діабету I типу // Програма і матеріали Пленуму Асоціації ендокринологів України (Львів, 2003). – Львів, 2003. – С. 29–30. Дисертантом зроблено: обґрунтування вибраного напрямку.
 33. Kozlova V., Shepitko V., Yurchenco T. Morphological characteristics of the liver tissue reaction to the placenta cryopreserved fragment implantation in the experiment. 36.: „Allograft against disability”. 2nd World Congress on Tissue Banking and 8th International Conference of EATB. 1999, Warsaw, Poland, P. 203. Дисертантом зроблено: набір матеріалу, обчислення та його обґрунтування, написання статті.
 34. Grischenco V., Bobyрева L., Yurchenco T., Shepitko V. Usage of cryopreserved fragments of placenta in the complex therapy of diabetes mellitus. 36.: „Allograft against disability”. 2nd World Congress on Tissue Banking and 8th International Conference of EATB. 1999, Warsaw, Poland, P. 207. Дисертантом зроблено: обґрунтування вибраного напрямку.
 35. Грищенко В.И., Тронько М.Д., Бугаев В.Н., Бобырев В.Н., Бобырева Л.Е., Шепитько В.И., Парий В.Д., Шепитько К.В. Использование криоконсервированных эмбриональных клеток и тканей в комплексной терапии радиационно-обусловленной патологии щитовидной железы / Методические рекомендации.- Полтава, 2000. – 15 с. Дисертантом зроблено: обґрунтування вибраного напрямку.

Шепітько В.І. Структурно-функціональні показники кріоконсервованої плаценти і вплив її трансплантації на морфофункціональний стан ряду внутрішніх органів. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора медичних наук за спеціальністю 14.01.35. – кріомедицина. – Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків, 2004.

Дисертація присвячена вивченню впливу гіпотермії та низьких температур на тканину плаценти та впливу трансплантації плаценти на морфофункціогенез органів. Установлені оптимальні технології кріоконсервування плаценти та довгострокового її зберігання. Уперше встановлено, що підшкірна трансплантація нативної і кріоконсервованої плаценти супроводжується вираженим стимулюючим впливом на різні органи і системи, що пояснюється наявністю в її тканині великої кількості фетальних білків та біологічно активних речовин. У групі тварин при трансплантації кріоконсервованої плаценти реакції регенераторного типу більш виражені, але коротші, ніж у групі тварин при трансплантації нативної плаценти, хоча в обох випадках вони знаходяться в межах фізіологічної регенерації. Проведене комплексне порівняльне дослідження деяких показників периферичної крові, а також морфологічних змін у вогнищі запалення у тварин з експериментальним асептичним запаленням при трансплантації біологічно активних речовин плацентарного походження та експериментально обґрунтована доцільність їх застосування.

Ключові слова: плацента, кріоконсервування, гіпотермія, трансплантація, реакція регенераторного типу, запалення, печінка, селезінка, тимус, надниркові залози, яєчник.

Шепитько В.И. Структурно-функциональные показатели крйоконсервированной плаценты и влияние ее трансплантации на морфофункциональное состояние ряда внутренних органов. – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 14.01.35. – криомедицина. Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков, 2004.

В работе определены оптимальные условия гипотермического и низкотемпературного хранения, оптимизированный процесс крйоконсервирования плаценты. Гипотермическое хранение фрагментов плаценты при $t^{\circ} 4^{\circ}\text{C}$ сроком двое суток (первый подготовительный этап при проведении крйоконсервирования), а также применение диметилсульфоксида в качестве криопротектора при крйоконсервировании не приводит к существенному нарушению активности дегидрогеназ в тканях плаценты человека. Наблюдается лишь небольшое нарушение процесса гликолиза и перекисного окисления липидов. В процессе замораживания и размораживания

активируются ферменты ограниченного протеолиза. Эти протеазы способны частично расщеплять белок, в том числе и пролактин, что может быть обусловлено разрывом кристаллами льда лизосом. Отмечается достоверное, но не существенное снижение концентрации ряда гормонов (пролактин, тестостерон, кортизол) в ткани плаценты после процедуры криоконсервирования. При этом в исследованных образцах плаценты, которые подвергнуты хранению при разных температурах, и вариантах консервации не наблюдается достоверных изменений концентрации белка.

Наибольшее достоверное усиление свободнорадикального перекисного окисления в тканях плаценты происходило при хранении ее 1 сутки при 4°C (2-я серия) и 1 сутки - при -196°C, а затем 1 год - при -20°C (5-я серия). Относительное содержание первичных, вторичных и конечных продуктов перекисного окисления липидов характеризуется близкими к контролю значениями в случае использования режима сохранения плаценты 1 сутки при -20°C или 1 сутки при -20°C с последующим погружением в жидкий азот на 1 год (3–4 серии). Это свидетельствует о том, что условия в 3 и 4 сериях являются оптимальными по сравнению с условиями 2 и 5 серий.

На трансплантацию нативной и криоконсервированной плаценты организм отвечает активной реакцией, которая проявляется в ранние сроки наблюдения (7–14 суток) за счет введения с тканью плаценты большого количества биологически активных веществ, гормонов и других факторов, которые содержатся в большой концентрации в ткани плаценты. В поздние сроки исследования (30–60 суток) в органах преобладают более «спокойные физиологические процессы». Установлено, что криоконсервированная плацента вызывает более выраженную соответствующую реакцию, чем нативная.

В печени экспериментальных животных стимулирующий эффект на стромальные и паренхиматозные элементы сопровождается усилением портальной гемодинамики, расширением синусоидных капилляров, купферовые клетки увеличены, имеют звездчатый вид и нередко превращаются в свободные макрофаги. Установлено адаптивное увеличение количества двоядерных клеток. Количество „темных" и „светлых клеток" в течение эксперимента варьирует. В органе происходит физиологическая перестройка с регенерационными процессами без увеличения массы печеночных клеток и признаков ее повреждения.

Структурные элементы тимуса переживают функциональное напряжение, которое проявляется в виде утолщения соединительнотканной капсулы, увеличении количества сосудов в перегородках между дольками, в корковом веществе увеличено количество митозов клеток, макрофагов. Эпителиоретикулярные клетки при этом имеют вид светлых, со светлым ядром и большим ядрышком клеток. В мозговом веществе увеличивается количество телец Гассала, что также свидетельствует об активных процессах метаболизма.

Структурные элементы селезенки реагируют утолщением капсулы за счет увеличения коллагеновых и эластичных волокон. Выявлена выраженная реакция паренхимы селезенки,

которая характеризуется изменениями в соотношении красной и белой пульпы, отмечается увеличение белой пульпы за счет относительного уменьшения красной. Установлено увеличение количества лимфатических фолликулов белой пульпы, что связано с реакцией органа на введение аллогенной ткани, в результате чего усиливается выработка лимфоцитов, а также незрелых и зрелых плазматических клеток.

В надпочечниках отмечается гипертрофия клубочковой зоны, теряется четкость ее границ с пучковой зоной. Эта зона может значительно расширяться за счет периферических и более глубоко лежащих слоев. Клетки клубочковой зоны по своим размерам и виду становятся похожими на светлые большие клетки пучковой зоны.

В яичнике отмечается увеличение количества первичных фолликулов. Во вторичных фолликулах стенка представлена 3–5 слоями клеток, которые окружают полость с фолликулярной жидкостью, выявляются третичные фолликулы. Ядра овоцитов первого порядка большие и светлые, нити хроматина тонкие и дисперсные.

При экспериментальном воспалении применение экстракта плаценты позволяет в более короткие сроки нормализовать клеточные реакции в очаге воспаления и состояние периферической крови, что проявляется в достоверном угнетении нейтрофильной и усилении макрофагально-фибробластической реакции. То есть, противовоспалительный эффект экстракта проявляется в ограничении альтеративных и усилении репаративных явлений.

Ключевые слова: плацента, криоконсервирование, гипотермия, трансплантация, реакция регенераторного типа, воспаление, печень, селезенка, тимус, надпочечник, яичник.

Shepitko V.I. Structural and functional indices of cryopreserved placenta and influence of its transplantation upon the morphological and functional condition of some internal organs. - Manuscript.

Thesis for a Doctor of Medical Sciences Degree by Speciality 14.01.35. - Cryomedicine. - Institute of Problems of Cryobiology and Cryomedicine, National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, 2004.

The dissertation is devoted to the influence of hypothermia and low temperatures upon placental tissue and the influence of placenta transplantation upon the morphofunctiogeny of some internals. The optimal technologies of placenta cryopreserving and placenta long-term storage have been worked out. First it has been found out that subcutaneous transplantation of both native and cryopreserved placenta is accompanied with strongly pronounced stimulative effect upon the different organs and systems that is explained by a presence in placental tissue of great number of fetal albumins and bioactive agents. The experiments on animals

showed when transplanting of cryopreserved placenta the reactions of regenerative type were more marked but shorter in time interval on the exposure of reactions then in the group of animals undergone the transplantation of native placenta, though in both cases they were within the limits of physiological regeneration. The complex comparative research of some indices of peripheral blood as well as morphological alterations in inflammatory locus in animals having experimental aseptic inflammation under transplantation of placental bioactive agents has been carried out and the expedience of their application has been experimentally proved.

Key words: placenta, cryopreservation, hypothermia, transplantation, reaction of regenerator type, inflammation, liver, spleen, thymus, adrenal gland, ovary.

Список скорочень:

α-ГФДГ	альфа-гліцерофосфатдегідрогеназа
АОЗ	антиоксидантний захист
АТФ	аденозинтрифосфорна кислота
АФП	альфа-фетопротеїн
БАР	біологічно активні речовини
ВРПО	вільнорадикальне перекисне окислення
ДК	дієнові кон'югати
ДМСО	диметилсульфоксид (Me ₂ SO)
ЕП	екстракт плаценти
ЗКЛ	загальна кількість лейкоцитів
ЛДГ	лактатдегідрогеназа
МДА	малоновий диальдегід
НАД	НАД-діафораза
НАДНДГ	нікотинаміддинуклеотид дегідрогеназа
НАДФ	НАДФ-діафораза
НАДФНДГ	нікотинаміддифосфатнуклеотид дегідрогеназа
НСТ	нітросиній тетразолій
ОДК	оксидієнові кон'югати
ПЗ	подвійні зв'язки
ПОЛ	перекисне окислення ліпідів
РНК	рибонуклеїнова кислота
СДГ	сукцинатдегідрогеназа
СОД	супероксиддисмутаза
ТБК	тіобарбітурова кислота
ТК	триєнові кон'югати
ТКП	трансплантація кріоконсервованої плаценти
ТНП	трансплантація нативної плаценти
ТТК	тетраєнові кон'югати
ХГ	хоріонічний гонадотропін
ШО	шифові основи