

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини
Національна академія наук України

Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису

УДК 612.015.21.086.13:611.89.085:612.6.084

НЕСТЕРУК ГАННА ВОЛОДИМИРІВНА
ДИСЕРТАЦІЯ

ВПЛИВ КРІОЕКСТРАКТУ ТА СЕКРЕТОМІВ ВІД КУЛЬТУР КЛІТИН ЗІ
СПІНАЛЬНИХ ГАНГЛІЇВ НА РЕПРОДУКТИВНУ СИСТЕМУ ЩУРІВ

22 – Охорона здоров'я

222 – Медицина

Подається на здобуття наукового ступеня доктор філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____  Нестерук Г.В.

Науковий керівник Легач Євген Іванович, доктор медичних наук, професор,
завідувач відділу кріоендокринології ІПКіК НАН України

Харків – 2023

АНОТАЦІЯ

Нестерук Г.В. Вплив кріоекстракту та секретомів від культур клітин зі спінальних гангліїв на репродуктивну систему щурів. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 222 Медицина (галузь знань 22 Охорона здоров'я), Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків, 2023.

Сучасні соціальні тенденції сприяють підвищенню кількості жінок, які народжують уперше у пізньому репродуктивному віці. Зважаючи на це, репродуктивна медицина стикається з великим колом питань, пов'язаних з безпліддям, підвищеним ризиком ускладнень вагітності, її втрати, аномаліями пологової діяльності тощо. Розвиток допоміжних репродуктивних технологій (ДРТ) на теперішній час дозволяє подолати більшість проблем, пов'язаних із зниженням фертильності.

Протокол стимуляції яєчників для *in vitro* фертилізації включає використання гонадотропінів, які активують розвиток фолікулів гормонозалежних стадій росту. Однак існує численна група пацієнтів (так звані «poor responders»), які погано відповідають на загальноприйнятні протоколи стимуляції яєчників. На теперішній час плацебо-контрольовані дослідження, які включали використання гонадотропінів, андрогенів, соматотропіну, інгібіторів ароматаз, антагоністів гонадоліберіну, L-аргініну, малих доз аспіріну, не показали вагомих результатів у стимуляції дормантних фолікулів у таких пацієнтів. Вищенаведене робить актуальним розробку нових підходів для підвищення ефективності ДРТ.

Нещодавно було показано, що лікування стовбуровими клітинами дозволяє підвищити ефективність ДРТ та загальмувати вікові інволютивні зміни жіночої репродуктивної системи. Проте накопичений на цей час досвід свідчить, що основні ефекти клітинної терапії у організмі пацієнта

реалізуються завдяки біологічно активними речовинам, які синтезуються трансплантованими клітинами. З огляду на це, більш прогресивний підхід полягає у застосуванні секретомів від культур клітин, збагачених на регуляторні та ростові фактори. Це мінімізує ризики імунного відторгнення трансплантованих стовбурових клітин або туморогенності внаслідок їх неадекватного приживлення та диференціювання.

«Клітинний секретом» – це кондиціоноване живильне середовище, одержане в процесі культивування клітин, яке містить продукти їх життєдіяльності, у тому числі ферменти, фактори росту, цитокіни, гормони, медіатори тощо.

Як було з'ясовано в останні роки, нейротрофічні фактори (НФ) – фактор росту нервів (NGF), мозковий нейротрофічний фактор (BDNF), нейротрофін 3 (NT-3), нейротрофін 4/5 (NT-4/5) та гліальний нейротрофічний фактор (GDNF) – не тільки відіграють провідну роль у нервовій системі, але мають неабиякий вплив на формування та функціонування жіночої репродуктивної системи. Отже розробка стратегії корекції асоційованих з віком змін жіночої репродуктивної системи може базуватися на використанні секретомів від культур клітин, які продукують НФ.

Доказано, що у спінальних гангліях (СГ) синтезуються усі перелічені НФ, отже кріоекстракт та секретом від культури клітин зі СГ можуть бути цінним їх джерелом.

Отримання клітинного секретому – це технологія, заснована на використанні методів клітинного культивування, кріоконсервування та довготривалого зберігання клітинних культур у кріобанку. Проте вплив кріоконсервування на склад та біологічні властивості секретомів культур, зокрема культури клітин зі СГ, практично не досліджено.

Зважаючи на вищенаведене, дисертаційна робота присвячена вивченню впливу введення кріоекстракту та секретомів від інтактної та кріоконсервованої культур зі спінальних гангліїв на репродуктивну систему самиць щурів пізнього репродуктивного віку.

У роботі було використано низку біологічно активних речовин, отриманих зі СГ, за наступними міркуваннями. Оскільки СГ анатомічно містить цілу низку клітин (тіла чутливих нейронів, сателітні гліальні клітини, шваннівські клітини, фібробласти, макрофаги, клітини мікросудин), загальний кріоекстракт зі спінальних гангліїв (зКЕСГ) використовували як тотальний препарат усіх водорозчинних речовин СГ. Показано, що молекулярна маса мономерів усіх представників родини НФ знаходиться у межах від 13 до 15 кДа, отже фракціонований кріоекстракт зі спінальних гангліїв (фКЕСГ) використовували як тотальний препарат речовин з молекулярною масою діапазону, в який входять НФ. Раніше було встановлено, що у вибраних умовах культивування первинна культура зі СГ складається в основному з сателітних гліальних клітин. Отже кондиціоновані середовища від інтактною та кріоконсервованої культур клітин зі СГ використовували як секретом від цих клітин. Потрібно відзначити, що кондиціоновані середовища теж піддавали фракціонуванню.

В експериментах використовували білих самиць щурів 6 і 14 місяців, що відповідає репродуктивному віку (РВ) та пізньому репродуктивному віку (ПРВ) у цього виду тварин.

Кріоекстракт готували зі спінальних гангліїв шляхом триразового заморожування в фізіологічному розчині (ФР) до температури -196°C і наступного нагрівання при кімнатній температурі, гомогенізації та центрифугування. Надосад збирали, стерилізували і використовували у подальших експериментах.

Первинну культуру клітин отримували зі СГ ферментативним методом. Клітини висівали у концентрації 5×10^5 кл/мл та культивували при 37°C в атмосфері 5% CO_2 з використанням базового середовища (БС) α -МЕМ з додаванням антибіотиків та 10% фетальної телячої сироватки (ФТС). Кріоконсервування первинної культури здійснювали з використанням кріозахисного розчину на основі α -МЕМ з додаванням 25% ФТС та 7,5% диметилсульфоксиду (ДМСО).

Кондиціоновані середовища від інтактної (КС) та кріоконсервованої культур (ККС) починали збирати через 7-9 діб культивування, коли клітинний ріст переходив до стаціонарної фази. Середовища збирали кожні три доби, порційно заморожували та зберігали при -18°C . Загальний термін культивування, протягом якого збирали середовища, складав 28 діб. Зібрані порції розморожували, об'єднували та фракціонували методом ультрафільтрації з використанням поліефірсульфонової мембрани. Базове середовище культивування, піддане фракціонуванню, було використано як контроль на носій. Контрольний вимір білка за методом Бредфорд у фракціонованих зразках БС, КС та ККС показало відсутність специфічної реакції.

Оскільки раніше було встановлено, що експресія рецепторів до НФ у матці змінюється залежно від фази естрального циклу (ЕЦ), необхідно було синхронізувати старт введення препаратів. Для цього протягом 2-х тижнів перед початком експерименту у тварин брали піхвові мазки. Біологічно активні композиції та розчини-носії (ФР або БС) починали внутрішньочеревно вводити по 0,2 мл у фазі еструсу. Загальний термін введення – 9 днів. Експеримент припиняли на 30-32 добу після закінчення введення.

Наступні методи були використані у роботі: метод органної бані (organ bath) для вивчення скоротливої активності матки (САМ) у відповідь на неспецифічні (КСІ) та специфічні (окситоцин, ОТ) подразники; метод ІФА для дослідження рівнів гормонів репродукції; гістологічний та морфометричний методи для аналізу зрізів тканини яєчників та матки; імуногістохімічний метод для ідентифікації на зрізах матки м'язових структур; методи статистичної обробки для аналізу отриманих результатів.

В результаті виконання роботи були встановлені вікові зміни яєчників та матки самиць щурів. Вони включали: підвищення кількості діб з фазою дієструсу у структурі ЕЦ (на 4% для 4-денного ЕЦ та на 10% для 5-денного ЕЦ); зменшення загальної кількості фолікулів та жовтих тіл у яєчниках на

13%; зниження сили спонтанного, КСІ- та ОТ-індукованого скорочення матки відповідно на 26,7%; 19,7% та 23,1% порівняно з інтактним контролем РВ. Вищевказані зміни САМ самиць щурів ПРВ відбувалися за рахунок зменшення відносної площі гладеньком'язових клітин міометрію, визначених імуногістохімічно за експресією маркерів актину.

Результати експериментів дозволили зробити висновок, що кріоекстракт та секрети від інтактної та кріоконсервованої культур клітин зі СГ є потужними модуляторами фолікулогенезу у яєчниках, особливо у пізньому репродуктивному віці. Введення секретів тваринам ПРВ підвищувало середню кількість діб з фазою еструсу у структурі ЕЦ. При цьому, більш вираженим ефект був від використання секрету від кріоконсервованої культури клітин (показник підвищувався після введення ККС у 2 рази проти підвищення у 1,3 рази після введенням КС).

На рівні фолікулярного профілю яєчників ефект від введення загального КЕСГ та його низькомолекулярної фракції, а також секретів від культур клітин, виражався у зменшенні сумарної кількості фолікулів гормонально незалежних стадій розвитку (примордіальних та первинних фолікулів) у тварин обох вікових груп. У тварин ПРВ спостерігалось зменшення показника на 26-28% за введення зКЕСГ або його низькомолекулярної фракції та на 51% за введення КС або ККС. Це вказувало на стимулюючий вплив кріоекстракту та секретів на вихід фолікулів з дормантного стану.

Спостерігалось підвищення кількості фолікулів на стадії атрезії після введення кріоекстракту, його низькомолекулярної фракції та секретів від інтактної та кріоконсервованої культур. Кількість інших типів фолікулів та жовтих тіл значуще не змінювалася у порівнянні з контролем. Підвищення кількості атретичних фолікулів свідчило, що в результаті активації примордіальних фолікулів та вступу їх на шлях подальшого розвитку, виникає надлишок антральних фолікулів, який пізніше піддається атрезії.

З віком у тварин ПРВ відбувалося зниження співвідношення ЛГ/ФСГ у 4 рази порівняно з щурами РВ. Введення секретомів приводило до підвищення показника ЛГ/ФСГ у тварин ПРВ. Потрібно відзначити, що ефект був більш вираженим за умов введення секретому від кріоконсервованої культури клітин (підвищення у 6,5 рази за введення КС проти 14 разів за введення ККС).

Введення зКЕСГ мало стимулюючу дію на САМ щурів ПРВ. Порівняно з контролем статистично значуще збільшувалися показники ОТ-індукованого скорочення матки: амплітуди скорочення (АС) – у 1,09 рази; сили ізометричного скорочення (СІС) – у 1,3 рази. Після введення фКЕСГ встановлено статистично значуще збільшення АС: КСІ-індукованої у 1,2 рази; ОТ-індукованої у 1,1 рази. У тварин цієї групи також підвищувалася КСІ-індукована СІС у 1,08 рази. Даний ефект спостерігався на фоні збереження нормальної гістологічної будови ендометрію, у тому числі на предімплантаційній стадії, та незмінної товщини міометрію матки.

За введення секретомів від культур клітин зі СГ тваринам ПРВ відбувалося підвищення САМ такою мірою, що показники сягали значень інтактного контролю щурів РВ. Активуючий ефект був більш виражений за умов використання секретому від кріоконсервованої культури клітин, коли підвищувалися як спонтанна (у 1,2 рази), так й ОТ-індукована (у 1,2 рази) та КСІ-індукована (у 1,3 рази) СІС. У разі використання секретому від інтактною культури спостерігалось підвищення лише ОТ-індукованої СІС у 1,1 рази.

За допомогою ІГХ методу було встановлено, на чому базується ефект збільшення САМ після введення секретомів. У інтактних тварин ПРВ відбувалося зменшення мічення антитілами до актину гладеньких м'язів у 1,5 рази порівняно з тваринами РВ, що свідчило про вікові інволютивні структурні перебудови міометрію. Проте застосування секретомів у тварин цієї вікової групи призводило до підвищення площі позитивного мічення актину за введення КС у 2,7 рази, тоді як за введення ККС у 2,6 рази. Кількісний морфометричний аналіз продемонстрував, що після введення КС

та ККС у тварин ПРВ відбувалося значуще підвищення щільності міоцитів та збільшення площі міометрію матки. Таким чином, ефект підвищення САМ реалізувався за рахунок гіперплазії та гіпертрофії гладеньких міоцитів у матці експериментальних тварин ПРВ.

Оскільки було встановлено вплив кріоекстракту та секретомів від культур клітин зі спінальних гангліїв на фолікулярний профіль яєчників та САМ, необхідно було перевірити, як він відображається на реалізації репродуктивної функції самиць щурів. Зважаючи на це, на наступному етапі роботи було проведено експерименти *in vivo* з запліднення щурів РВ та ПРВ. Самиці ПРВ не давали потомство у групі контролю (введення ФР) та у групі з введенням кріоекстракту. У групах тварин цього ж віку з введенням секретомів від культур клітин зі СГ було отримано потомство. При цьому, за використання секретому від кріоконсервованої культури середня запліднюваність тварин була 70%, тоді як за використання секретому від інтактною культури – 66,8%.

У експериментах з клітинною лінією PC12, яка має специфічні властивості змінювати морфологію у відповідь на присутність НФ (нейротрансформація), було перевірено НФ-подібну активність кріоекстракту та секретомів від культур клітин зі СГ. Така активність була виявлена у секретах, отриманих від інтактною та кріоконсервованою культур. Кріоекстракт не показав НФ-подібну біологічну активність у тесті нейротрансформації лінії PC12.

Загальновідомо, що у процесі кріоконсервування клітини піддаються обробці кріопротектором та охолодженню, в результаті чого спостерігається зниження їх життєздатності, модифікація проліферативної та функціональної активності. Нами було продемонстровано схожість біологічних ефектів секретомів від інтактною та кріоконсервованою культур зі СГ, що дозволяє використовувати технології низькотемпературного зберігання культури для отримання секретому без втрати його біологічного ефекту.

Отримані результати свідчать про ефективність використання секретомів від клітин зі спінальних гангліїв та нейротрофічних факторів, отриманих з них, для корекції вікових інволютивних змін жіночої репродуктивної системи. Взагалі ефективність біологічної дії використаних у роботі композицій на вивчені показники репродуктивної системи самиць щурів можна розподілити у ряду: кріоекстракт < секретом від інтактної культури < секретом від кріоконсервованої культури.

Ключові слова: репродуктивна функція, менопауза, кріоконсервована культура клітин, секретом, кріоекстракт, нейротрофіни, естрадіол, прогестерон, щури.

ANNOTATION

Nesteruk H. Effect of cryoextract and cell culture secretomes from dorsal root ganglia on reproductive system of rats. – Qualifying scientific work on the rights of manuscript.

Dissertation for obtaining the scientific degree of Doctor of Philosophy in specialty 222 Medicine (branch of knowledge 22 Health care), Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, 2023.

Current social trends contribute to an increase in the number of women giving birth for the first time at a late reproductive age. Consequently, reproductive medicine is faced with a wide range of issues related to infertility, increased risk of pregnancy complications, pregnancy loss, discoordinated labor activity etc. The development of assisted reproductive technologies (ART) currently makes it possible to overcome most of the problems associated with decreased fertility.

The ovarian stimulation protocol for *in vitro* fertilization involves the use of gonadotropins, which activate the development of follicles at hormone-dependent stages of growth. However, there is a large group of patients (so-called «poor responders»), who do not respond well to conventional ovarian stimulation protocols. Currently, the placebo-controlled studies, examined the use of gonadotropins, androgens, somatotropin, aromatase inhibitors, GnRH antagonists, L-arginine, and low-dose aspirin demonstrated no significant results in stimulation of dormant follicles. All of the above makes it urgent to develop new approaches to increase the effectiveness of ART.

Recently, the stem cell therapy has been shown to improve the ART effectiveness and slow down the age-related involution in the female reproductive system. However, the experience gained so far suggests that the main effects of cell therapy in the patient's body are realized due to biologically active substances

synthesized by transplanted cells. Taking this fact into account, a more progressive approach is to use the secretomes from cell cultures enriched with regulatory and growth factors. This minimizes the risks of immune rejection of transplanted stem cells or tumorigenicity because of their inadequate engraftment and differentiation.

“Cellular secretome” is a conditioned nutrient medium obtained during cell cultivation, containing the products of their metabolic activity, including enzymes, growth factors, cytokines, hormones, mediators, etc. In recent years, the neurotrophic factors (NF), which include nerve growth factor (NGF), brain-derived neurotrophic factor (BDNF), neurotrophin 3 (NT-3), neurotrophin 4/5 (NT-4/5) and glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), have been shown not only to play a leading role in the nervous system, but also have a great influence on the formation and functioning of the female reproductive system. Therefore, the development of a strategy for correcting the age-associated changes in the female reproductive system can be based on the use of secretomes from cell cultures that produce NF.

It has been proven that all of the listed factors are synthesized in the dorsal root ganglia (DRG), so the cryoextract and cell culture secretome from DRG can be a valuable source of NF.

Obtaining a cell secretome is a technology based on the use of cultivation, cryopreservation and long-term storage of cell cultures in a cryobank. However, the effect of cryopreservation on the composition and biological properties of culture secretomes, in particular DRG cell cultures, is hardly understood.

Taking into consideration the above mentioned, the dissertation covers the study of the impact of administration of cryoextract and secretomes from intact and cryopreserved cultures from the dorsal root ganglia on the reproductive system of female rats of late reproductive age.

Guided by the following considerations, a number of biologically active substances obtained from DRG were used in the study. Since the DRG anatomically contains a number of cells (somata of sensory neurons, satellite glial cells, Schwann cells, fibroblasts, macrophages, microvasculature cells), a total

cryoextract from the dorsal root ganglia (tCDRG) was used as a total preparation of all DRG water-soluble substances. It has been shown that the molecular weight of the monomers of all NF-family members is within the range from 13 to 15 kDa, therefore the fractionated cryoextract from the dorsal root ganglia (fCDRG) was used as a total preparation of substances with a molecular weight within the range that includes NF. It was previously established that under the selected culture conditions, the primary culture from DRG consisted mainly of satellite glial cells. Consequently, the conditioned media from the intact and cryopreserved cell cultures were used as a secretome of these cells. It should be noted that the conditioned media were also subjected to fractionation.

Experiments were conducted in female white rats of 6 and 14 months old, which corresponded to reproductive age (RA) and late reproductive age (LRA) in this animal species.

A cryoextract was prepared by three times freezing of DRG in saline (S) to a temperature of -196°C and subsequent heating at room temperature, homogenization and centrifugation. The supernatant was collected, sterilized, and used in further experiments.

The primary cell culture was obtained from DRG using the enzymatic method. Cells were seeded at a concentration of 5×10^5 cells/ml and cultured at 37°C in an atmosphere of 5% CO_2 using α -MEM basal medium (BM) supplemented with antibiotics and 10% fetal bovine serum (FBS). Cryopreservation of the primary culture was carried out using a cryoprotectant solution based on α -MEM with the addition of 25% FBS and 7.5% dimethyl sulfoxide (DMSO).

The conditioned media from the intact (ICM) and cryopreserved (CCM) cell cultures started to be collected on 7th-9th days of cultivation, when cell growth entered the stationary phase. The media were collected every three days, frozen in portions and stored at -18°C . The total cultivation period during which the media were collected was 28 days. The collected portions were thawed, combined and fractionated by ultrafiltration using a polyethersulfone membrane. Fractionated

BM was used as carrier control. Control protein assay using the Bradford method in fractionated samples of BM, ICM and CCM showed the absence of a specific reaction.

Since it was previously established that the expression of NF-receptors in the uterus varied depending on the phase of the estrous cycle (EC), it was necessary to synchronize the start of substances administration. To do this, the vaginal smears were taken from the animals within 2 weeks before the start of the experiment. Biologically active compositions and carrier solutions (S or BM) started to be administered intraperitoneally at 0.2 ml in the estrus phase. The total period of administration was 9 days. The experiment was stopped to days 30-32 after the end of administration.

The following methods were used in this research: the organ bath to study the uterine contractile activity (UCA) in response to nonspecific (KCl) and specific (oxytocin, OT) stimuli; ELISA for studying the levels of reproductive hormones; histological and morphometric methods for analyzing the sections of ovarian and uterine tissue; immunohistochemical method for identifying the muscle structures on uterine sections; statistical processing methods for analyzing the results obtained.

As a result of the work, the age-related changes in the ovaries and uterus of female rats were established. They were as follows: an increase in the number of diestrus phases in the EC structure (by 4% for a 4-day EC and by 10% for a 5-day EC); reduction in the total number of follicles and *corpus luteum* in the ovaries by 13%; decrease in the strength of spontaneous, KCl- and OT-induced uterine contractions by 26.7%, 19.7% and 23.1% respectively as compared with the intact RA control. The above changes in the UCA of LRA female rats occurred due to a decrease in the relative area of myometrial smooth muscle cells, identified immunohistochemically by the expression of actin markers.

The experimental results allowed us to conclude that the cryoextract and secretomes from the intact and cryopreserved cell cultures from DRG were powerful modulators of folliculogenesis in the ovaries, especially in late

reproductive age. Administration of secretomes to LRA animals increased the average number of estrus phases in the EC structure. At the same time, the effect was more pronounced when using the secretome of a cryopreserved cell culture (the index was 2-fold increased after CCM administration versus a 1.3-fold rise after ICM introduction).

At the level of the ovarian follicular profile, the effect of the introduction of total CDRG and its low-molecular fraction as well as cell cultures secretomes was expressed in a decrease in the total number of follicles of hormonally independent stages of development (primordial and primary follicles) in animals of both age groups. In the LRA animals, a 26-28% decrease in the index was observed with the administration of total CDRG or its low-molecular fraction, and a 51% reduction with the introduction of either ICM or CCM. This indicated a stimulating effect of the cryoextract and secretomes on the primordial follicle activation from the dormant state. An increase in the number of follicles at the stage of atresia was observed after the introduction of cryoextract, its low-molecular weight fraction and secretomes from intact and cryopreserved cultures. The number of other types of follicles and *corpus luteum* did not change significantly compared to the control. An increase in the number of atretic follicles indicated that as a result of the activation of primordial follicles and their further development, an excess of antral follicles appeared, which subsequently underwent atresia.

With age, the ratio of LH/FSH decreased by 4 times in animals of this group compared to RA rats. The introduction of secretomes led to an increase in the LH/FSH ratio in LRA animals. It should be noted that the effect was more pronounced when the secretome from cryopreserved cell culture was administered (6.5-fold increase when injected ICM versus a 14-fold rise for CCM).

The introduction of total CDRG had a stimulating effect on the UCA of LRA rats. In comparison with the control, it significantly increased the parameters of OT-induced contraction of the uterus: amplitude of contraction (AC) – by 1.09 times; tension of isometric contraction (TIC) – by 1.3 times. After the introduction of CDRG, a significant increase in AC was established: KCl-induced – by 1.2

times; OT-induced – by 1.1 times. KCl-induced TIC increased by 1.08 times in animals of this group. This effect was observed against the background of preservation of the normal histological structure of the endometrium including the preimplantation stage, and unchanged thickness of the myometrium of the uterus.

When the DRG-derived cell culture secretomes were administered to LRA animals, there was such an increase in UCA indices that they reached the values of intact control RA rats. The activating effect was more pronounced when secretome from cryopreserved cell culture was used, where both spontaneous TIC (by 1.2 times), and induced TIC (OT-induced by 1.2 times, KCl-induced by 1.3 times) increased. When using the secretome from an intact culture, an increase in only OT-induced TIC by 1.1 times was observed.

Using the IHC method, the basis for the effect of UCA increasing after secretome administration was determined. In the intact LRA animals, there was a 1.5-fold decrease in labeling with antibodies to smooth muscle actin compared with RA animals, which indicated the age-related involutional structural changes in the myometrium. However, the use of secretomes in animals of this age group led to a 2.7-fold increase in the area of positive actin labeling after ICV administration, whereas after CCM introduction it was 2.6-fold. Quantitative morphometric analysis showed a significant augmentation of myocyte density and an increase in the uterine myometrium area in LRA animals after the administration of ICM and CCM. Thus, the effect of increasing UCA was realized due to hyperplasia and hypertrophy of smooth myocytes in the uterus of experimental LRA animals.

Since the influence of cryoextract and cell culture secretomes from dorsal root ganglia on the follicular profile of the ovaries and UCA was established, it was necessary to check how this affected the reproductive function of rats. Subsequently, at the next stage of the work, *in vivo* experiments were carried out on the fertilization of RA and LRA rats. Control LRA females (saline introduction) and LRA females with administration of cryoextract did not give birth to offspring. In groups of animals of this age, with the administration of DRG-derived cell culture secretomes the offspring were obtained. Moreover, when using a secretome

from a cryopreserved culture, the average fertility of animals was 70%, while using a secretome from an intact culture, it was 66.8%.

In experiments with the PC12 cell line, which has specific capacity to change morphology in response to the presence of NF (neurotransformation), the NF-like activity of DRG-derived cryoextract and cell culture secretomes was tested. Such activity was detected in secretomes obtained from intact and cryopreserved cultures. Cryoextract did not show NF-like biological activity in the neurotransformation test of the PC12 cell line.

It is well known that during the process of cryopreservation, cells are exposed to the influence of a cryoprotectant and cooling, as a result of which a decrease in their viability and a modification of proliferative and functional activity are observed. We have demonstrated the biological effect of secretomes from intact and cryopreserved cultures from DRG to be similar, which allows the use of low-temperature culture storage technologies to obtain a secretome without losing its biological effect.

These findings indicate the effectiveness of using DRG-derived cell culture secretomes and neurotrophic factors obtained to correct the age-related involutional changes in the female reproductive system. In general, the effectiveness of the biological impact of the compositions used on all the studied indices of the reproductive system of female rats can be distributed in the following order: cryoextract < secretome from an intact culture < secretome from a cryopreserved culture.

Key words: reproductive function, menopause, cryopreserved cell culture, secretome, cryoextract, neurotrophins, estradiol, progesterone, rats.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації

Статті у фахових журналах України

1. Нестерук Г. В., Колот Н. В., Проценко О. С., Падалко В. І., Легач Є. І. Вплив кріоекстракту спінальних гангліїв на структурно-функціональні характеристики яєчників щурів різного віку. *Вісник проблем біології і медицини*. 2020; 4(158): 173-177. <http://dx.doi.org/10.29254/2077-4214-2020-4-158-173-177>
2. Нестерук Г.В., Легач Є.І. Біологічні ефекти низькомолекулярної фракції кріоекстракту спінальних гангліїв на репродуктивну систему самиць щурів. *Вісник проблем біології і медицини*. 2023; 2 (169): 402-409. <http://dx.doi.org/10.29254/2077-4214-2023-2-169-402-409>

Статті у фахових журналах, внесених у міжнародну базу Scopus

3. Nesteruk, H., Ustichenko, V., Alabedalkarim, N., Padalko, V., Protsenko, O., & Legach, I. (). Impact of Dorsal Root Ganglia Cryoextract on Histological Steatures in Dices and Contractility of Uterus in Differently Aged Rats. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine*, 2021; 31(3): 258–267. <https://doi.org/10.15407/cryo31.03.258>
4. Нестерук Г.В., Алабедацькарім Н.М., Колот Н.В., Комаромі Н.А., Проценко О.С., Легач Є.І. Вплив кондиційованих середовищ від культур гліальних клітин на репродуктивну систему щурів різного віку. *Проблеми ендокринної патології*. 2022; 2: 88-96. <https://doi.org/10.21856/j-PEP.2022.2.13>
5. Nesteruk H.V., Alabedalkarim N.M., Komaromi N.A., Tkachenko N.O., Protsenko O.S., Lehach E.Y. Influence of conditioned media from glial cell cultures on contractility of uterine in rats of different ages . *Reproductive Endocrinology*. 2022; 1-2 (63-64): 85–90. <https://doi.org/10.18370/2309-4117.2022.63.85-90>

Наукові праці які засвідчують апробацію матеріалів дисертації

6. Нестерук А. В., Устиченко В. Д., Алабедацькарим Н. М., Легач Е. И., Бондаренко Т. П. Морфофункціональні характеристики матки крес позднего репродуктивного возраста при введенні криоекстракта спинальних гангліїв // Dynamics of the development of world science. Abstracts of the 9th International scientific and practical conference. Perfect Publishing. Vancouver, Canada. 2020. P. 756-761.
7. Нестерук Г.В, Колот Н.В., Проценко О.С., Падалко В.І., Шаповал О.В., Легач Є.І. Вплив кріоекстракту спінальних гангліїв на складові пулу жовтих тіл в яєчниках щурів різного віку. Матеріали Четвертої Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю «Теорія та практика сучасної морфології», Дніпро, 4-6 листопада 2020. – С. 79-81.
8. Нестерук Г.В., Устиченко В.Д., Алабедацькарім Н.М., Легач Є.І. Вплив кріоекстракту спінальних гангліїв на естральний цикл щурів різного віку // Науково-практична конференція «Фундаментальні науки – практичній медицині: морфо-функціональні методи дослідження онтогенетичних перетворень, фізіологічних та метаболічних процесів, змодельованих патологічних станів, при захворюваннях внутрішніх органів (присвяченої 80-річчю з Дня народження професора Шутки Б.В.)», Івано-Франківськ, Івано-Франківський національний медичний університет, 30 вересня - 2 жовтня 2020, С. 44-46.
9. Nesteruk H., Legach E. Impact of spinal ganglia cryoextract introduction on contractile activity of uterine myometrium of late reproductive age rats. Щорічна міжнародна конференція молодих вчених «Cold in Biology and Medicine: Current Problems in Cryobiology, Transplantology, and Biotechnology», Харків, 2020, Problems of Cryobiology and Cryomedicine, 2020; 30(3), 291. <https://doi.org/10.15407/cryo30.03.291>
10. Nesteruk H., Legach E. Uterine contractility in aged rats after administration of conditioned media from cryopreserved glial cell culture, Щорічна міжнародна конференція молодих вчених «Cold in Biology and Medicine:

Current Problems in Cryobiology, Transplantology, and Biotechnology», Харків, 25 травня, 2022, Problems of Cryobiology and Cryomedicine, 2022; 32 (4), 300. <https://doi.org/10.15407/cryo32.04.300>

11. Нестерук Г.В., Устиченко В.Д., Алабедацькарім Н.М., Легач Є.І., Шевцова М.Ю. Вплив кріоекстракту спінальних гангліїв на KCl-індуковану скорочувальну активність матки щурів різного віку. Матеріали XI Міжнародної науково-практичної конференції «Actual trends of modern scientific research», 6-8 червня 2021, Мюнхен, Німеччина; 2021: 114-119.
12. Нестерук Г.В., Сидоренко О.С., Легач Є.І. Нейротрофін-подібна активність кондиціонованих середовищ від культур клітин зі спінальних гангліїв. Матеріали VI Міжнародної науково-практичної конференції «European scientific congress», 10-12 липня, 2023, Мадрид, Іспанія; 2023: 48-52.

ЗМІСТ

	Стор.
АНОТАЦІЯ	2
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, ОДИНИЦЬ ТА СКОРОЧЕНЬ	23
ВСТУП	25
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	33
1.1. Рівні регуляції жіночої репродуктивної системи та роль нейротрофічних факторів у її розвитку та функціонуванні	33
1.1.1. Рівні нейро-гуморальної регуляції жіночої репродуктивної системи.	33
1.1.2. Роль нейротрофічних факторів у розвитку та функціонуванні жіночої репродуктивної системи	35
1.2. Кондиційовані середовища від культур клітин як унікальне джерело біологічно активних речовин	42
1.3. Морфологічні та функціональні особливості яєчників та матки щурів під час репродуктивного старіння	49
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	54
2.1. Загальні положення	54
2.2. Експериментальні тварини	54
2.3. Приготування загального кріоекстракту спінальних гангліїв	54
2.4. Приготування фракції кріоекстракту спінальних гангліїв	55
2.5. Отримання культури клітин зі спінальних гангліїв	55
2.6. Кріоконсервування культури клітин зі спінальних гангліїв	56
2.7. Отримання кондиціонованих середовищ	57
2.8. Введення біологічно активних композицій	57
2.9. Визначення фази естрального циклу у щурів	58
2.10. Гістологічний аналіз	58
2.11. Морфометричний аналіз	58

	21
2.12. Дослідження скоротливої активності ізольованих смужок матки	59
2.13. Вимірювання гормонів	60
2.14. Імуногістохімічний аналіз	60
2.15. Дослідження НФ-подібної біологічної активності кріоекстракту та секретомів за допомогою клітин лінії PC12	60
2.16. Дослідження репродуктивної функції самиць щурів	61
2.17. Дизайн дослідження	61
2.18. Статистичний аналіз	63
РОЗДІЛ 3. ВПЛИВ КРІОЕКСТРАКТУ СПІНАЛЬНИХ ГАНГЛІЇВ НА МОРФОЛОГІЧНІ ТА ФУНКЦІОНАЛЬНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЯЄЧНИКІВ ЩУРІВ РІЗНОГО ВІКУ	64
3.1. Вплив кріоекстракту спінальних гангліїв на естральний цикл щурів різного віку	64
3.2. Вплив кріоекстракту спінальних гангліїв на морфологічні характеристики яєчників щурів різного віку	70
РОЗДІЛ 4. ВПЛИВ КРІОЕКСТРАКТУ СПІНАЛЬНИХ ГАНГЛІЇВ НА МОРФОЛОГІЧНІ ТА ФУНКЦІОНАЛЬНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ МАТКИ ЩУРІВ РІЗНОГО ВІКУ	81
4.1. Вплив кріоекстракту спінальних гангліїв на морфологічні особливості матки щурів різного віку	81
4.2. Вплив кріоекстракту спінальних гангліїв на скоротливу активність міометрію матки щурів різного віку	84
РОЗДІЛ 5. ВПЛИВ СЕКРЕТОМІВ ВІД КУЛЬТУР КЛІТИН ЗІ СПІНАЛЬНИХ ГАНГЛІЇВ НА МОРФОЛОГІЧНІ ТА ФУНКЦІОНАЛЬНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЯЄЧНИКІВ ЩУРІВ РІЗНОГО ВІКУ	93
РОЗДІЛ 6. ВПЛИВ СЕКРЕТОМІВ ВІД КУЛЬТУР КЛІТИН ЗІ СПІНАЛЬНИХ ГАНГЛІЇВ НА МОРФОЛОГІЧНІ ТА ФУНКЦІОНАЛЬНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ МАТКИ ЩУРІВ РІЗНОГО	

	22
ВІКУ	102
РОЗДІЛ 7. БІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ КОМПОЗИЦІЙ, ОТРИМАНИХ ЗІ СПІНАЛЬНИХ ГАНГЛІЇВ, <i>IN VITRO</i> ТА <i>IN VIVO</i>	110
7.1. Біологічна активність композицій, отриманих зі спінальних гангліїв, <i>in vitro</i>	110
7.2. Біологічна активність композицій, отриманих зі спінальних гангліїв, <i>in vivo</i>	116
УЗАГАЛЬНЕННЯ ТА ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ	121
ВИСНОВКИ	131
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	134
Додаток А	165
Додаток Б	168

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, ОДИНИЦЬ ТА СКОРОЧЕНЬ

BDNF – мозковий нейротрофічний фактор

GDNF – гліальний нейротрофічний фактор

NGF – фактор росту нервів

NT-3 –нейротрофін 3

NT-4/5 – нейротрофін 4/5

PBS – фосфатно-сольовий буфер

АС – амплітуда скорочення

БС – базове середовище

Д – дієструс

ДМСО – диметилсульфоксид

ДРТ – допоміжні репродуктивні технології

E₂ – естрадіол

Е – еструс

ЕЦ – естральний цикл

ЖТЯ – жовте тіло яєчника

зКЕСГ – загальний кріоекстракт спінальних гангліїв

ІЕЦ – іррегулярний естральний цикл

ІС – ізольована смужка

ІЦ – іррегулярний цикл

КЕСГ – кріоекстракт спінальних гангліїв

КС – кондиціоноване середовище від інтактної культури

ККС – кондиціоноване середовище від кріоконсервованої культури

ЛГ – лютеїнізуючий гормон

М – метаеструс

НФ – нейротрофічні фактори

ОТ – окситоцин

П – про еструс

ПГ – прогестерон

ПНС – периферична нервова система

ПРВ – пізній репродуктивний вік

РВ – репродуктивний вік

САМ – скоротлива активність матки

СГ – спінальні ганглії

СГК – сателітні гліальні клітини

СІС – сила ізометричного скорочення

фКЕСГ – фракція кріоекстракту спінальних гангліїв

ФСГ – фолікулостимулювальний гормон

ФР – фізіологічний розчин

ФТС – фетальна теляча сироватка

ЦНС – центральна нервова система

ЧН – чутливі нейрони

ЧС – частота скорочення

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження.

У теперішній час в Україні спостерігається тенденція до підвищення віку жінок, які народжують дитину вперше [1, 2]. Це пов'язано з тим, що жінки намагаються спочатку реалізувати себе на професійному терені, а після досягнення певного соціального статусу замислюються над тим, щоб народити дитину. Розвиток допоміжних репродуктивних технологій (ДРТ) сприяє тому, щоб кожна жінка отримала можливість мати бажану дитину. Однак реалізація вікових змін функціональної спроможності органів репродукції, зокрема зниження оваріального резерву яєчників, підвищення ризику втрати вагітності, ускладнень вагітності, передчасних або ускладнених пологів та кесарева розтину [1–3], ставить сучасну репродуктивну медицину перед новими викликами. За спостереженнями, через витрачання оваріального резерву у 38-40 років фертильними залишаються лише близько 50% жінок [4]. Часто жінка, яка вибрала відкладене дітонародження, має не тільки скорочений оваріальний резерв, але й абортний анамнез та дисбаланс гормонів гіпоталамо-гіпофізарно-яєчникової осі.

Сучасний розквіт ДРТ дозволяє подолати більшість проблем, пов'язаних із зниженням фертильності [5, 6], але навіть у програмах ДРТ жінки старшого репродуктивного віку мають підвищений ризик репродуктивних втрат [1]. Крім цього, існує група пацієнтів – так звані «poor responders» (ті, хто погано відповідає на протоколи стимуляції яєчників), які потребують розробки нових підходів у галузі ДРТ [7].

Нещодавно було показано, що лікування стовбуровими клітинами дозволяє підвищити ефективність ДРТ та загальмувати вікові інволютивні зміни жіночої репродуктивної системи [8–11]. Однак накопичений на цей час досвід свідчить, що основні ефекти клітинної терапії у організмі пацієнта реалізуються завдяки біологічно активними речовинам, які синтезуються трансплантованими клітинами [12]. З огляду на це, сучасний підхід полягає у

застосуванні секретомів від культур клітин, що мінімізує ризики імунного відторгнення трансплантованих стовбурових клітин або туморогенності внаслідок їх неадекватного приживлення та диференціювання [13–15].

«Клітинний секретом» – це кондиціоноване живильне середовище, одержане в процесі культивування *in vitro* клітин, яке містить продукти їх життєдіяльності, у тому числі ферменти, фактори росту, цитокіни, гормони, медіатори. Секретом містить сигнальні пептиди, які процесуються за класичним шляхом секреції; білки, що злищуються з клітинної поверхні; внутрішньоклітинні білки, що вивільняються некласичним шляхом секреції, екзосоми [16]. Клінічні випробування секретомів, отриманих з різних джерел, вказують на ефективність даного підходу в якості безпечної альтернативи клітинної терапії. [17–20].

Як було з'ясовано в останні роки, нейротрофічні фактори – фактор росту нервів (NGF), мозковий нейротрофічний фактор (BDNF), нейротрофін 3 (NT-3), нейротрофін 4/5 (NT-4/5) та гліальний нейротрофічний фактор (GDNF) – не тільки відіграють провідну роль у нервовій системі, але мають неабиякий вплив на розвиток та формування жіночої репродуктивної системи. Зокрема показано, що первинне складання примордіальних фолікулів індукується комплементарними ефектами NGF, NT4/5 і BDNF та їхніх рецепторів [21–23]; NGF, GDNF та NT3 посилюють активацію примордіальних фолікулів [21, 24, 25]. Стимуляція дозрівання ооциту та овуляція опосередковується NGF та BDNF [26]. Нейротрофіни NGF та NT3 сприяють продукції та секреції яєчниками стероїдних гормонів та простагландинів [27]. Отже розробка стратегії збільшення кількості преовуляторних фолікулів, особливо у «poor responders»-пацієнтів може базуватися на використанні секретомів від культур клітин, які продукують нейротрофіни. Таким чином, цей актуальний та важливий напрямок ДРТ потребує всебічного вивчення.

Доказано, що сателітні гліальні клітини спінальних гангліїв (СГ) синтезують NGF, BDNF, NT-3, NT-4/5 та GDNF [28–30], отже кондиціоноване середовище від такої культури може бути цінним джерелом

НФ. Ще одним з можливих джерел НФ є кріоекстракт зі спінальних гангліїв (СГ). Доречи, ефективність кріоекстрактів з різних органів та тканин було показано раніше при лікуванні патологій жіночої репродуктивної системи [31, 32]. Успішність застосування саме кріоекстракту СГ було продемонстровано раніше за умов експериментального лікування патології сечостатевої системи [33].

Отримання клітинного секретому – це технологія, заснована на використанні методів клітинного культивування, кріоконсервування та довготривалого зберігання клітинних культур у кріобанку. Кріоконсервування є єдиним надійним засобом збереження первинних культур клітин на тривалому терміні, оскільки такі культури мають схильність до деградації при множинних пересівах при підтримці їх в умовах культивування *in vitro*. Можливість зберігати клітини шляхом кріоконсервування, якщо вони не можуть бути використані безпосередньо після отримання, зменшує втрату кількості клітин та їх основних морфофункціональних характеристик. У медико-біологічних дослідженнях кріоконсервування дозволяє зберігати біологічний матеріал з того ж самого джерела та використовувати його у зручний момент, сприяє стандартизації протоколів отримання, гарантуючи його ідентичність. Проте вплив кріоконсервування на склад та біологічні властивості секретомів практично не досліджено.

Зв'язок з науковими програмами, планами, темами. Дисертація виконана у відділі кріоендокринології Інституту проблем кріобіології і кріомедицини (ІПКіК) НАН України в рамках науково-дослідних тем «Властивості кріоконсервованих первинних культур клітин ендокринних залоз неонатальних тварин *in vitro* та *invivo* при трансплантації» (№ 0116U003494, НАН України, 2016-2020 рр.); «Морфофункціональні характеристики, кріоконсервування та терапевтичний потенціал 2D- і 3D-культур клітин, отриманих з похідних нервового гребня» № 0121U109133, НАН України, 2021-2026 рр.).

Мета і завдання дослідження.

Мета роботи — вивчення впливу кріоекстракту та секретомів від інтактної та кріоконсервованої культур зі спінальних гангліїв на репродуктивну систему щурів пізнього репродуктивного віку.

Відповідно до поставленої мети передбачалося вирішити такі **завдання**:

1. Дослідити вплив кріоекстракту зі СГ на профіль естрального циклу та морфофункціональні характеристики яєчників у щурів різного репродуктивного віку.
2. Вивчити вплив кріоекстракту зі СГ на морфологічні характеристики матки та параметри її скоротливої активності у щурів різного репродуктивного віку.
3. Дослідити вплив секретомів від інтактної та кріоконсервованої культур клітин зі СГ на профіль естрального циклу та морфофункціональні характеристики яєчників у щурів різного репродуктивного віку.
4. Вивчити вплив секретомів від інтактної та кріоконсервованої культур клітин зі СГ на морфологічні характеристики матки та параметри її скоротливої активності у щурів різного репродуктивного віку.
5. Оцінити специфічну НФ-подібну дію кріоекстракту та секретомів від інтактної та кріоконсервованої культур клітин зі СГ у тесті нейротрансформації клітин лінії РС12.
6. Оцінити вплив кріоекстракту та секретомів від інтактної та кріоконсервованої культур клітин зі СГ на репродуктивну функцію щурів різного репродуктивного віку.

Об'єкт дослідження — морфологічні та функціональні зміни стану репродуктивної системи самиць щурів пізнього репродуктивного віку до та після введення кріоекстракту та секретомів від інтактної та кріоконсервованої культур клітин зі спінальних гангліїв.

Предмет дослідження – кріоекстракт та секретомі від культур клітин зі спінальних гангліїв як біологічно активні композиції, що включають нейротрофічні фактори.

Методи дослідження. У роботі використані наступні методи досліджень: кріобіологічні методи для отримання кріоекстракту та кріоконсервованої культури клітин зі СГ; метод культивування для отримання секретомів культур клітин зі СГ та відтворення тесту на нейротрансформацію клітин лінії PC12; метод ІФА для дослідження рівнів гормонів репродукції; метод органної бані (organ bath) для вивчення скорочення ізольованих м'язових смужок матки у відповідь на неспецифічні та специфічні подразники; гістологічний та морфометричний методи для аналізу зрізів тканини яєчників та матки; імуногістохімічний метод для дослідження зрізів тканини матки на вміст м'язових структур; методи статистичної обробки для аналізу отриманих результатів.

Наукова новизна отриманих результатів.

У дисертаційній роботі *вперше* на експериментальній моделі було встановлено вплив кріоекстракту та секретомів від культур клітин зі спінальних гангліїв на морфофункціональні характеристики яєчників та матки щурів. *Вперше* показана можливість використання клітин зі спінальних гангліїв і отриманих від них секретомів, що містять нейротрофічні фактори, з метою корекції вікових інволютивних змін жіночої репродуктивної системи. *Вперше* встановлено, що введення кріоекстракту та секретомів від культур клітин зі спінальних гангліїв сприяє активації примордіальних фолікулів яєчників та виходу їх з дормантного стану. *Вперше* показано, що на фоні вікових інволютивних змін жіночої репродуктивної системи відбувається зниження експресії актину у гладеньких міоцитах міометрію матки. *Вперше* показано, що введення секретомів від культур клітин зі спінальних гангліїв сприяє нормалізації скоротливої активності матки у тварин пізнього репродуктивного віку за рахунок збільшення щільності гладеньких міоцитів у міометрію матки та підвищення експресії актину в них. *Вперше*

продемонстровано, що застосування секретомів від культур клітин зі спінальних гангліїв сприяють відновленню балансу гонадотропінів у тварин пізнього репродуктивного віку. *Вперше* встановлено збереженість основних показників біологічної дії секретому від культури клітин зі спінальних гангліїв після її кріоконсервування.

Практичне значення отриманих результатів.

Результати, отримані в ході виконання дисертаційної роботи, вносять свій внесок у розкриття механізмів нейро-гуморальної регуляції процесів формування фолікулярного профілю яєчників. В результаті розв'язання поставлених в роботі задач зроблені висновки щодо використання кріоекстракту та секретомів від культур клітин зі спінальних гангліїв з метою корекції вікових інволютивних змін жіночої репродуктивної системи. Експериментальні результати, отримані в ході виконання дисертаційної роботи, обґрунтували доцільність використання безклітинних кондиціонованих середовищ з НФ-подібною дією для профілактики або запобігання патологічних змін органів жіночої репродуктивної системи. Отримані у роботі результати свідчать про перспективність секретомів від культур клітин зі спінальних гангліїв у програмах ДРТ для контрольованої стимуляції яєчників у груп пацієнтів, які погано відповідають на загальноприйнятні протоколи («poor responders»).

Відпрацьовані етапи отримання секретомів з НФ-подібною дією від культури клітин зі спінальних гангліїв (культивування, кріоконсервування, фракціонування), що надає можливість використовувати секретоми у майбутньому для отримання біологічно активних препаратів на їх основі. Встановлено, що кріоконсервування культури клітин зі спінальних гангліїв як етап отримання секретому, не призводить до зниження його біологічного ефекту на жіночу репродуктивну систему.

Отримані у роботі дані можуть бути використані для читання курсів лекцій і проведення практичних занять для студентів вищих навчальних закладів медичного та біологічного профілю.

Особистий внесок здобувача. Автором самостійно проведено інформаційний та патентний пошук, проаналізовано літературу за темою дисертаційної роботи. За участю наукового керівника здобувачем визначено мету й завдання роботи. Автором особисто отримані експериментальні результати, проведено їх аналіз, статистична обробка й зроблені попередні висновки, написано всі розділи дисертації. Автором постійно проводилося обговорення та аналіз результатів спільно з науковим керівником.

В опублікованих у співавторстві роботах особистий внесок здобувача полягає:

- у роботах [34–45] у плануванні та виконанні дослідження, аналізі, обговоренні результатів та формулюванні висновків, підготовці матеріалів до друку;
- у роботах [34, 35, 40, 41] у експериментальному дослідженні впливу кріоекстракту зі спінальних гангліїв на морфофункціональні характеристики яєчників щурів різного віку, формулюванні висновків, підготовці матеріалів до друку;
- у роботах [36, 39, 42, 44] у експериментальному дослідженні впливу кріоекстракту зі спінальних гангліїв на структурно-функціональні характеристики матки щурів різного віку, аналізі отриманих результатів, формулюванні висновків, підготовці матеріалів до друку;
- у роботі [37] у експериментальному вивченні впливу секретомів культур клітин зі спінальних гангліїв на морфофункціональні характеристики яєчників щурів різного віку, аналізі результатів, формулюванні висновків, підготовці матеріалів до друку;
- у роботах [38, 43] у експериментальному вивченні впливу секретомів культур клітин зі спінальних гангліїв на скоротливу активність матки щурів різного віку, аналізі результатів, формулюванні висновків, підготовці матеріалів до друку;

– у роботі [45] у вивченні НФ-подібної активності секретомів від культур клітин зі спінальних гангліїв, аналізі результатів та формулюванні висновків, підготовці матеріалів до друку.

Апробація роботи. Апробація результатів дисертаційної роботи здійснювалася на наукових семінарах ІПКіК НАН України. Матеріали дисертаційної роботи були представлені та обговорені: на конференціях молодих вчених ІПКіК НАН України «Холод в біології і медицині: Актуальні питання кріобіології, трансплантології та біотехнології» (м. Харків, Україна, 2021, 2022); на IV Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю «Теорія та практика сучасної морфології» (м. Дніпро, Україна, 2020); на Науково-практичній конференції «Фундаментальні науки – практичній медицині: морфо-функціональні методи дослідження онтогенетичних перетворень, фізіологічних та метаболічних процесів, змодельованих патологічних станів, при захворюваннях внутрішніх органів (присвяченої 80-річчю з Дня народження професора Шутки Б.В.)» (м. Івано-Франківськ, 2020); на IX науково-практичній міжнародній конференції «Dynamics of the development of world science» (м. Ванкувер, Канада, 2020); на XI Міжнародній науково-практичної конференції «Actual trendsof modern scientific research» (м. Мюнхен, Німеччина, 2021); на VI Міжнародній науково-практичної конференції «European scientific congress»(м. Мадрид, Іспанія, 2023).

Публікації. За темою дисертації опубліковано 12 робіт, з них 5 статей у фахових виданнях України, 3 з яких входять у міжнародні наукометричні бази Scopus/WoS, та 7 публікацій у збірниках тез вітчизняних та міжнародних конференцій.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація викладена на 168 сторінках друкованого тексту й складається з таких розділів: анотація, вступ, огляд літератури, матеріали та методи, 5 розділів результатів власних досліджень, узагальнення та обговорення результатів, висновки, список використаних джерел, додатки. Список використаних джерел включає 226 найменувань,

розміщених на 31 сторінці. Робота проілюстрована 12 рисунками, 11 мікрофотографіями та 17 таблицями.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Рівні регуляції жіночої репродуктивної системи та роль нейротрофічних факторів у її розвитку та функціонуванні

1.1.1. Рівні нейро-гуморальної регуляції жіночої репродуктивної системи.

Жіноча репродуктивна система, як й інші системи організму, організована за ієрархічним принципом. Загальноприйнятно виділяти в ній п'ять рівнів, які комунікують та взаємодіють між собою за принципом зворотнього зв'язку [46]. Найнижчий рівень, або рівень ефекторів, це клітини-мішені у яєчниках, фалопієвих трубах, матці, піхві, молочній залозі, шкірі, кістках, які відповідають на гормональну стимуляцію та під її впливом змінюють свої морфофункціональні характеристики. Механізм передачі сигналу до цих органів реалізується за допомогою експресії на клітинах рецепторів до статевих гормонів (естрадіолу, прогестерону, тестостерону). Рецептори до них присутні на численних типах клітин репродуктивної системи, а також вони є у молочній залозі, ЦНС, шкірі, жировій та кістковій тканині [47]. При цьому, завдяки гіпофізарному пулу рецепторів до естрадіолу здійснюється зворотній зв'язок з органами-мішенями, що приводить до стимуляції або пригнічення виділення гонадотропних гормонів.

На наступному рівні жіночої репродуктивної системи постає яєчник, у якому постійно протікають процеси стероїдогенезу, фолікулогенезу та гаметогенезу [46, 48]. Фолікулогенез — це процес розвитку фолікулів яєчників, який починається з резерву спочиваючих примордіальних фолікулів, створених у ранньому віці, і закінчується або овуляцією, або загибеллю фолікула через атрезію. Оваріальний стероїдогенез — це процес продукції клітинами яєчників стероїдних гормонів (андрогенів, естрогенів та

прогестинів) для підтримки репродуктивних тканин, регуляції функції яєчників, овуляції та вагітності [46, 48].

Наступний рівень регуляції представлено аденогіпофізом, в якому відбувається синтез та секреція ЛГ, ФСГ та пролактину. Загальновідомо, що головними органами-мішенями для ЛГ та ФСГ є яєчник, тоді як для пролактину – молочні залози [46, 48]. В яєчнику у фолікулярну фазу ФСГ стимулює розвиток домінантного фолікула та дозрівання у ньому ооциту. Також він разом із ЛГ активує секрецію естрадіолу фолікулярними клітинами. У середині циклу разом із ЛГ максимальний викид ФСГ сприяє овуляції. ЛГ є основним гормоном овуляції, стимулює утворення андрогенів у клітинах теки та синтез прогестерону в лютеїнізованих клітинах гранульози фолікула.

Четвертий рівень регуляції – це гіпофізотропна зона гіпоталамуса. Вона складається зі скупчення нейронів (ядер), які мають нейросекреторну активність та синтезують гонадотропін релізінг-гормон (gonadotropin hormone-releasing hormone, GnRH), що стимулює секрецію ЛГ та ФСГ аденогіпофізом [46, 48]. Пульсуюча секреція GnRH визначає профіль секреції аденогіпофізом ЛГ та ФСГ, що у свою чергу реалізується у вигляді циклічних структурно-функціональних змін яєчників та матки.

П'ятим рівнем регуляції репродуктивної системи є екстрагіпоталамічні церебральні структури, що сприймають імпульси із зовнішнього середовища та від інтерорецепторів та передають їх у нейросекреторні ядра гіпоталамуса. В останні роки показано, що до регуляторних речовин, які здійснюють таку комунікацію відносяться дофамін, норадреналін, індоли, серотонін, морфіноподібні опіїдні нейропептиди [49]. Було показано, що ці нейромедіатори безпосередньо модулюють активність та/або секрецію GnRH у нейронах GnRH in vivo або ex vivo (зрізи мозку).

Нейротрофічні фактори як учасники багатьох шляхів сигналіngu теж вбудовані на вищевказаних рівнях регуляції жіночої репродуктивної системи. Сучасні уявлення про роль НФ у розвитку та функціонуванні жіночої репродуктивної системи описано у наступному підрозділі.

1.1.2. Роль нейротрофічних факторів у розвитку та функціонуванні жіночої репродуктивної системи.

Основу для досліджень НФ було закладено нобелівською лауреаткою Рітою Леві-Монтальчіні, яка вивчала ріст нервових волокон у курячих ембріонів у середині XX сторіччя. Пізніше було з'ясовано, що НФ відносяться до суперродини TGF- β , мають низку спільних характеристик, включаючи подібну молекулярну масу мономерів (13,2–15,9 кДа), ізоелектричні точки (в діапазоні 9–10) і приблизно 50% ідентичності первинної структури. Нейротрофіни є висококонсервативними молекулами серед людини, миші та щура з 90 % гомологією. Еволюційно консервативні фрагменти амінокислотної послідовності у однакових відносних інтервалах, знайдених у всіх членах родини TGF- β [50].

Спільною рисою для всіх НФ є те, що вони синтезуються як більш високомолекулярні попередники (препронейротрофіни) в ендоплазматичному ретикулумі. Препронейротрофіни мають N-кінцевий сигнальний пептид, який є необхідним для внутрішньоклітинного транспорту та подальшого процесингу молекули. Розщеплення сигнального пептиду приводить до генерації незрілих попередників (пронейротрофінів, у середньому 30–35 кДа), які зазнають подальші посттрансляційні модифікації (глікозилювання, амідування тощо) в апараті Гольджі перед тим, як потрапити в секреторні везикули. Повне дозрівання НФ досягається протеолітичним розщепленням пронейротрофінів з утворенням зрілих нейротрофінів (у середньому 12–13 кДа) конвертазами у внутрішньо- або позаклітинних сайтах [50].

НФ існують у розчині у вигляді нековалентно зв'язаних димерів. Шість залишків цистеїну, що зберігаються в однакових відносних положеннях, утворюють три внутрішньоланцюгові дисульфідні зв'язки [51].

У нервовій системі під час розвитку НФ діють на нейральні клітини, регулюють їх проліферацію, сприяють диференціації, а також регулюють

апоптоз певних клітинних популяцій [52]. У зрілій нервовій системі НФ підтримують, посилюють та регулюють функцію нейронів та можуть відігравати певну роль у розвитку неврологічних захворювань та виникненні пухлин нервової тканини.

Загальноприйнятне, що сімейство НФ включає фактор росту нервів (NGF), нейротрофічний фактор мозку (BDNF), нейротрофіни 3, 4/5, 6 (NT-3, NT-4/5, NT-6), гліальний нейротрофічний фактор (GDNF) [22–25]. У якості специфічних рецепторів НФ існує сімейство рецепторних тирозинкіназ Trk. TrkA є переважно рецептором для NGF, TrkB є рецептором для BDNF і NT-4/5, а TrkC є рецептором для NT-3 [52]. Також існує універсальний рецептор до НФ p75 NGFR, який пов'язується з багатьма НФ. Цікаво, що p75 NGFR експресується не тільки в клітинах нервової тканини, але і в інших органах, включаючи яєчник [53].

Найкраще вивченим на теперішній час є фактор росту нервів (NGF), з якого почалося відкриття НФ Р. Леві-Монтальчіні. Цей НФ було виявлено як поліпептид, який сприяє виживанню та росту симпатичних і сенсорних нейронів під час розвитку куріного ембріону. Цей НФ утворюється з проNGF з молекулярною масою 22 000 кДа шляхом протеолітичної модифікації. Молекулярна маса мономеру NGF складає 13,2 кДа, під час димеризації він набуває молекулярну масу 26,5 кДа [54]. Кожен мономер мишачого NGF містить 118 (за іншими даними 120) амінокислотних залишків і три пари внутрішньомолекулярних дисульфідних зв'язків [55]. Для NGF людини показано, що він має 2 мономери по 120 амінокислот кожна, які нековалентно димеризуються з утворенням молекули з масою 26 кДа [56].

Існує два рецептори для NGF, рецептор нейротрофіну p75 (p75NTR) і тропоміозин рецепторна кіназа А (TrkA) [56]. TrkA має вищу спорідненість до зрілого NGF, ніж до проNGF, і активує нейротрофічну передачу сигналів. P75NTR має вищу спорідненість до проNGF і може активувати як нейротрофічну, так і апоптотичну передачу сигналів.

Найважливіші біологічні ефекти NGF поширюються на симпатичну та сенсорну частини нервової системи. NGF приводить до стимуляції різноманітних катаболічних і анаболічних шляхів у симпатичних і сенсорних нейронах *in vivo* та *in vitro* [57]. NGF впливає на пластичність нейронів, що дозволяє дорослій нервовій системі змінювати свою структуру та функції у відповідь на подразники. Синтез NGF у дорослих тканинах корелює з такими фенотиповими характеристиками нейронів як щільність іннервації, розмір тіла клітини, розростання терміналів аксонів, ріст дендритів, індукція та/або інгібування нейропептидів та нейромедіаторів [57]. *In vivo* зниження регуляції NGF через введення антитіл до NGF або через ураження периферичних нервів спричиняє помітне зниження синтезу субстанції Р (SP) і синтезу пептиду, пов'язаного з геном кальцитоніну (CGRP). NGF сприяє розростанню нейритів, відновленню нервових клітин після ішемічних, хірургічних або хімічних ушкоджень. Системне введення NGF асоціюється з підвищенням активності нейрональних ефектів у ЦНС та ПНС [58, 59].

NGF має вирішальний вплив на репродуктивні органи жіночого організму. Показано, що цей НФ необхідний для раннього розвитку фолікулів в яєчниках ссавців [22, 23]. НФ бере участь у первинній збірці фолікулів яєчників та подальшому фолікулогенезі, сприяють овуляторному процесу та секреції стероїдних гормонів, стимулює проліферацію клітин теки та гранульози [21]. Однак інтраоваріальний надлишок NGF вважається однією з причин виникнення полікістозу яєчників [60, 61].

Наступним відкритим НФ був нейротрофічний фактор мозку BDNF. Він виявився найважливішим білком, що визначає проліферацію та виживання холінергічних, серотонінергічних та дофамінергічних нейронів, а також чутливих нейронів. BDNF стимулює у нейронах репаративні процеси, підвищує синаптичну пластичність та стійкість клітин ЦНС до негативних факторів, є ключовою молекулою, яка бере участь у пластичних змінах, пов'язаних із навчанням і пам'яттю. Низький рівень цього НФ та рецепторів до нього виявлено при у пацієнтів з хворобами Альцгеймера, Паркінсона та

Гантінгтона [62–64]. Він синтезується у мозку, високі рівні цієї молекули були виявлені в гіпокампі, мигдалеподібному тілі, мозочку та корі головного мозку. Молекула мономеру складається з 120 амінокислот з молекулярною масою близько 14 кДа (гомодимера 27 кДа) [65, 66]. Для реалізації біологічних ефектів BDNF зв'язується з рецептором TrkB, але також можлива його взаємодія із загальним для всіх нейротрофінів рецептором p75NTR [67]. Зв'язування BDNF з Trk-B призводить до посилення нейротрофічного впливу, тоді як за умов пов'язування з p75NTR може спостерігатися пригнічення росту та апоптоз клітин.

Було встановлено, що у репродуктивній системі BDNF відіграє значну роль. Виявилося, що BDNF сприяє розвитку фолікулів і дозріванню ооцитів в яєчниках ссавців [68]. Крім того, дослідження передімплантаційного ембріонального розвитку великої рогатої худоби і мишей виявили, що BDNF присутній у клітинах трофктодерми бластоцисти, а BDNF підтримує ранній ембріональний розвиток [69]. BDNF був ідентифікований у фолікулярній рідині людини, гранульозних клітинах і ооцитах преантральних фолікулів, а також у гранульозних клітинах і кумулюсних клітинах антральних фолікулів [68, 70].

В останні роки встановлено, що інгібування PTEN та активація PI3-кінази, які є основними позитивними та негативними регуляторами внутрішньоклітинного сигнального шляху PI3K/AKT, приводить до виходу примордіальних фолікулів яєчників у фазу подальшого росту [71]. Отже, біологічна дія НФ, зокрема NGF та BDNF, реалізується в тому числі й через активацію PI3K/Akt-шляху [72].

GDNF – нейротрофічний фактор, отриманий з лінії гліальних клітин. Його було уперше відкрито у кондиціонованих середовищах (КС), отриманих з первинних гліальних клітин та з кількох клітинних ліній з властивостями глії (клітинних ліній B49, R33, JS1) [29]. Згодом фактор було ізольовано з КС від клітинної лінії B49. З'ясувалося, що це пептид з молекулярною масою приблизно від 15 (у неглікозильованому стані) до 20 кДа, здатний до

димеризації (мол.маса димерів від 32 до 42 кДа) [73, 74]. Аналіз амінокислотної послідовності показав, що GDNF синтезується як попередник, який піддається подальшому процесингу та секретується як поліпептид з 134 амінокислот. Було показано, що GDNF має виражений нейротропний та нейропротекторний ефект, а також позитивно модулює астрогліоз [29]. Встановлено, що GDNF сприяє виживанню дофамінергічних нейронів у дисоційованих культурах середнього мозку ембріонів щурів [73, 74]. Поряд з GDNF нейрурин (NRTN), артемін (ARTN), персефін (PSPN) утворюють групу нейротрофічних факторів, також відомих як ліганди сімейства GDNF [75]. Показано, що всі ці НФ впливають на різні популяції нейронів ЦНС, включаючи дофамінові нейрони та мотонейрони середнього мозку; сприяють виживанню та регулюють диференціацію симпатичних, парасимпатичних, сенсорних та ентеральних нейронів ПНС [76]. У фізіологічних умовах ARTN сприяє виживанню сенсорних нейронів та бере участь у тропізмі нервової тканини та гомеостазі периферичних нервів. При патологічному пошкодженні нерва ARTN приймає участь у морфологічних змінах нервів [75]. Модуляція рівня експресії цих НФ в тканинах експериментальних тварин змінює кількість сенсорних нейронів у складі СГ [77].

GDNF бере участь у розвитку фолікулів і дозріванні ооцитів. Зокрема він сприяє розвитку примордіальних фолікулів яєчника та взаємодії між клітинами під час фолікулогенезу [24, 68]. Цей НФ був виявлений у фолікулярній рідині яєчників свиней [78]. Було підтверджено наявність GDNF у фолікулярній рідині як малих фолікулів (діаметр 1–3 мм), так й середніх (діаметр 4–6 мм). Транскрипти мРНК GDNF були виявлені в кумулюсних клітинах і ооцитах в антральних фолікулах свиней [68]. Результати експериментів дозрівання ооцитів *in vitro* свідчать про те, що доповнення до середовища оптимальних концентрацій GDNF (50 нг/мл) та EGF (50 нг/мл) покращує ядерне та цитоплазматичне дозрівання ооцитів свині [79].

Нейротрофін 3 (NT-3) є поліпептидом, який складається з 119 амінокислот та має молекулярну масу 13,6 кДа (27,2 кДа у стані димеризації) [65]. Було ідентифіковано щонайменше два рецептори NT-3: TrkC, при зв'язуванні з яким підтримується виживання нейронів периферичної нервової системи та сенсорних нейронів; p75NTR, член суперродини рецепторів фактора некрозу пухлини (TNFR), який зв'язує всі нейротрофіни з наномолярною спорідненістю та відіграє роль у апоптозі нейронів [52]. Також було показано, що NT-3 проявляє основні біологічні ефекти через зв'язування з TrkC, але може зв'язуватися з TrkA та B [80]. У нервовій системі NT-3 модулює виживаність нейронів усіх типів і диференціювання нервових стовбурових клітин [52, 81]. Він широко поширений у периферичних тканинах (особливо в судинах), і це свідчить про додаткову роль цього НФ. Встановлено, що NT3 присутній в ізольованих адипоцитах щурів, а також у ретроперитонеальній, міжлопатковій, периваскулярній та навколо ниркової жирової тканині. Він секретується кровоносними судинами та регулює диференціацію адипоцитів [81]. Також встановлено досить високий рівень секреції цього фактору фібробластами, ендотеліоцитами, шваннівськими клітинами [80].

Щодо жіночої репродуктивної системи, то існують дані, що NT3 у яєчниках сприяє переходу примордіальних фолікулів у первинні [25]. NT-3 був виявлений у фолікулярних клітинах і ооцитах примордіальних і первинних фолікулів в неонатальних яєчниках щурів, тоді як у зрілих яєчниках він експресувався у клітинах великих фолікулів (тека-клітинах преантральних і антральних фолікулів, а також в ооцитах) [25]. NT-3 та рецептор TrkC були ідентифіковані в ооцитах і гранульозних клітинах преантральних яєчників людини [82]. Також існують дані про те, що в антральних фолікулах NT-3 може брати участь у стероїдогенезі [68].

Нейротрофін 4 (NT-4, який також називають нейротрофіном 4/5) є поліпептидом, у складі якого 123 амінокислоти з молекулярною масою 14 кДа [83]. Було показано, що NT-4 вибірково сприяє виживанню

культивованих нейронів смугастого тіла та дофамінергічних нейронів середнього мозку, а також викликає зростання нейритів з чутливих, але не з симпатичних гангліїв. NT-4 діє на клітини через рецептор TrkB, але також активує через TrkA, наприклад, індукує зростання нейритів із клітин PC12. NT-4 широко експресується під час ембріонального розвитку та у неонатальному віці у нервовій тканині, скелетних м'язах, яєчках, шкірі [83]. Як було встановлено раніше, NT-4 має нейропротекторну дію після церебральної ішемії [84].

Як й BDNF, NT-4 є важливим фактором збірки фолікулів під час розвитку яєчників ссавців [85]. Обидва ці НФ зв'язуються з тим самим специфічним рецептором TrkB. Показано, що мРНК NT-4 присутні в ооцитах та фолікулярних клітинах преантральних фолікулів [86]. Недавнє дослідження показало, що 100 нг/мл NT-4 сприяє росту *in vitro* преантральних фолікулів у мишей [87]. Крім того, експресія рецепторів до цього НФ на клітинах антральних фолікулів передбачає, що NT-4 може впливати на їх ріст або атрезію [68].

Нейротрофін-6 (NT-6) було описано лише у кісткових риб [88]. Він відрізняється від інших НФ тим, що він не міститься як розчинний білок у середовищі продукування клітин. Додавання гепарину впливає на вивільнення NT-6 з клітинної поверхні та позаклітинного матриксу. Цей НФ експресується у передньому мозку (спинний і вентральний головний мозок і в кількох дієнцефальних ядрах), у середньому мозку і в задньому мозку (мозочек, ретикулярна формація та октаволатеральної ділянки довгастого мозку) [89]. NT-6 сприяє виживанню симпатичних і сенсорних нейронів [88].

В цілому, NGF, BDNF, NT-3 і GDNF сприяють ангиогенезу [80].

Відомо, що симпатична іннервація регулює дозрівання і зростання фолікулів, секрецію статевих стероїдів і овуляцію [90]. Більшість нейронів симпатичної нервової системи, що мають рецептивні поля в матці, експресують рецептори до нейротрофічних факторів TrkA та p75 [91, 92].

Характерно, що вміст мРНК, що кодує рецептор p75, в матці на 52% вище, ніж у мозку [93].

Таким чином, різноманітні НФ впливають на розвиток та функцію жіночих репродуктивних органів. Однак досі залишається багато невирішених питань щодо фізіологічної ролі нейротрофічних факторів у процесах первинної активації фолікулів, овуляції та лютеїнізації. Надлишок або дефіцит НФ в яєчниках ссавців є фактором розвитку репродуктивних розладів, що є актуальним напрямком для подальших досліджень.

З віком спостерігається трансформація рецептор-опосередкованих шляхів сигналіngu [94], що може реалізуватися у порушенні природних механізмів регуляції проліферації/апоптозу клітин та виникненні патологій. Отже, вплив НФ на репродуктивну систему може мати вікові особливості.

1.3. Кондиційовані середовища від культур клітин як унікальне джерело біологічно активних речовин

В організмі ссавців взаємодія між клітинами як на короткій, так і на великій відстані опосередковується розчинними факторами, що виділяються клітинами у позаклітинне середовище. Ці фактори можуть включати білки позаклітинного матриксу, протеїнази, фактори росту, білкові гормони, імунорегуляторні цитокіни, хемокіни або інші біоактивні молекули, які мають прямий вплив на ріст і диференціацію клітин, їх експансію та інвазію, ангіо- та нейрогенез, регулюючи взаємодію між клітиною та позаклітинним матриксом [95]. З накопиченням досвіду експериментального та клінічного застосування стовбурових клітин з'ясувалося, що більш ніж 80% ефективності клітинної терапії стовбуровими клітинами обумовлено саме паракринною та аутокринною регуляцією речовинами, які виділяються трансплантованими клітинами. [12, 96]. Це стимулювало розвиток нового біотехнологічного напрямку «cell-free» або безклітинної терапії, яка використовує біомолекули, які секретуються клітинами у вигляді кондиційованого середовища (секретому) [97, 98].

Кондиціоноване середовище (КС) - це живильне середовище, що містить різні фізіологічно активні продукти життєдіяльності попередньо культивованих в ній клітин: безпосередньо секретом і мікровезикулярні елементи [13]. Розчинні компоненти можуть бути відокремлені від фракції мікровезикул шляхом центрифугування, фільтрації, методів осадження полімерів, іонообмінної хроматографії та інш. [99]. Вважається, що розчинні фактори та екзосоми здатні самотійно, або у складі КС, запускати регенераторно-відновлювальні процеси на рівні організму [97].

Існує ряд переваг застосування безклітинної терапії у вигляді КС:

- вирішується питання безпеки, потенційно пов'язане з трансплантацією живих і проліферативно-активних клітинних популяцій, включаючи імунну сумісність, можливість малигнізації, утворення емболів та передача інфекцій;
- КС може бути стандартизоване, проаналізоване на безпеку, дозоване аналогічно звичайним фармацевтичним засобам;
- зберігання КС може здійснюватися протягом тривалого періоду без втрати ефективності продукту [100];
- використання КС є більш економічним та практичним для клінічного застосування, оскільки дозволяє уникнути постійних більш чи менш інвазивних процедур забору клітин та їх процесингу [101];
- можливе масове виробництво КС за допомогою клітинних ліній у контрольованих умовах, що забезпечує виконання норм належної виробничої практики;
- терапія на основі КС має переваги для лікування гострих станів, таких як церебральна ішемія, інфаркт міокарда або військова травма, бо час на реалізацію терапевтичного ефекту у цьому разі коротше, ніж при використанні стовбурових клітин;
- комплексний біологічний продукт, отриманий від культури клітин у вигляді КС, можна модифікувати до бажаного складу та виду шляхом подальшої обробки (фільтрації, ліофілізації, сепарації тощо) [13].

На сьогоднішній день найкраще досліджені КС, секрети та везікулярні фракції, що виділяються мезенхімальними стовбуровими клітинами (МСК), стовбуровими клітинами, отриманими з жирової тканини, астроцитами та нервовими стовбуровими клітинами, ембріональними стовбуровими клітинами. Також проводяться дослідження протеомного складу секретів, що продукуються фібробластами, кардіоміоцитами, ендотеліальними клітинами та клітинами скелетних м'язів [95].

Було встановлено, що серед більш чим 200 білків, які були виявлені у КС від МСК, превалюють хемокіни, цитокіни та фактори росту. Це пояснює здатність МСК не тільки підтримувати кровотворення, але й забезпечувати аутокринну/паракринну регуляцію ангіогенезу, остеогенезу, хондрогенезу та імунітету [95].

Крім речовин, що входять до складу живильного середовища, КС містять спектр ростових факторів, протизапальні цитокіни, як TGF-1, інтерлейкіни IL-6, IL-10, IL-27, IL-17E, IL-13, прозапальні цитокіни IL-8/CXCL-8 та ряд інших факторів [12, 102, 103].

Склад протеїнів, що виявляється у КС, відрізняється завдяки фенотипової та функціональної різноманітності клітин, що культивуються. Так, здатність МСК до багатолінійної диференціації обумовлює секрецію широкого спектру біоактивних факторів, що мають імуномодуючі та регенеративні властивості [104]. Тип та різноманітність культури МСК, що продукують КС, значно впливає на склад та потенційні модулюючі властивості КС. Так, здатність стимулювати ангіогенез була значно вище у КС від МСК з кісткового мозку, ніж секретому від МСК, отриманих з жирової тканини. Аналіз білкового складу показав, що КС з низьким ангіогенним потенціалом містить незначну кількість білків, що регулюють ангіогенез (AKT1, FGF2), в порівнянні з секретомом від МСК з кісткового мозку [105].

Вихідні умови культивування *in vitro* або особливості мікрооточення клітин-продуцентів *in vivo* також мають значний вплив на склад та

активність КС [106]. Застосування різних умов культивування (моношарова або сфероїдна культура, тривалість культивування, склад поживного середовища та інші) дозволяє варіювати якісний та кількісний склад КС [12]. Так у роботі Wangler S. та співав. [104] МСК стимулювали кондиційованим середовищем, отриманим при культивуванні фрагментів міжхребцевих дисків з різним рівнем патології. В результаті отриманий від МСК секретом мав різний якісний склад та проявляв різнонаправлену активність: імуномодуючу або анаболічну. Цікавим підходом для отримання КС з концентрацією певних факторів, стало культивування МСК в умовах гіпоксії, голодування або культивування генетично модифікованих МСК [107 – 109].

Клінічно доведений терапевтичний ефект стовбурових клітин на репарацію тканин та загоєння ран був відтворений при введенні лише КС від стовбурових клітин [110, 111]. КС стовбурових клітин, виділених з жирової тканини, стимулює як синтез колагену, так і міграцію дермальних фібробластів, що покращує стан шкіри, зменшує кількість і глибину зморшок та прискорює загоєння ран на моделях тварин [112]. Введення КС від гемопоетичних стовбурових клітин сприяє відновленню кардіоміоцитів після міокардальної ішемії та після інфаркту міокарду, аналогічно запровадженню стовбурових клітин [113, 114]. Везикулярна фракція КС від стовбурових клітин з пуповинної крові людини ефективно відновлює репарацію серцевого м'яза [115].

Екзосоми, отримані при культивуванні негемопоетичних стовбурових клітин, після внутрішньовенного введення тваринам з експериментальним діабетом 1 типу, сприяли репарації β -клітин, відновленню секреції інсуліну і тривалому збереженню нормогликемії [116]. Існують дані, щодо ефективності фракції КС, отриманої від стовбурових клітин різного походження, в профілактиці ускладнень цукрового діабету, завдяки впливу на остеогенну диференціацію, стимуляції ангиогенезу [117].

Новий перспективний напрямок використання КС з'явився після виявлення здатності КС, отриманого від стовбурових клітин шийки матки

людини, пригнічувати ріст та проліферацію клітин малігнізованої тканини [118, 119].

У дослідженнях ефектів МСК, отриманих з ендометрію, шийки матки, а також деяких інших репродуктивних тканин (амніотична рідина, ворсинки хоріона плаценти та пуповина), виявлено потужну протипухлинну дію на ракові клітини молочної залози, яєчників, печінки, гліоми або остеосаркоми. Екзосоми, що продукуються МСК, показали антипроліферативний ефект і навіть викликали стан латентності в деяких пухлинах, таких як пухлини молочної залози або яєчників [120], пригнічували рак передміхурової залози [121] або клітин гліобластоми [122].

Відомо, що у дорослих нейрорегенерація підтримується в організмі на невисокому рівні через погану власну здатність нейронів до росту і наявність інгібіторних факторів. Експериментальна трансплантація нервових стовбурових клітин, включаючи використання шванновських клітин, ембріональних стовбурових клітин тощо, показала багатообіцяючі результати. Так, була виявлена здатність МСК у відповідних експериментальних умовах трансдиференціюватися в лінії нервових клітини та пригнічувати імунореактивність для зменшення запалення [12, 123]. Але були показані і певні ускладнення, що пов'язані з дедиференціацією трансплантованих клітин, ініціацією імунної реакції проти трансплантату і труднощами приживлення трансплантату в умовах запалення [124]. З часом було встановлено, що нейротропні фактори та фактори росту відповідають за нейрогенну диференціацію у культурах стовбурових клітин [125, 126]. Це навело на думку про індукцію трансдиференціації за умов додавання в поживне середовище КС. Було показано, що в залежності від складу КС МСК мають потенціал до диференціювання у нейрональному або гліальному напрямках [127]. В роботі Li H. Та спів. [128] був проаналізований склад КС від МСК з ендометрію матки, що сприяв відновленню життєздатності нейронів *in vitro*. Ефект був обумовлений секрецією 12 типів нейротропних

факторів, серед яких найбільшою була концентрація фактору росту гепатоцитів (Hepatocyte growth factor, HGF).

Оскільки КС складається з водорозчинних речовин, що виділяються клітинами при культивуванні, екзосомальної (мікровезікулярної) фракції та складових поживного середовища, ряд досліджень був спрямований на з'ясування найбільш ефективної складової частини КС [15, 129]. В роботі [124] порівнювали здатність МСК або КС/екзосом, отриманих за умов їх культивування, пригнічувати запалення та сприяти регенерації клітин змішаної нейронально-гліальної культури *in vitro* та *in vivo*. Було встановлено, що розчинна та екзосомальна фракція, мали значний терапевтичний ефект, сприяючи розростанню нервових клітин *in vitro* та відновленню пошкодженого спинного мозку *vivo*. Екзосомальна фракція КС від МСК також показала позитивний ефект при використанні в різних моделях нейродегенеративних хвороб [130, 131].

Відомо, що *in vivo* активність нейронів і гліальних клітин піддається взаємній регуляції. З одного боку, нейрональна регуляція життєздатності клітин глії *in vitro* може бути відтворена додаванням КС від диференційованих або недиференційованих нейронів мозочка [132]. З іншого боку, введення КС, зібраного при культивуванні гліальних клітин ЦНС олігодендроцитів, покращує моторні функції нейронів, зменшує активність запальних процесів та розвиток демієлінізації при експериментальному аутоімунному енцефаломієліті [133]. Припускають, що ефект КС, отриманого при культивуванні клітин глії з ЦНС, обумовлений значним вмістом НФ, таких як BDNF, циліарний нейротрофічний фактор (CNTF), GDNF і NT-3, що регулюють розвиток і проліферацію клітин глії і, як наслідок, стимулюють мієлінізацію нервових волокон [134].

КС, отримане від гліальних клітин з периферичної нервової системи, також здатне направляти диференціацію МСК у нейрогенному напрямку [135], підвищувати життєздатність гангліонарних клітин [136], сприяти

активності нейронів і частково рятувати нейрони від загибелі при культивуванні без додавання нейротропних факторів *in vitro* [137].

Одним з продуцентів КС, який активно досліджується в останні роки, є культура клітин спінальних гангліїв. СГ містять тіла чутливих нейронів (ЧН), які здійснюють термо-, механо- та ноцицепцію. Кожне тіло (сома) ЧН оточена шаром сателітних гліальних клітин (СГК). Зовні СГ оточені сполучнотканинною капсулою, сформованою фібробластами; між нервовими волокнами теж знаходяться прошарки сполучнотканинного пері- та ендоневрія з невеликими кровоносними судами та капілярами (ендотеліальні та гладком'язові клітини). Шваннівські клітини, які створюють мієлінізацію аксонів, теж присутні у клітинному складі СГ. Клітини імунної системи (макрофаги, нейтрофіли) теж є представниками клітин, які можуть містити СГ [138]. Також СГ є джерелом нейральних стовбурових клітин, які здатні диференціюватися не тільки у нейрони, але й у різні клітинні типи нейроглії [139–141]. Нейрони та сателітні гліальні клітини утворюють тісний функціональний взаємозв'язок. Біологічно активні молекули, що продукуються нейронними клітинами та сателітні гліальні клітини, з одного боку, служать маркерами відповідних клітин, а з іншого боку, створюють специфічне мікрооточення нейронів. В результаті при культивуванні клітин спінальних гангліїв середовище містить ряд речовин: нейропептиди (CGRP, SP, галанін), нейротрофіни (NGF, BDNF, NT-3 і NT-4/5, GDNF), ендотелін тощо. Здатність гліальних клітин до продукції НФ описана у ряді робіт [29, 30, 137, 142].

Подальше позширення використання КС від спінальних гангліїв потребує розробки протоколів довгострокового зберігання безпосередньо культур клітин спінальних гангліїв або КС. В роботах [143, 144] були представлені протоколи кріоконсервування 2D- та 3D-культур, надана фенотипична та функціональна характеристика кріоконсервованих клітин. Усе це дозволяє розширити можливості експериментального та клінічного використання КС від клітин нейрального походження.

Досвід клінічних випробувань КС включає ряд пілотних досліджень, серед яких ефективне застосування КС від МСК, отриманих з жирової тканини, для регенерації волосяних фолікулів людини [145], відновлення шкіри при загоїнні ран [146].

У 2018-2020 роках стартувало декілька рандомізованих клінічних досліджень, спрямованих на порівняння ефективності введення стовбурових клітин та відповідного кондиціонованого середовища: алогенні мезенхімальні стовбурові клітини пуповини і кондиціоноване середовище для лікування ДЦП у дітей [«Allogeneic Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells and Conditioned Medium for Cerebral Palsy in Children ClinicalTrials.gov identifier: NCT04314687], «Терапевтичний потенціал середовища з кондиціонованими стовбуровими клітинами при хронічних виразкових ранах» [«Therapeutic Potential of Stem Cell Conditioned Medium on Chronic Ulcer Wounds» ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04134676], «Порівняльна ефективність артроскопії та неартроскопії з використанням мезенхімальної терапії стовбуровими клітинами (МСК) та кондиціонованого середовища для остеоартриту» [Comparative Effectiveness of Arthroscopy and Non-Arthroscopy Using Mesenchymal Stem Cell Therapy (MSCs) and Conditioned Medium for Osteoarthritis (OA) ClinicalTrials.gov Identifier: NCT04314661], «Ефективність і безпека росту волосся NGF-574Н у дорослих з андрогенною алопецією» [Hair Growth Efficacy and Safety of NGF-574H in Adult With Androgenic Alopecia ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03676400].

З метою стандартизації КС проводяться порівняльні дослідження складу та ефективності КС та його складових. Таким чином, питання, чи можуть бути КС кріоконсервовані без значної втрати їх біологічної активності, є актуальним для подальшого їх застосування у регенеративно-відновлювальній медицині.

1.3.Морфологічні та функціональні особливості яєчників та матки щурів під час репродуктивного старіння

Для коректної оцінки результатів, отриманих на тваринах, є вкрай необхідним бути обізнаним у специфічних анатомічних та фізіологічних особливостях використаних у експериментах видів. Репродуктивні цикли відрізняються між видами ссавців. Лабораторні дрібні тварини (щери, миші) еволюційно мають коротку тривалість життя та обмежений час для вирощування потомства. Внаслідок цього, вони досягають статевого дозрівання приблизно у віці 5 тижнів та мають короткий репродуктивний (естральний) цикл без лютеїнової фази, якщо не настає вагітність [147]. Овуляція відбувається у репродуктивно активних лабораторних щурів кожні 4-5 днів [148]. Естральний цикл (ЕЦ) щурів включає проеструс (стан, який передуює тічці); еструс (описується як період статевого потягу, тічка); метеструс (при відсутності зачаття, при тічці зміни в репродуктивних шляхах стихають); діеструс (репродуктивний тракт готується до прийому яйцеклітини). Також виділяють поняття анеструс – період відсутності розмноження, коли репродуктивні органи знаходяться в стані спокою. Кожний період супроводжується характерними морфологічними змінами репродуктивних органів.

Оскільки число овуляцій у щурів відносно велике (загалом приблизно від 12 до 14), в яєчниках можна спостерігати велику кількість фолікулів і жовтих тіл [147, 148].

Існує кілька гістологічних класифікацій фолікулів ссавців залежно від їхнього розміру, форми, стадії дозрівання, наявності фолікулярної порожнини. Відповідно до класифікації Pedersen T. та Peters H. [149] виділяють 8 типів фолікулів залежно від кількості фолікулярних клітин та розміру фолікулів. Emoni C. та Sugiura K. [150] виділяють 5 типів фолікулів. Серед них: примордіальний (ооцит та 1 шар плоских фолікулярних клітин), первинний (ооцит та 1 шар кубічних фолікулярних клітин), вторинний (ооцит та кілька шарів кубічних фолікулярних клітин), третинний (поява невеликих

порожнин, заповнених фолікулярною рідиною) Граафов пухирець (зрілий фолікул). За класифікацією М. Ross [48] теж виділяють 5 типів, але дещо інших. Серед них: примордіальні фолікули; ранні первинні фолікули (з одним шаром фолікулярних клітин); пізні первинні фолікули (більше одного шару фолікулярних клітин); вторинні, антральні (наявність у фолікулі порожнин), Граафов пухирець (зрілий фолікул). За класифікацією Zeleznik A. [151] виділяють 4 види фолікулів: примордіальні, малі преантральні, великі преантральні та преовуляторні. Відповідно, преантральні в даній класифікації включають всі фолікули без порожнини, тоді яаяк преовуляторні – усі фолікули з порожнинами.

Таким чином, відсутність одноманітної класифікації ускладнює інтерпретацію одержаних різними авторами результатів. Однак загальноприйнято, що пул примордіальних фолікулів формується в ембріогенезі і на момент народження становить за різними оцінками від 400 000 до 2 млн в одному яєчнику. Примордіальний фолікул складається з ооциту I порядку, оточеного одним шаром плоских фолікулярних клітин. Активація примордіальних фолікулів та вступ їх у період подальшого росту відбувається спорадично та незалежно від гормональних впливів. Гормонально-залежні стадії зростання фолікулів настають лише після формування судинної підтримки (стадія антрального фолікула). Таким чином, можна виділити дві регулятоно-відмінні фази розвитку фолікулів: гонадотропін-незалежну (преантральну) та гонадотропін-залежну (антральну) [152].

Морфологічні зміни, які відбуваються у репродуктивних органах самиць щурів впродовж ЕЦ описані далі. У проєструсі фолікули яєчників швидко розвиваються до овуляції в кінці фази. При цьому у яєчнику можна спостерігати від двох до чотирьох великих антральних Граафових фолікулів. Слизова ендометрія матки у цій фазі утворена високим кубоподібним або стовпчастим епітелієм. Часто зустрічаються мітози епітеліальних клітин залоз і вистілаючого шару. Судинна оболонка ендометрію стає більш

помітною, строма може виявляти деякий набряк, причому просвіт матки, як правило, помітно розширюється [147, 148].

У еструсі під час овуляції фолікули перетворюються на жовті тіла з більш базофільно забарвленими лютеїновими клітинами. При цьому Граафові фолікули починають лютеальну трансформацію шляхом розриву та згортання шару гранульозних клітин та виключення фолікулярної рідини. Клітини теки інвазують у раннє жовте тіло, при цьому судини та інтерстиціальні клітини змішуються разом із гранульозними клітинами. У матці початок еструсу визначається появою помітної дегенерації та некрозу епітеліальних клітин, зазвичай спочатку у залозах ендометрію. Спостерігається помірна лейкоцитарна інфільтрація строми та майже відсутня мітотична активність клітин слизової оболонки [148].

У метеструсі жовті тіла починають регресію і продовжують свою регресію в діеструсі. Слід зазначити, що три або більше поколінь жовтих тіл можуть бути присутні в окремому яєчнику з попередніх овуляторних циклів, оскільки кожне жовте тіло морфологічно зберігається протягом 12 – 14 днів [147, 148]. ЖТЯ все ще можуть містити заповнену рідиною центральну порожнину. Епітелій ендометрію матки у метеструсі демонструє вакуольну дегенерацію, але також помітне повернення мітотичної активності, тому фаза характеризується обома цими ознаками. Лейкоцитарна інфільтрація строми може бути присутня [148].

У діеструсі новоутворені жовті тіла від попередньої овуляції досягають свого максимального розміру, хоча залишки жовтих тіл також присутні. Вакуолі у клітинах нових ЖТЯ зазвичай присутні, особливо у центрі, що свідчить про активний стероїдогенез. Також спостерігається утворення фіброзної тканини у центральній частині постовуляторних фолікулів, які раніше були заповнені фолікулярною рідиною. На початку діеструсу матка у щурів маленька, зі щілиноподібним просвітом рогів. Просвіт вистелений низьким кубоподібним або стовпчастим епітелієм, де іноді видно клітини на стадії дегенерації або клітини у фазі мітозу [148].

Характерні зміни рівнів статевих гормонів відбуваються під час ЕЦ у щурів. У проєструсі спостерігаються передовуляторний сплеск рівнів естрогену, ЛГ та пролактину, після чого настає коротка лютеїнова фаза тічки [147, 153]. Рівень ФСГ починає зростати у проєструсі, але пізніше відносно часу піку ЛГ. У фазі еструсу ФСГ сягає пікових значень. Рівень прогестерону тимчасово підвищується під час трансформації новоутворених жовтих тіл, але швидко знижується, коли жовті тіла починають регресувати [147].

Під час репродуктивного старіння щури проходять певні стадії. Більшість спостережень свідчить, що щури прогресують від звичайного статевого циклу (4 або 5 діб) до іррегулярних циклів, за якими слідує постійна тічка, потім стійкий діетрус (анеструс) [148, 154]. І, хоча деякі паттерни репродуктивного старіння можуть бути відсутні [155], стан анеструсу неодмінно настає.

Стійка тічка гістопатологічно характеризується збільшенням кількості антральних фолікулів, відсутністю базофільних жовтих тіл і взагалі зменшенням кількості жовтих тіл. Ендометрій матки складається з високого стовпчастого епітелію з частою вакуолярною дегенерацією та одноклітинним некрозом просвітнього та залозистого епітелію, рідкісними мітозами. Вагінальна слизова оболонка вистелена ороговілим плоским епітелієм [148].

Наприкінці репродуктивного віку в яєчниках щурів все ще відбувається деякий розвиток фолікулів, який закінчується атрезією без овуляції, що призводить до повного виснаження фолікулів [148]. Морфологічні особливості матки характеризуються низьким неактивним епітелієм ендометрію. Втрата фолікулів призводить до падіння рівню естрадіолу. Низький рівень прогестерону відображає відсутність жовтих тіл.

Таким чином, у самиць щурів з віком відбувається зміна нормальної морфології органів репродукції, що важливо враховувати під час експериментальних доклінічних досліджень.

РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Загальні положення

Дисертація виконана у відділі кріоендокринології Інституту проблем кріобіології і кріомедицини (ІПКіК) НАН України в рамках науково-дослідних тем «Властивості кріоконсервованих первинних культур клітин ендокринних залоз неонатальних тварин *in vitro* та *in vivo* при трансплантації» (№ 0116U003494, НАН України, 2016-2020 рр.) та «Морфофункціональні характеристики, кріоконсервування та терапевтичний потенціал 2D- і 3D-культур клітин, отриманих з похідних нервового гребня» (№ 0121U100, НАН України, 2021-2026 рр.).

Усі експерименти на тваринах проводили відповідно до Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№ 3447-IV від 21.02.2006 р. зі змінами) при дотриманні вимог «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986). Усі експериментальні процедури з використанням тварин при плануванні дисертаційної роботи було розглянуто та узгоджено Комітетом з біоетики ІПКіК НАН України.

2.2. Експериментальні тварини

В експериментах використовували білих безпородних щурів-самиць 6 і 14 місяців, що відповідає репродуктивному віку (РВ) та пізньому репродуктивному віку (ПРВ) у цього виду тварин [156]. Тварин утримували в приміщенні при температурі повітря $18 \pm 2^{\circ}\text{C}$ в клітках розміром $40 \times 60 \times 20$ см по 6 особин у кожній. У приміщенні дотримувалися природного режиму освітлення.

2.3. Приготування загального кріоекстракту спінальних гангліїв

Загальний кріоекстракт спінальних гангліїв (КЕСГ) готували за методом Глоби В.Ю. та співав. [157]. Кріоекстракт отримували зі спінальних гангліїв неонатальних поросят першого покоління гібридів порід крупна біла/ландрас

і макстер/дюрок. Ганглії виділяли, відмивали у фізіологічному розчині (ФР) і поміщали в 1 мл стерильного ФР у кріопробірки («Biorplastics», Швейцарія) об'ємом 2 мл. Кріопробірки занурювали у рідкий азот (-196°C) на 10 хвилин, після чого відігрівали при кімнатній температурі (20°C). Процедуру повторювали ще двічі, після чого ганглії подрібнювали у скляному гомогенізаторі. Гомогенат переносили у пробірки і центрифугували 10 хв при 300 g. Надосад збирали, фільтрували через одноразовий шприцевий фільтр (діаметр пор 0,45 мкм, «Millipore», США), аліквотували по 1 мл, зберігали при -18°C . Перед використанням КЕСГ розводили ФР до концентрації білка 0,3 мг/мл. Загальний білок вимірювали за методом Бредфорд.

2.4. Приготування фракції кріоекстракту спінальних гангліїв

КЕСГ готували, як описано у п. 2.3. Перед фракціонуванням аліквоти КЕСГ об'єднували та розводили ФР до концентрації білка 0,3 мг/мл. Фракцію кріоекстракту спінальних гангліїв (фКЕСГ) з молекулярною масою до 30 кДа отримували методом ультрафільтрації з використанням полієфірсульфенової мембрани («Millipore», Німеччина). Після отримання проводили контрольне вимірювання білку за методом Бредфорд (у зразках фКЕСГ специфічна реакція на білок з реактивом Coomassie Brilliant Blue G-250 була відсутня).

2.5. Отримання культури клітин зі спінальних гангліїв

Первинну культуру клітин отримували зі спінальних гангліїв (СГ) неонатальних поросят за методом Алі С.Г. та співав. [144]. СГ піддавали ферментативній дезагрегації в середовищі α -МЕМ, що містило 1,25 мг/мл колагенази типу ІА («ПанЕко») з подальшою обробкою 0,25% розчином трипсину-ЕДТА з солями Хенкса («ПанЕко») [158]. Клітини висівали у концентрації 5×10^5 клітин/мл у пластикові чашки Петрі («SPL Life Sciences», Корея) та культивували при 37°C в атмосфері 5% CO_2 з використанням базового середовища (БС). Базове середовище готували на α -МЕМ («Biowest», Франція) з додаванням антибіотиків та 10% фетальної телячої

сироватки (ФТС, «BioSera», Франція). Як було встановлено [144], така культура на 80% складається з сателітних гліальних клітин.

Зовнішній вигляд культури клітин зі спінальних гангліїв представлено на рисунку 2.1.

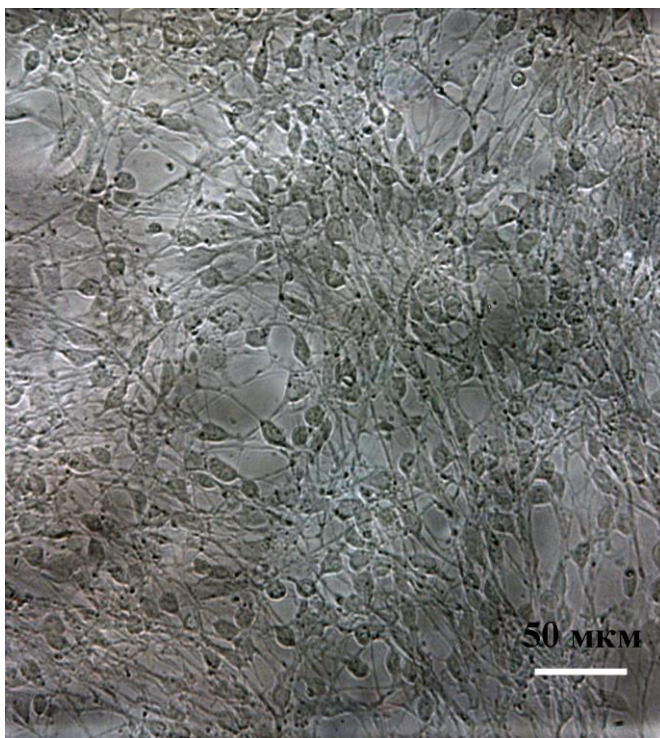


Рис. 2.1. Первинна культура клітин зі спінальних гангліїв, 6 доба культивування. Прижиттєва мікроскопія. Помітно, що практично усі клітини культури мають веретеноподібну форму, що є характерним для сателітних гліальних клітин.

2.6. Кріоконсервування культури клітин зі спінальних гангліїв

Кріоконсервування здійснювали з використанням кріозахисного розчину на основі α -MEM з додаванням 25% ФТС та 7,5% ДМСО («AppliChem», Німеччина). У кожену кріопробірку («SPL LifeSciences», Корея) поміщали 1 мл клітинної суспензії з концентрацією 5×10^5 клітин/мл та заморожували як описано у роботі Алі С.Г. та співав. [144]. Заморожені зразки зберігали у рідкому азоті. Відігрівання здійснювали на водяній бані при температурі 37°C до зникнення твердої фази. Для видалення кріопротектору до суспензії клітин

по краплях додавали 10-кратний об'єм БС та двічі відмивали шляхом центрифугування, після чого клітини поміщали у БС та культивували, як описано вище.

2.7. Отримання кондиціонованих середовищ

Кондиціоновані середовища від інтактної (КС) та кріоконсервованої культур (ККС) починали збирати через 7-9 діб культивування, коли клітинний ріст переходив до стаціонарної фази. Середовища збирали кожні три доби, порційно заморожували та зберігали при -18°C . Загальний термін культивування, протягом якого збирали середовища, складав 28 діб. Зібрані порції розморожували, об'єднували та фракціонували методом ультрафільтрації з використанням поліетилсульфонової мембрани (Millipore, Німеччина). З огляду на те, що молекулярна маса мономерів представників родини НФ знаходиться у межах від 13 до 15 кДа [52], було задано параметри фракціонування молекул з молекулярною масою до 30 кДа. Базове середовище культивування, яке пройшло фракціонування, було використано в якості контролю. Після отримання фракцій проводили контрольне вимірювання білку за методом Бредфорд (у зразках БС, КС та ККС після фракціонування специфічна реакція на білок з реактивом Coomassie Brilliant Blue G-250 була відсутня).

2.8. Введення біологічно активних композицій

Оскільки раніше було встановлено, що експресія рецепторів до НФ у матці змінюється залежно від фази естрального циклу [92], необхідно було синхронізувати старт введення препаратів. Для цього протягом 2-х тижнів перед початком експерименту у тварин брали піхвові мазки. Біологічно активні композиції та розчини-носії (ФР або БС) починали вводити у фазі еструсу. Тваринам щодня протягом 9 днів внутрішньо черевно вводили по 0,2 мл біологічно активної композиції, що досліджувалася, або розчину-носія. Експеримент припиняли на 30-32 добу після закінчення введення.

2.9. Визначення фази естрального циклу у щурів

Фазу ЕЦ у щурів контролювали щоденно о 10-й годині ранку. Для визначення фази естрального циклу (ЕЦ) цитологічним методом [159]. Тривалість ЕЦ визначали як середнє арифметичне для тварин у групі. Відносну кількість фаз еструсу та дієструсу визначали як відношення сумарної кількості діб, коли фіксувалася фаза, до загальної кількості діб спостереження, та виражали у відсотках. Відносну кількість іррегулярних астральних циклів (ІЕЦ) визначали як відношення кількості циклів, в яких спостерігалось випадіння або пролонгування фаз, до загальної кількості ЕЦ, та виражали у відсотках.

2.10. Гістологічний аналіз

Після закінчення експерименту тварин забивали, яєчники та фрагмент рога матки забирали у кожної тварини та фіксували у 10%-му нейтральному формаліні для гістологічного дослідження. Готували гістологічні зрізи органів за стандартною методикою. З одного яєчника виготовляли 9-12 серійних гістологічних зрізів товщиною 7 мкм. При цьому різали яєчник цілком, дотримуючись однакових інтервалів між зрізами. Зрізи забарвлювали гематоксиліном та еозином.

2.11. Морфометричний аналіз

Аналіз гістологічних зрізів здійснювали за допомогою мікроскопу AmScope XYL-403 та програми AxioVision Rel. 4.8. На мікрофотографіях гістологічних препаратів, забарвлених гематоксиліном та еозином, підраховували наступні показники. Кількість фолікулів на різних стадіях розвитку нормували на яєчник. Для того, щоб кожний фолікул у яєчнику було підраховано лише одноразово, на гістологічному зрізі у підрахунок брали лише фолікули з ооцитом. Ідентифікацію атретичних фолікулів здійснювали відповідно до робіт Hirshfield та співав., Wang та співав., Sharma та співав. [160–163].

Кількість жовтих тіл яєчника (ЖТЯ) визначали на різних стадіях зрілості відповідно класифікації Dixon D. та співав. [164]: ЖТЯ1 – нові ЖТЯ,

які виникли під час останньої овуляції (1-5 днів); ЖТЯ2 – ЖТЯ, які виникли протягом декількох циклів до поточного циклу (5-20 днів); ЖТЯ3 – ЖТЯ, які виникли ≥ 21 дня до поточного циклу.

У зрізах матки визначали товщину міометрію матки (поле зору $\times 20$); площу міометрію (S_m) матки (поле зору $\times 40$), яку виражали її у відсотках до загальної площі зрізу; щільність міоцитів у подовжньому (D_p) та циркулярному (D_c) шарах міометрію матки як кількість клітинних ядер на (поле зору 400×400 мкм).

2.12. Дослідження скоротливої активності ізольованих смужок матки

На ізольованих смужках (ІС) вивчали скоротливу активність матки (САМ) методом органної бані [165]. Для реєстрації САМ використовували механо-електричний трансдюсер Grass FT03C («Grass Instruments», США), з'єднаний з адаптером-мультиметром «OWON B41T» («Fujian Lilliput Optoelectronics Technology Co., Ltd.», Китай).

Смужки матки розміром 8×3 мм монтували вертикально у термостатованій камері ($t=37^\circ\text{C}$, атмосфера з 5% CO_2 та 95% O_2), заповненої розчином Кребса ($\text{pH} = 7,4$), так, щоб один кінець смужки був зв'язаний зі стаціонарним тримачем, а другий – з трансдюсером. Перед експериментом ІС інкубували протягом 60 хвилин у ізометричних умовах з навантаженням 1 г (10 мН). Після закінчення експерименту ІС зважували на торсіонних вагах ВТ-500. Для визначення стимульованої активності ІС використовували розчини окситоцину (ОТ, «Гедеон Ріхтер», Угорщина) та KCl у кінцевих концентраціях 4 нМ та 70 мМ відповідно.

Розраховували частоту скорочень (ЧС) як середню кількість циклів скорочення-розслаблення ІС у хвилину та амплітуду скорочень (АС) як середню висоту піка на кривій скорочення ІС, виражену в мН. Силу ізометричного скорочення (СІС) визначали за методом J.W. Rhee та співавт. [165] як відношення площі під кривою скорочення ІС до площі її

поперечного перерізу $((г \times с)/см^2)$. При цьому площу поперечного перерізу ІС розраховували за формулою:

$$S = m / \rho l,$$

де m – маса ІС, l – довжина ІС, тоді як ρ приймали за $1,05 \text{ г/см}^3$ відповідно до роботи R. E. Garfield та співавт. [166].

2.13. Вимірювання гормонів

Визначення рівнів естрадіолу (E_2), прогестерону (ПГ), лютеїнізуючого гормону (ЛГ) та фолікулостимулюючого гормону (ФСГ) у сироватці крові щурів проводили методом ІФА з використанням тест-наборів виробництва ТОВ «Хема» (Київ, Україна) відповідно до інструкцій виробника.

2.14. Імуногістохімічний аналіз

Для ІГХ фрагменти матки фіксували у 10%-му нейтральному формаліні та виготовляли парафінові зрізи. Використовували тест-набір Rady-to-Use з моноклональними антитілами проти актину гладеньких м'язів (Smooth Muscle Actin 1A4, «DAKO», Данія). Для візуалізації імуногістохімічного забарвлення з першими антитілами застосовувалася система детекції UltraVision Quanto Detection Systems HRP Polymer («Thermo scientific»). Як хромоген використовувався діамінобензідін (DAB). Для кількісної оцінки ІГХ забарвлення розраховували відносну площу позитивного мічення як відношення площі забарвлених структур до площі зрізу (поле зору $\times 200$), помноженому на 100 %.

2.15. Дослідження НФ-подібної біологічної активності кріоекстракту та секретомів за допомогою клітин лінії PC12

Клітини PC12 висівали у щільності 2×10^4 кл/мл, культивували на середовищі RPMI-1640 («Biowest», Франція), доповненому 15% ФТС та антибіотиками. Через 3 доби після посіву клітинну культуру переводили на безсироваткове середовище Opti-MEM («Thermo Fisher Scientific», США), що містило 50, 100 та 200 нг/мл NGF (позитивний контроль нейротрансформації) або КЕСГ, КС, ККС, БС (у концентраціях 5 та 10%). Клітини, культивовані без факторів росту, використовували як негативний

контроль. Клітини, культивовані у присутності ретиноєвої кислоти (10^{-6} моль), вважали за контроль на присутність ростового фактору, який сприяє трансформації клітин у нейральному напрямку. За допомогою інвертованого мікроскопу AmScope XYL-403 («Amscope», Китай) прижиттєво спостерігали за морфологічними ознаками клітин впродовж 5 діб культивування. Ознакою НФ-подібної активності вважали трансформацію округлих клітин у клітини з довгими відростками.

2.16. Дослідження репродуктивної функції самиць щурів

Біологічно активні композиції (КЕСГ, БС, КС та ККС) вводили самицям щурів РВ та ПРВ по 0,2 мл внутрішньо черевно протягом 9 днів. Далі самиць витримували у звичайних умовах віварію 3 доби, після чого підсаджували до репродуктивно активних самців. Через 10 діб самців відсаджували від самиць. Спостерігали за самицями, які знаходилися у клітках по одній, впродовж 25 діб. Визначали масу тіла самок і приплоду ваговим методом, тривалість вагітності, плодючість за кількістю народженого приплоду та кількістю живих плодів.

2.17. Дизайн дослідження

У роботі використані наступні біологічно активні композиції (Рис. 2.2).

- КЕСГ як водорозчинні речовини від усіх клітин СГ (1);
- фракція КЕСГ з молекулярною масою до 30 кДа як водорозчинні речовини СГ з молекулярною масою діапазону, в який входять НФ (2);
- фракція КС з молекулярною масою до 30 кДа як секретом від інтактної культури клітин зі СГ, який включає речовини з молекулярною масою діапазону, в який входять НФ (3);
- фракція ККС з молекулярною масою до 30 кДа як секретом від кріоконсервованої культури, який включає речовини з молекулярною масою діапазону, в який входять НФ (4).

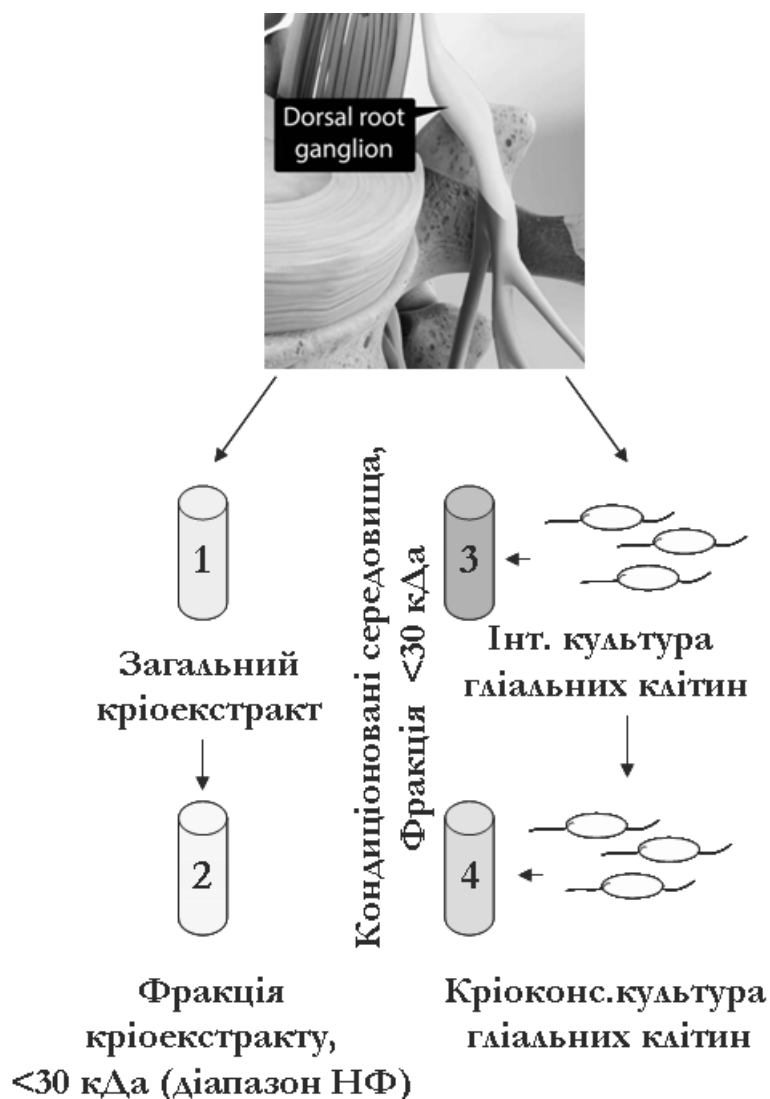


Рис. 2.2. Схема експерименту.

Примітка: фото СГ з сайту <https://mainlinespine.com/treatments-procedures/dorsal-root-ganglion-stimulation/>.

В експериментах з введення КЕСГ та його фракції були використані наступні групи щурів: інтактні РВ (n = 14); РВ з введенням ФР (n = 12); РВ з введенням зКЕСГ (n = 8); РВ з введенням фКЕСГ (n = 8); інтактні ПРВ (n = 12); ПРВ з введенням ФР (n = 12); ПРВ з введенням зКЕСГ (n = 10); ПРВ з введенням фКЕСГ (n = 10).

В експериментах з введення кондиціонованих середовищ були використані наступні групи щурів: 1 – інтактні РВ (n = 14); 2 – РВ з введенням БС (n = 11); 3 – РВ з введенням КС (n = 15); 4 – РВ з введенням

ККС ($n = 15$); 5 – інтактні ПРВ ($n = 12$); 6 – ПРВ з введенням БС ($n = 12$); 7 – ПРВ з введенням ІКС ($n = 14$); 8 – ПРВ з введенням ККС ($n = 15$).

2.18. Статистичний аналіз

Для статистичного аналізу даних використовували програму Statistica 10 («StatSoft», США). Результати представляли у вигляді $Me (Q1; Q3)$ (Me – медіана, $Q1$ – 1-й квартиль; $Q3$ – 3-й квартиль) або у вигляді $Me \pm IP$ (Me – медіана, IP – інтерквартильний розмах, який дорівнював різниці між квартилями 3 і 1 порядку). Статистичну значущість відмінностей між групами оцінювали за допомогою непараметричного критерію Манна-Уїтні. Відмінності вважали статистично значущими при $p < 0,05$.

РОЗДІЛ 3. ВПЛИВ КРІОЕКСТРАКТУ СПІНАЛЬНИХ ГАНГЛІЇВ НА МОРФОЛОГІЧНІ ТА ФУНКЦІОНАЛЬНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЯЄЧНИКІВ ЩУРІВ РІЗНОГО ВІКУ

Поглиблення знань про механізми, що регулюють розвиток та функціонування фолікулів можуть бути важливими для розуміння факторів, які приводять до раннього виснаження яєчників та передчасної менопаузи у жінок репродуктивного віку. Відомо, що активація примордіальних фолікулів яєчників і вступ їх у період росту відбувається спорадично і незалежно від гормональної регуляції. Одним з кандидатів на роль активаторів переходу фолікулів зі стадії примордіальних у стадію первинних є сімейство НФ [23–25, 167]. Однак вплив цих сполук на функціональні властивості яєчників досі вивчено недостатньо. Кріоекстракт спінальних гангліїв (КЕСГ) є композицією, яка містить НФ [29, 30, 168, 169]. Виходячи з вищесказаного, метою першого етапу роботи було вивчення впливу КЕСГ на морфологічні та функціональні характеристики яєчників щурів різного віку.

З огляду на гістологічну будову спінальних гангліїв, кріоекстракт, отриманий з них, має містити розчинні складові (компоненти зовнішньо- та внутрішньо-клітинного середовища, секреторні продукти, нейротрансмітери, НФ, ауто- та паракринні фактори тощо), які відносяться до різних клітин організму. Ці міркування навели на думку про необхідність вилучення низькомолекулярної фракції КЕСГ (фКЕСГ), яка має містити НФ.

На представленому етапі роботи було досліджено вплив загального кріоекстракту спінальних гангліїв та його фракції з молекулярною масою до 30кДа на морфологічні та функціональні характеристики яєчників щурів РВ та ПРВ.

3.1. Вплив кріоекстракту спінальних гангліїв на естральний цикл щурів різного віку

У інтактних тварин усіх досліджуваних груп спостерігалися особини як з 4-денним, так й 5-денним ЕЦ (рис. 3.1, а, б). Відсоток тварин РВ з 4-денним

ЕЦ складав 85,4%, тоді як з 5-денним – 14,6%. Відсоток тварин ПРВ з 4-денним ЕЦ складав 29,8%, тоді як з 5-денним – 70,2%. Варто відзначити, що в обох вікових групах зустрічалися тварини, у яких у 4-денному циклі де-не-де зустрічався 5-денний та навпаки, а також іррегулярні цикли (Рис. 3.2).

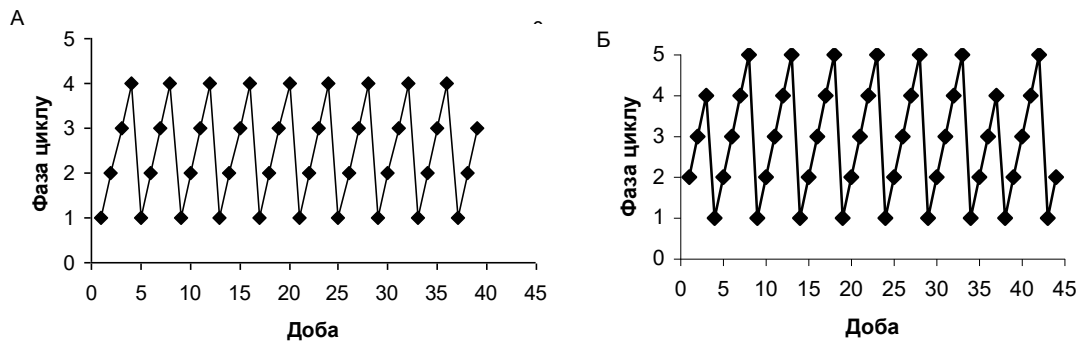


Рис. 3.1. Репрезентативний ЕЦ щура: А – тварина РВ (4-денний цикл); Б – тварина ПРВ (5-денний цикл). Проєструс – 1; еструс – 2; метаєструс – 3 ; дієструс I – 4 ; дієструс II – 5.

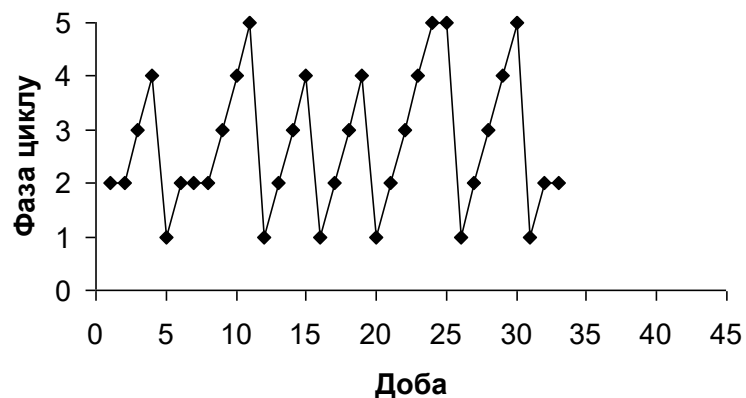


Рис. 3.2. Репрезентативний іррегулярний ЕЦ щура, превалювання фази еструсу. Проєструс – 1; еструс – 2; метаєструс – 3 ; дієструс I – 4 ; дієструс II – 5.

Кількісний аналіз показав, що у середньому по групі інтактних щурів РВ з 4-денним циклом спостерігалось доволі рівномірний розподіл між фазами естрального циклу. У тварин РВ з 5-денним циклом фаза дієструсу дещо превалювала у структурі ЕЦ (Рис. 3.3).

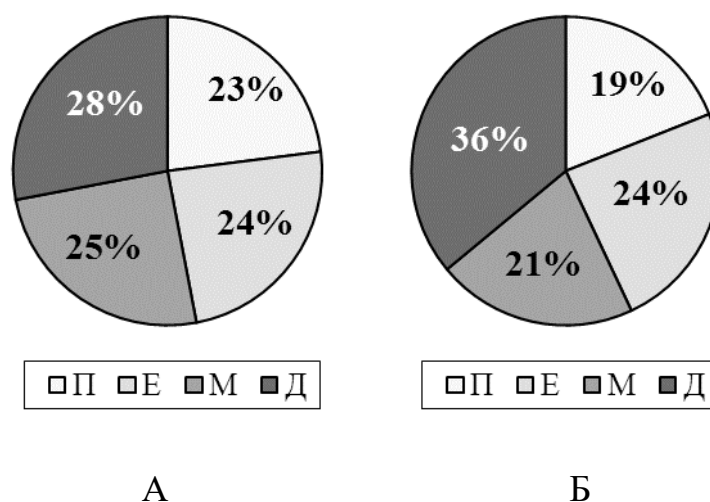


Рис. 3.3. Розподіл різних фаз у ЕЦ інтактних щурів РВ (середні показники по групі): А – 4-денний ЕЦ, Б – 5-денний ЕЦ. П – проеструс, Е – еструс, М – метеструс, Д – діеструс.

У інтактних тварин ПРВ (Рис. 3.4) було встановлено підвищення відсотку фази діеструсу у структурі ЕЦ: на 4% (для 4-денного циклу) та 10% (для 5-денного циклу), $p < 0,05$. Це можна пояснити віковими змінами у функціонуванні репродуктивної системи.

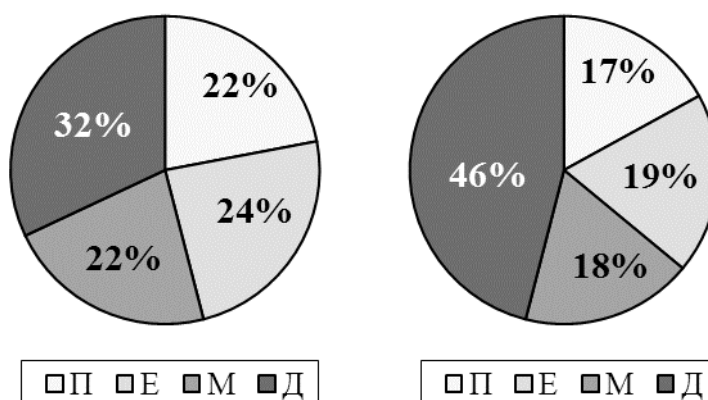


Рис. 3.4. Розподіл різних фаз у ЕЦ інтактних щурів ПРВ (середні показники по групі): А – 4-денний ЕЦ, Б – 5-денний ЕЦ. П – проєструс, Е – еструс, М – метеструс, Д – дієструс.

Середня тривалість ЕЦ у інтактних щурів або щурів РВ з введенням ФР (контроль на введення розчину-носія) складала 4 доби (таблиця 3.1). У інтактних щурів ПРВ або тварин з введенням ФР тривалість ЕЦ складала у середньому 5 діб. Такі змінення є характерними при старінні репродуктивної системи щурів [156]. Введення зКЕСГ та фКЕСГ призводило до підвищення середньої тривалості ЕЦ у тварин обох вікових груп.

Таблиця. 3.1. Середня тривалість ЕЦ (діб) у щурів різного віку (РВ та ПРВ) при введенні ФР або зКЕСГ.

Показ- ник	РВ				ПРВ			
	ІК	ФР	зКЕСГ	фКЕСГ	ІК	ФР	зКЕСГ	фКЕСГ
Трива- лість ЕЦ	4 (4; 4)	4 (4; 4)	5 (4; 5)*	4,5 (4; 5)	5 (4; 5)	5 (4; 5)	5 (4; 6)	5,5 (4; 6,3)*

Примітка. ІК – інтактний контроль; * – показник значуще відрізняється в порівнянні з показником ІК відповідного віку, $p < 0,05$.

Підвищення тривалості ЕЦ за введення КЕСГ у тварин РВ відбувалося за рахунок підвищення кількості фази дієструсу (таблиця 3.2).

Підвищення тривалості ЕЦ за введення зКЕСГ у тварин ПРВ відбувалося за рахунок підвищення кількості фази еструсу, тоді як за введення фКЕСГ – незначного підвищення фази дієструсу (таблиця 3.3). Аналіз кількості іррегулярних естральних циклів (ІЕЦ) дозволив заключити, що у інтактних тварин ПРВ відбувалося зростання у 4,6 рази кількості ІЕЦ (таблиця 3.4). Введення кріоекстракту або його фракції тваринам РВ призводило до статистично значущого підвищення кількості ІЕЦ порівняно з інтактним

контролем. При цьому ефект підвищення кількості ІЕЦ був менш виражений у випадку фКЕСГ (підвищення показника у разі зКЕСГ у 4 рази; тоді як у разі фКЕСГ – у 1,8 рази). У групі тварин ПРВ введення зКЕСГ або його фракції значуще не впливало на цей показник.

Таблиця. 3.2. Показники ЕЦ (у %) щурів РВ після введення зКЕСГ або його низькомолекулярної фракції

Фаза ЕЦ	Інтактний контроль	ФР	зКЕСГ	фКЕСГ
Проеструс	17,4 (17,0; 18,8)	18,8 (18,6; 19,1)	17,6 (16,7; 19,5)	18,5 (18,4; 18,8)
Еструс	24,5 (23,1; 25,3)	24,4 (24,3; 25)	20,5 (20; 22,5)	20,1 (20,1; 25,9)
Метаеструс	21,1 (19,5; 22,1)	20,1 (19,1; 22,0)	19,3 (18,1; 20)	21,0 (19,2; 22,9)
Діеструс	37,0 (34,9; 38,4)	36,7 (35; 38,8)	42,6 (40,5; 43,9) *	40,4 (33,5; 40,1)*

Примітка. * – показник значуще відрізняється в порівнянні з інтактним контролем, $p < 0,05$.

Таблиця. 3.3. Показники ЕЦ (у %) щурів ПРВ після введення загального КЕСГ або його низькомолекулярної фракції

Фаза ЕЦ	Інтактний контроль	ФР	зКЕСГ	фКЕСГ
Проеструс	18,0 (15,7; 20,3)	18,2 (16,1; 20,9)	18,3 (15,5; 21,4)	16,3 (15,0; 18,0)
Еструс	20,6 (18,6; 22,7)	20,3 (18,0; 22,8)	24,2 (22,2; 28,2)*	20,1 (18,0; 20,6)
Метаеструс	19,4 (18,3; 21,5)	20,4 (19,2; 22,5)	21,6 (20,5; 22,2)	18,4 (16,9; 20,5)

Дієструс	44,7 (32,0; 45,7)	43,7 (31,5; 44,9)	38,5 (33,2; 47,5)	45,4 (33,4; 47,4)
----------	----------------------	----------------------	----------------------	----------------------

Примітка. * – показник значуще відрізняється в порівнянні з інтактним контролем, $p < 0,05$.

Таблиця. 3.4. Кількість іррегулярних естральних циклів (ІЕЦ, %) у тварин РВ та ПРВ

Група тварин	Інтактний контроль	ФР	зКЕСГ	фКЕСГ
РВ	8,0 (1,5; 9,5)	9,3 (9; 12)	32 (11; 32,2)* ^a	14,1 (2,5; 15)* ^{#a}
ПРВ	37,0 (36,5; 44,2) ^a	37,0 (36,5; 44,2) ^a	38,4 (35,2; 50,0) ^a	37,5 (35,0; 47,6) ^a

Примітка. * – показник значуще відрізняється в порівнянні з інтактним контролем відповідного віку, $p < 0,05$; # – показник значуще відрізняється між групами з введенням зКЕСГ та фКЕСГ відповідного віку, $p < 0,05$; ^a – показник значуще відрізняється в порівнянні з інтактним контролем РВ, $p < 0,05$.

Таким чином, були встановлені характерні вікові змінення репродуктивної системи у щурів ПРВ, які включали зростання тривалості ЕЦ з домінуванням фази дієструсу в їхньої структурі та підвищення у середньому у 4,6 рази кількості ІЕЦ [154–156].

Введення зКЕСГ та фКЕСГ щурам РВ супроводжувалося порушенням ЕЦ, яке проявлялося у збільшенні його тривалості в основному за рахунок фази дієструсу та підвищенні кількості ІЕЦ.

У групі тварин ПРВ змінення ЕЦ під впливом зКЕСГ або його фракції були менш виражені порівняно з РВ. Вони включали підвищення тривалості ЕЦ за рахунок підвищення фаз еструсу та деструсу. Зростання кількості ІЕЦ

спостерігалася у щурів ПРВ й без введення кріоекстракту, що узгоджується з даними про вікові змінення ЕЦ у цих тварин [154–156].

3.2. Вплив кріоекстракту спінальних гангліїв на морфологічні характеристики яєчників щурів різного віку

З метою встановлення, на чому базувалися зміни у ЕЦ щурів під впливом введення кріоекстракту, нами були проведені дослідження гістологічних характеристик яєчників тварин РВ та ПРВ.

Візуальний огляд яєчників щурів різного віку не показав відмінностей між віковими групами. Однак у тварин ПРВ частіше зустрічалися крупні кісти яєчників (Рис. 3.5).



А

Б

Рис. 3.5. Кістоз яєчників у самиць груп РВ (А) та ПРВ (Б).

Існує багато класифікацій фолікулів яєчників в залежності від розміру, форми, кількості фолікулярних клітин та наявності фолікулярної порожнини (антруму) [48, 149–151]. Оскільки у фокусі представленої роботи поставали гормонально незалежні стадії розвитку фолікулів, було окремо проаналізовано кількість примордіальних фолікулів (ооцит, оточений одним шаром плоских фолікулярних клітин), та первинних фолікулів (ооцит,

оточений одним або декількома шарами кубічних фолікулярних клітин). Антральні фолікули різного ступеню зрілості (від тих, що містять фолікулярну порожнину невеликих розмірів, до Граафових пухирців) підраховували разом.

У інтактних щурів РВ яєчники мали нормальну гістологічну будову (Рис. 3.6, а). Зовні яєчники вкриті одношаровим кубічним гермінативним епітелієм, під яким розміщена слабо васкуляризована, щільна сполучнотканинна білкова оболонка. У кожному яєчнику добре розрізняється периферична коркова та центральна мозкова речовина. Строма органу утворена неоформленою волокнистою сполучною тканиною з великою кількістю веретеноподібних інтерстиціальних клітин; у медулярній речовині помітні судини артеріального, венозного, лімфатичного типу та нерви. В органі спостерігаються фолікули округлої форми різного ступеня зрілості та велика кількість функціональних та регресуючих жовтих тіл різного розміру.

В яєчниках тварин виявлялися фолікули на різних стадіях атрезії. Атретичні фолікули характеризувалися пікнозом гранульозних клітин, мережевоподібною структурою гранульозного шару внаслідок втрати міжклітинних контактів, наявністю апоптичних тіл, розірванням і нечітким контуром антрума, присутністю апоптичних тіл, сплюсненням шару гранульозних клітин та утворенням «бісерної строки» (string of beads), стоншенням або руйнуванням гранульозних клітин яйценосного бугорка, дегенеративними змінами в овоциті (зморщення, втрата ядерної оболонки та ооплазми) або його фрагментацією. Маленькі атретичні фолікули мали неправильну форму, гранульозні клітини в них були відсутні, гіпертрофовані клітини теки заміщувалися стромальною інтерстиціальною тканиною.



А

Б

Рис. 3.6. Мікрофотографії гістологічних препаратів яєчників інтактних щурів різного віку: А – РВ (у полі зору спостерігаються фолікули різного ступеня зрілості, функціональні та регресуючі жовті тіла); Б – ПРВ (у полі зору спостерігаються функціональні та регресуючі жовті тіла, атретичні фолікули зі сплюсненням та руйнуванням шару гранульозних клітин, стрілка – фолікулярна кіста).

Гістологічна будова яєчників щурів ПРВ мала схожі риси, однак характерною особливістю була наявність фолікулярних та лютеальних кіст (Рис. 3.6, б). Частіше спостерігалися фолікулярні кісти різного розміру з тонкою стінкою, яка була сформована тонким фіброзним шаром зовні та плоскими фолікулярними клітинами зсередини. Рідше спостерігалися лютеальні кісти, стінка яких була сформована декількома шарами лютеальних клітин з вакуолізованою, оксифільною цитоплазмою, заповнені рідиною або кров'ю.

Гістологічна будова яєчників щурів РВ та ПРВ з введенням ФР, зКЕСГ та фКЕСГ мала подібні риси (Рис. 3.7). Однак у тварин обох вікових груп, яким вводили зКЕСГ або його фракцію, серед атретичних фолікулів переважали фолікули на стадії швидкої дегенерації та елімінації гранульозних клітин, тоді як у групах з введенням ФР більшість фолікулів

знаходилася на пізній стадії атрезії з утворенням маленьких фолікулів та заміщенням інтерстиціальною тканиною.

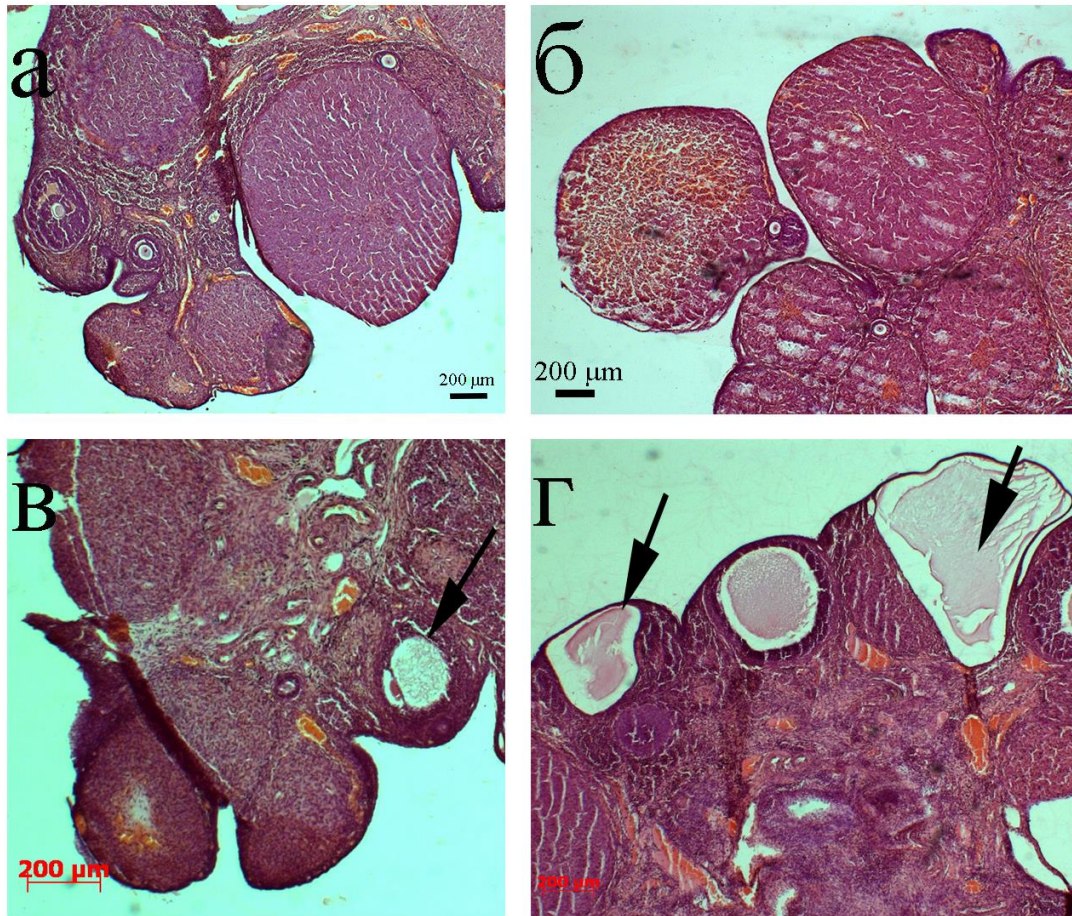


Рис. 3.7. Мікрофотографії гістологічних препаратів яєчників щурів різного віку після введення ФР або зКЕСГ: А – фолікули різного ступеня зрілості та жовті тіла в яєчнику щура РВ з введенням ФР; Б – функціональні та регресуючі жовті тіла в яєчнику ПРВ з введенням ФР; В – атретичний фолікул зі сплюсненням та руйнуванням шару гранульозних клітин, дегенеративними зміненнями овоциту (стрілка) в яєчнику щура РВ з введенням зКЕСГ; Г – фолікулярні кісти (стрілки) та добре розвинені кровоносні судини в яєчнику щура ПРВ з введенням зКЕСГ.

У тварин ПРВ з введенням КЕСГ або його фракції також зустрічалися фолікулярні кісти різного розміру з тонкою стінкою, зовні вкритою тонким фіброзним шаром, а з внутрішньої сторони – плоскими фолікулярними

клітинами, заповнені фолікулярною рідиною (Рис. 3.7, г). Також подекуди зустрічалися кісти жовтого тіла, стінка яких була сформована декількома шарами гранульозних клітин полігональної форми з пінистою, вакуолізованою, оксифільною цитоплазмою, заповнені рідиною або кров'ю. У тварин РВ фолікулярні кісти спостерігалися після введення КЕСГ. Крім того, яєчники тварин обох вікових груп після введення зКЕСГ характеризувалися підвищеною кількістю кровоносних судин, переважно вен, які у просвіті були заповнені еритроцитами.

Кількісний аналіз фолікулярного профілю яєчників представлено у таблиці таблиця 3.5.

У яєчниках інтактних тварин ПРВ на 13,2% зменшувався показник сумарної кількості фолікулів+ЖТ порівняно з інтактним контролем РВ. Це відображало зміни фолікулярного профілю яєчників, які відбуваються з віком.

Введення кріоекстракту та його низькомолекулярної фракції щурам РВ призводило до зниження показника фолікули+ЖТ у яєчниках порівняно з інтактним контролем цього ж віку. Так, за введення зКЕСГ відбувалося зниження показника на 15,8%, тоді як фКЕСГ – на 19,8%. Такий самий ефект спостерігався й у групі тварин ПРВ. У цієї групі за введення зКЕСГ показник зменшувався на 9,1%, тоді як за введення фКЕСГ – на 6,2%.

Показник сумарної кількості фолікулів гормон-незалежних стадій (примордіальних та первинних фолікулів) теж зазнавав статистично значущих змін. У тварин РВ застосування зКЕСГ призводило до зменшення показника на 28,1%, тоді як застосування фКЕСГ – на 59,3%. У тварин ПРВ спостерігався подібний ефект: зменшення показника на 26,4% за введення зКЕСГ та на 28,3% за введення фКЕСГ. Помітно, що більш чутливими до дії кріоекстракту та його фракції були тварини РВ.

Схожий вплив на фолікулярний профіль яєчників було описано у роботі Fu X. та співав. [170]. Отримані авторами дані свідчили, що екзогенне введення NGF щурам приводило до зменшення кількості «малих фолікулів». Зважаючи на це, отриманий нами ефект може бути асоційованим із NGF.

Крім того, можливими кандидатами на роль активаторів фолікулогенезу у складі кріоекстракту є NT-3 та GDNF, оскільки було показано їх здібність до активації трансформації примордіальних фолікулів [24, 25].

Кількість антральних фолікулів та ЖТЯ значуще не змінювалася за введення зКЕСГ або фКЕСГ у порівнянні з контролем.

Таблиця 3.5. Кількісні гістологічні показники яєчників щурів різного віку після введення зКЕСГ або його низькомолекулярної фракції

Показник	РВ			ПРВ		
	Інтактний контроль	зКЕСГ	фКЕСГ	Інтактний контроль	зКЕСГ	фКЕСГ
Фолікули + ЖТЯ	75,5 (71,3; 82,0)	63,5 (57,3; 65,0)* ^a	60,5 (59,7; 61,2)* ^a	65,5 (57,0; 71,3)*	59,5 (57,0; 66,8)*	61,5 (59,5; 62,0)*
ПрФ+ ПФ	32,0 (25,5; 36,5)	23,0 (19,0; 25,5)* ^a	13,0 (12,0; 15,5)* ^a #	26,5 (19,3; 29,0)*	19,5 (16,7; 22,8)* ^a	19,0 (17,5; 20,8)* ^a
АнФ	9,5 (4,5; 11,5)	8,2 (3,5; 10,8)	8,0 (7,3; 8,8)	8,0 (4,6; 9,5)	7,0 (4,0; 8,0)	8,5 (8,0; 9,0)
АтФ	12,0 (10,3; 14,5)	15,0 (9,7; 16,8)* ^a	20,5 (18,3; 23,5)* ^a #	10,5 (9,3; 15,8)	16,5 (13,8; 17,9)* ^a	15,0 (15,0; 17,3)* ^a
ЖТЯ	23,0 (19,1; 26,2)	25,0 (23,3; 28,7)	23,5 (23,0; 24,7)	20,5 (13,3; 24,0)	22,0 (17,0; 25,5)	16,5 (16,0; 17,8)*
Кісти	0 (0; 1,2)	1,5 (1,3; 1,7)	0 (0; 0,7)	3,0 (2,0; 4,5)*	2,0 (1,5; 4,5)	1,0 (1,0; 1,8)

Примітка. Примітка: ПрФ+ПФ – сума примордіальних та первинних фолікулів, АнФ – антральні фолікули, АтФ – атретичні фолікули. Кожний з показників нормовано на один яєчник; * – показник значуще відрізняється у порівнянні з ІК РВ, $p < 0,05$; ^a – показник значуще відрізняється у порівнянні з

ІК відповідного віку, $p < 0,05$; # – показник значуще відрізняється між групами тварин одного віку з введенням зКЕСГ або фКЕСГ, $p < 0,05$.

Використання зКЕСГ та фКЕСГ призводило до статистично значущого підвищення кількості фолікулів на стадії атрезії. У групі тварин РВ відбулося підвищення показника у 1,3 рази за введення зКЕСГ та у 1,7 рази за введення фКЕСГ порівняно з контролем відповідного віку. При цьому відповідне підвищення показника у разі використання фКЕСГ статистично значуще розрізняється у порівнянні з використанням зКЕСГ. У тварин ПРВ відбувалося підвищення кількості атретичних фолікулів у 1,65 рази за введення зКЕСГ та у 1,45 рази за введення фКЕСГ.

Добре відомо, що фертильність щурів знижується у віці від 8-10 місяців та надалі. У цей же період підвищується кількість фолікулярних кіст внаслідок порушення овуляції в ході старіння та гормонального дисбалансу [171–173]. Вважається, що у таких щурів зрілі антральні фолікули не овулюють, але утворюють кісти внаслідок дисбалансу пролактину, ЛГ, андрогенів та зниження експресії рецепторів до гонадотропінів. В наших дослідженнях вікові зміни у щурів ПРВ в порівнянні з тваринами РВ виражалися у підвищенні середньої кількості кіст. Однак за введення КЕСГ або його фракції статистично значущих відмінностей цього показника не було виявлено у тварин РВ та ПРВ порівняно з контролем відповідного віку.

Як відомо, формування жовтого тіла яєчника (ЖТЯ) включає істотні перебудови гістологічної структури, зокрема, руйнування базальної мембрани фолікулів, міграцію ендотеліальних клітин, фібробластів і клітин теки до пулу гранульозних клітин, неоваскуляризацію. Розвиток та підтримка гормоно-продукуючої функції ЖТЯ обумовлені як гормональною регуляцією за рахунок ЛГ, пролактину, естрадіолу, так і впливом деяких ростових факторів (VEGF, bFGF, ангіопоетину) [174]. Крім того, в попередніх дослідженнях було показано підвищення концентрації BDNF в крові жінок під час лютеїнової фази [175]. Враховуючи вищенаведене, нами було

припущено, що введення кріоекстракту або його фракції як джерела НФ може вплинути на склад ЖТЯ. Кількість ЖТЯ у яєчнику визначали за наступною класифікацією [164]: ЖТЯ1 – нові ЖТЯ, які виникли під час останньої овуляції (1-5 днів); ЖТЯ2 – ЖТЯ, які виникли протягом декількох циклів до поточного циклу (5-20 днів); ЖТЯ3 – ЖТЯ, які виникли ≥ 21 дня до поточного циклу.

Після введення зКЕСГ або його фракції показник кількості новоутворених ЖТЯ (ЖТЯ1) не зазнавав істотних змін у обох вікових групах (таблиця. 3.6). Однак показник кількості ЖТЯ2 (5-20 днів) був значуще менше у тварин обох вікових груп за введення зКЕСГ або його фракції. У тварин РВ після введення зКЕСГ показник зменшувався на 31,5%, тоді як у тварин ПРВ – на 37,5%. Після введення фКЕСГ показник ЖТЯ2 зменшувався у тварин РВ на 52,6%, тоді як у тварин ПРВ – на 50%. Показник кількості ЖТЯ3 у обох групах теж мав тенденцію до зменшення після введення зКЕСГ.

Таблиця 3.6. Кількість ЖТЯ різних стадій зрілості у щурів різного репродуктивного віку після введення зКЕСГ або його фракції

Показ- ник	РВ			ПРВ		
	К	зКЕСГ	фКЕСГ	К	зКЕСГ	фКЕСГ
ЖТЯ1	5,0 (5,0; 6,0)	6,5 (4,2; 7,0)	7,5 (5,0; 8,5)	5,5 (4,2; 6,7)	7,5 (5,5; 8,7)	5,5 (4,5; 7,7)
ЖТЯ2	9,5 (9,0; 10,0)	6,5 (3,7; 8,8)*	5,0 (4,5; 8,2)*	8,0 (3,5; 11,0)	5,0 (3,0; 5,0)*	4,0 (2,5; 5,2)*
ЖТЯ3	12,0 (10,3; 12,8)	9,5 (8,3; 11,8)	10,5 (10,0; 13,0)	12,0 (7,75 13,8)	8,5 (7,5; 10,0)	8,0 (6,5; 11,5)

Примітка. * – показник значуще відрізняється у порівнянні з контролем відповідного віку, $p < 0,05$; К – контроль (введення ФР).

Отже, після введення кріоекстракту або його фракції спостерігалось зменшення кількості жовтих тіл, які сформувалися у яєчниках 20 та більше

дів раніше. Це безпосередньо відображає вплив цих біологічно активних композицій, оскільки тварин спостерігали протягом 28-30 дів після закінчення їхнього введення.

Таким чином, під впливом кріоекстракту зі спінальних гангліїв або його низькомолекулярної фракції у яєчниках щурів незалежно від віку (РВ або ПРВ) відбуваються структурні перебудови, які стосуються фолікулярного профілю та жовтих тіл. Зменшення кількості фолікулів гормоно незалежних стадій розвитку свідчить про стимулюючий вплив зКЕСГ/фКЕСГ на вихід примордіальних фолікулів з дормантного стану. Разом з цим, відбувається ефект підвищення кількості атретичних фолікулів. Це може бути пов'язано з тим, що ростові фактори та інші біологічно активні речовини кріоекстракту індукують «арешт» антральних фолікулів на проміжних стадіях росту. Це приводить до накопичення антральних фолікулів середнього розміру, більшість з яких пізніше піддається атрезії [60].

Висновки за розділом

1. Встановлені вікові інволютивні зміни репродуктивної системи самиць щурів, які включали порушення естрального циклу та зміни фолікулярного профілю яєчників. У порівнянні з інтактними щурами РВ, у інтактних тварин ПРВ спостерігалася підвищення середньої тривалості ЕЦ з 4 до 5 дів; підвищення кількості дів з фазою дієструсу у структурі ЕЦ (на 4% для 4-денного ЕЦ та на 10% для 5-денного ЕЦ); підвищення кількості іррегулярних ЕЦ у 4,6 рази; зменшення сумарної кількості фолікулів та жовтих тіл у яєчниках на 13,2%, підвищення кількості фолікулярних кіст.
2. Встановлено ефект введення зКЕСГ на естральний цикл та фолікулярний профіль яєчників щурів РВ. У порівнянні з інтактними щурами застосування зКЕСГ приводило до підвищення тривалості ЕЦ за рахунок збільшення кількості дів

з фазою дієструсу; підвищення кількості іррегулярних ЕЦ у 4 рази; зниження сумарної кількості фолікулів гормононезалежних стадій (примордіальних та первинних фолікулів) на 28,1% та водночас підвищення кількості атретичних фолікулів у 1,3 рази.

3. Встановлено ефект введення зКЕСГ на естральний цикл та фолікулярний профіль яєчників щурів ПРВ. У порівнянні з інтактними щурами застосування зКЕСГ приводило до підвищення тривалості ЕЦ в основному за рахунок збільшення кількості діб з фазою еструсу та у меншій мірі – дієструсу; зменшення сумарної кількості фолікулів гормононезалежних стадій (примордіальних та первинних фолікулів) на 26,4% та водночас збільшення кількості атретичних фолікулів у 1,65 рази.
4. Показано ефект введення фКЕСГ на естральний цикл та фолікулярний профіль яєчників щурів РВ. У порівнянні з інтактними щурами застосування фракції кріоекстракту приводило до збільшення кількості діб з фазою дієструсу у ЕЦ; підвищення кількості іррегулярних ЕЦ у 1,8 рази; зниження сумарної кількості фолікулів гормононезалежних стадій (примордіальних та первинних фолікулів) на 59,3% та водночас підвищення кількості атретичних фолікулів у 1,7 рази.
5. Продемонстровано ефект введення фКЕСГ на естральний цикл та фолікулярний профіль яєчників щурів ПРВ. У порівнянні з інтактними щурами застосування фракції кріоекстракту приводило до підвищення тривалості ЕЦ; зменшення сумарної кількості фолікулів гормононезалежних стадій (примордіальних та первинних фолікулів) на 28,3% та

водночас збільшення кількості атретичних фолікулів у 1,45 рази.

6. Зважаючи на встановлені зміни у яєчниках самиць щурів, введення кріоекстракту або його фракції з молекулярною масою до 30 кДа стимулює вихід примордіальних фолікулів з дормантного стану та їх подальший розвиток, але у той же час призводить до підвищення процесів фолікулярної атрезії.

Публікації за розділом: [34], [35], [40], [41].

РОЗДІЛ 4. ВПЛИВ КРІОЕКСТРАКТУ СПІНАЛЬНИХ ГАНГЛІЇВ НА МОРФОЛОГІЧНІ ТА ФУНКЦІОНАЛЬНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ МАТКИ ЩУРІВ РІЗНОГО ВІКУ

Зменшення скоротливої активності матки (САМ) у жінок пізнього репродуктивного віку несе ризик дискоординації пологової діяльності та необхідності оперативного розродження [176–178]. У зв'язку з цим розробка підходів до нормалізації скоротливої активності матки є важливою для сучасної медицини. НФ, як відомо, мають великий вплив на формування та підтримку функцій жіночої репродуктивної системи [61, 71, 78, 85–87, 90–92, 179]. У попередніх дослідженнях було встановлено активуючий вплив НФ (NGF, BDNF, NT-3) на моторику гладеньких м'язів кишечника [180]. У роботі Глоби В.Ю. та співав. було показано, що кріоекстракт зі СГ збільшував скорочувальну активність гладеньких м'язів сечового міхура у щурів [157]. З огляду на вищевикладене, метою наступного етапу роботи було вивчення морфологічних особливостей матки та її скорочувальної активності у щурів різного віку після введення зКЕСГ або його фракції як композиції, яка містить НФ.

4.1. Вплив кріоекстракту спінальних гангліїв на морфологічні особливості матки щурів різного віку

На початковому етапі дослідження було проведено гістологічний аналіз матки інтактних та експериментальних тварин РВ та ПРВ.

Візуальний огляд виявив у деяких щурів обох вікових груп ознаки патології матки. Спостерігалася кістозна гіперплазія ендометрію, що є поширеним явищем у самок щурів та мишей старого віку [164]. Гістологічний аналіз виявив наявність в ендометрії матки кіст, висланих плоским епітелієм з ознаками компресійної атрофії. Траплялися випадки осередкової ендометріальної стромальної гіперплазії.

У решти щурів контрольних та експериментальних груп матка мала нормальну гістологічну будову (Рис. 4.1). В ендометрії контрольних тварин (інтактні та з введенням ФР) визначалися два шари: епітеліальний і власна пластинка, утворена пухкою волокнистою сполучною тканиною, яка містила маткові залози.

Залежно від естрального циклу ендометрій було представлено кубічним або циліндричним епітелієм з елементами мітозів у дієструсі та проєструсі (Рис. 4.1, А). У фазі еструсу в ендометрії спостерігалися великі залози із секретом (Рис. 4.1, В). Люмінальний епітелій мав стовпчасту морфологію. Ядра клітин мали еліптичну форму та розташовувалися на базальному полюсі. Виявлялася невелика кількість мітозів. Між стромальних клітин визначалися лейкоцити. Наприкінці фази починалася дегенерація залозистого епітелію. У метаєструсі спостерігалися явища мітозів та водночас дегенерації епітеліальних клітин (Рис. 4.1, Д).

У міометрії добре визначалися два шари гладеньком'язових клітин, розташованих поздовжньо та циркулярно, відокремлених один від одного прошарками пухкої сполучної тканини.

Мікрофотографії зрізів матки тварин із введенням зКЕСГ представлено на рисунку 4.1 (Б, Г, Е). Гістологічний аналіз показав відсутність змін у ендометрії експериментальних тварин порівняно з контролем відповідного віку. Гістологічна будова ендометрію була збережена, його товщина та кількість ендометріальних залоз теж була подібною. Це свідчило про те, що введення зКЕСГ не впливає на ендометрій матки, у тому числі на її предімплантаційної стадії.

Після введення фКЕСГ матка щурів обох вікових груп ткож мала нормальну гістологічну будову (Рис. 4.2). Ендометрій був представлений одношаровим епітелієм, висота якого залежала від фази ЕЦ, та звивистими трубчастими залозами, відокремленими між собою пухкою волокнистою сполучною тканиною власної пластинки.

У міометрії розрізнялися два шари гладеньких м'язів, розташованих поздовжньо та циркулярно, відокремлених один від одного прошарками пухкої сполучної тканини.

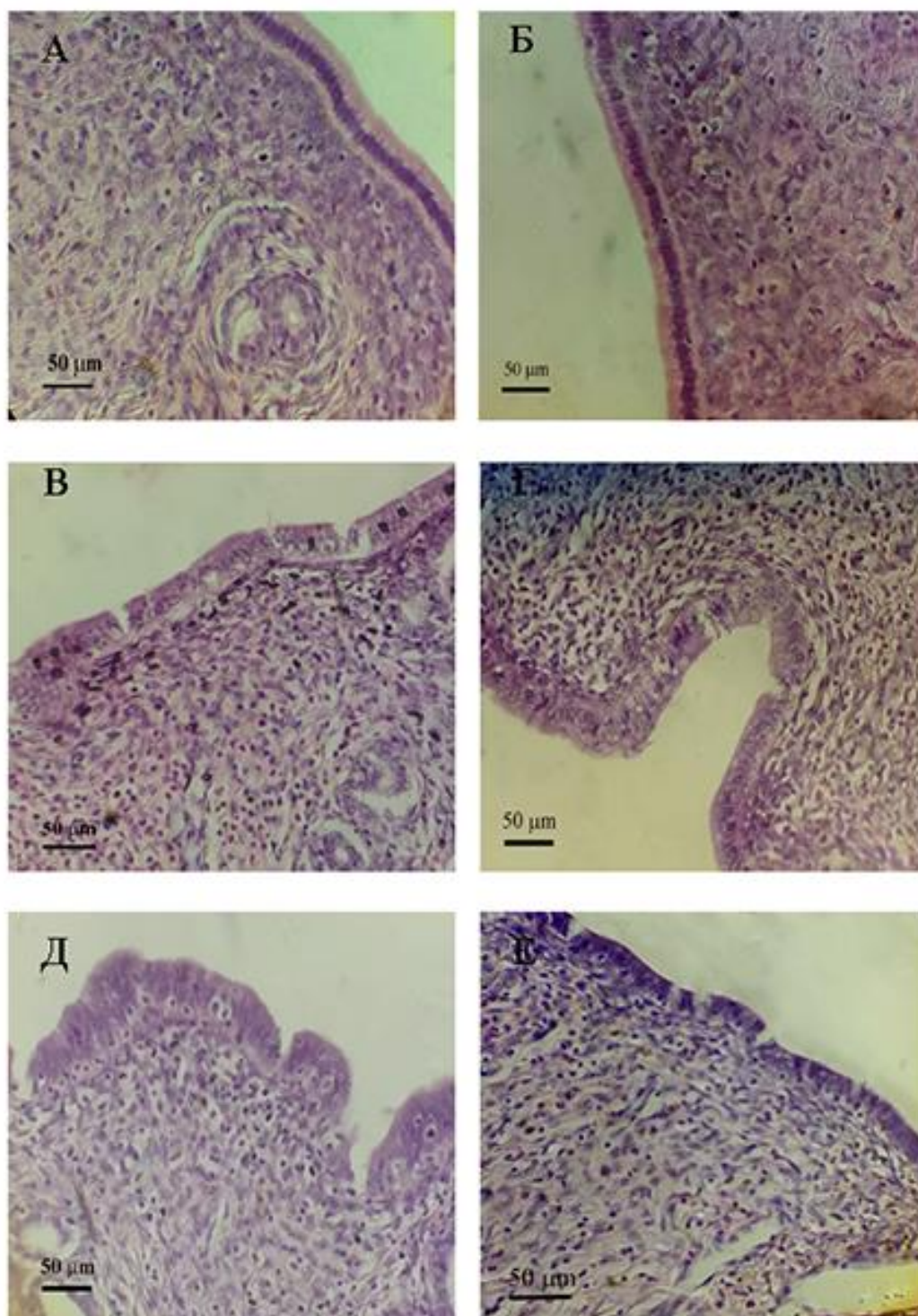


Рис. 4.1. Мікрофотографії гістологічних препаратів ендометрію матки контрольних щурів (А, В, Д) або з введенням зКЕСГ (Б, Г, Е): А, Б –

дієструс; В, Г – еструс; Д, Е – метаєструс. Забарвлення гематоксиліном та еозином.

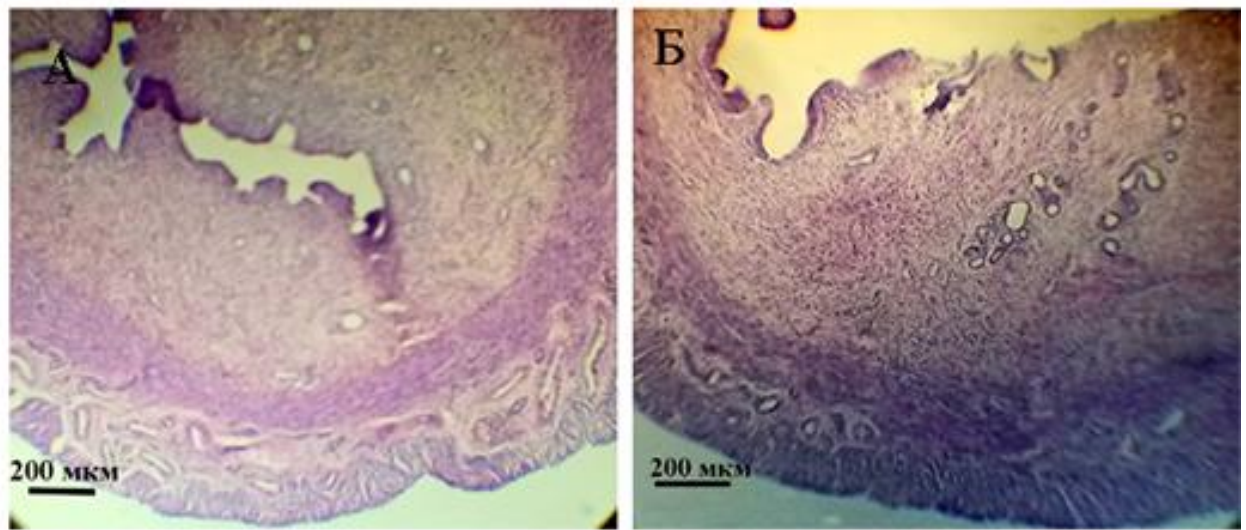
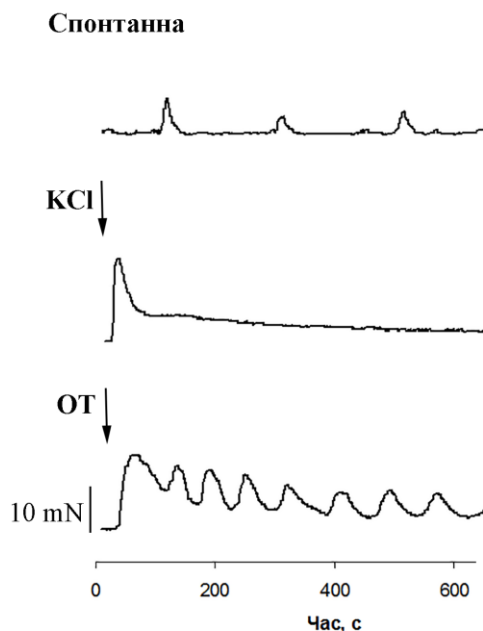


Рис. 4.2. Мікрофотографії гістологічних препаратів матки щурів за умов введення фКЕСГ: А – репрезентативний зразок матки тварини РВ; Б – репрезентативний зразок матки тварини ПРВ. Забарвлення гематоксиліном та еозином.

4.2. Вплив кріоекстракту спінальних гангліїв на скоротливу активність міометрію матки щурів різного віку

Відомо, що переважна більшість симпатичних нейронів, що мають рецептивні поля в матці, експресують рецептори до НФ TrkA та p75 p75 [91, 92]. З огляду на це, ми припустили, що НФ-залежна регуляція може мати вплив на САМ. Зважаючи на це, на наступному етапі роботи було проведено визначення впливу КЕСГ на скоротливу активність матки щурів пізнього репродуктивного віку.

Ізольовані смужки (ІС) матки щурів усіх груп характеризувалися базальною САМ, яка проявлялася у вигляді рідкісних спонтанних ритмічних скорочень невеликої амплітуди (Рис. 4.3, верхній трек).



ис. 4.3. Репрезентативні криві скоротливої активності ІС матки щурів: верхній трек – спонтанна САМ; середній трек – KCl-індукована САМ; нижній трек – OT-індукована САМ.

Додавання розчину KCl до органної бані, в якій було закріплено ізольовану смужку матки, призводило до дерполяризації, що виражалось в появі класичної відповіді: початковому піці напруги («фазовий» компонент) та подальшому стійкому рівню напруги («тонічний» компонент) матки (Рис. 4.3, середній трек). Аплікація OT у концентрації 4 нМ приводила до зростання частоти та амплітуди скорочень. При цьому вид кривої скорочень мав два яскраво виражених компонента – тонічний та фазовий (Рис. 4.3, нижній трек).

Як відомо, в мембрані гладенько-м'язових клітин існує два типи іонних каналів, які дозволяють кальцію проникати в клітину, що й запускає м'язове скорочення [181]. Одним з них є рецептор-опосередковані канали, які

активуються за дією стимулюючої речовини та дозволяють вхід кальцію або натрію усередину клітини.

Другим типом є потенціал-чутливі кальцієві канали, які відкриваються у відповідь на зменшення мембранного потенціалу. У розчині з підвищеним вмістом калію знижується градієнт калію через мембрану та змінюється мембранний потенціал. Зниження мембранного потенціалу активує потенціал-чутливі кальцієві канали внаслідок чого підвищується кількість внутрішньоклітинного кальцію та виникає скорочення смужки матки. Тобто розчин KCl є неспецифічним стимулятором гладеньком'язового скорочення за рахунок зміни градієнту калію через клітинну мембрану, що у свою чергу веде до зміни мембранного потенціалу та активації потенціал-чутливих Ca^{2+} -каналів [181]. Таким чином, KCl-опосередковане скорочення дає змогу взагалі оцінити скорочувальний апарат зразка міометрію. Фазовий компонент відповіді гладеньких м'язів матки, який демонструє середній трек на рисунку 4.3, безпосередньо пов'язаний із притоком іонів Ca^{2+} через потенціал-залежні кальцієві канали.

Окситоцин є нейропептидом-утеротоником та специфічним активатором скорочення міометрію матки. Окситоцин зв'язується з рецептором OXTR, який активує шлях передачі сигналу через фосфоліпазу C та інозитол-3-фосфат (IP3), що викликає вивільнення Ca^{2+} з саркоплазматичного ретикулуму всередині клітини [182]. Тонічний компонент відповіді гладеньких м'язів матки, який демонструє нижній трек на рисунку 4.3, безпосередньо обумовлений впливом на ці рецептор-залежні канали [183]. Таким чином, ОТ-опосередковане скорочення дає змогу оцінити експресію специфічних рецепторів у міометрії матки.

Базальна та ОТ-індукована ЧС статистично значуще не відрізнялася між групами щурів РВ та ПРВ віку (таблиця 4.2). Амплітуда скорочень (базальна, KCl- та ОТ-індукована) теж не мала різниці у обох вікових групах.

Сила ізометричного скорочення (CIC) статистично значуще зменшувалась з віком. У інтактних тварин ПРВ базальна CIC знижувалась на

26,7%; KCl-індукована СІС – на 19,7%; ОТ-індукована – на 23,1%. Це відображало вікові зміни САМ у щурів.

Контроль на введення розчину-носія (ФР) показав відсутність статистично значущих змін САМ. За умов введення зКЕСГ тваринам РВ не було встановлено статистично значущих змін показників САМ (таблиця 4.1).

Таблиця 4.1. Показники САМ щурів РВ та ПРВ після введення зКЕСГ

Показ- ник	РВ			ПРВ		
	Інтактний контроль	ФР	зКЕСГ	Інтактний контроль	ФР	зКЕСГ
Базаль- на ЧС	0,2 (0,1; 0,2)	0,2 (0,05; 0,2)	0,1 (0,1; 0,2)	0,2 (0,2; 0,3)	0,2 (0,1; 0,3)	0,2 (0,15; 0,2)
ОТ- індуко- вана ЧС	0,9 (0,5; 1,1)	0,9 (0,1; 1,1)	0,75 (0,7; 0,9)	0,8 (0,4; 0,9)	0,8 (0,4; 0,9)	1,0 (0,7; 1,1) #
Базаль- на АС	10,7 (10,3; 11,4)	10,5 (10,1; 10,9)	10,6 (10,0; 11,0)	10,9 (10,8; 11,0)	10,8 (10,0; 11,0)	10,9 (10,1; 11,4)
KCl- індуко- вана АС	11,5 (11,0; 12,1)	11,5 (11,0; 12,1)	11,6 (11,2; 12,1)	12,1 (11,5; 12,2)	12,1 (11,5; 12,2)	11,6 (10,6; 12,3)
ОТ- індуко- вана АС	11,5 (11,2; 13,1)	11,3 (11,2; 11,7)	11,9 (10,9; 12,5)	11,8 (11,7; 12,5)	11,4 (10,7; 11,6)	12,6 (11,9; 12,7) #
Базаль- на СІС	35,2 (25,0; 44,9)	35,0 (30,0; 40,1)	35,2 (28,0; 45,9)	25,8 (21,9; 28,4) *	26,1 (20,5; 33,2) *	31,8 (28,1; 34,4)
KCl- індуко- вана СІС	35,9 (26,7; 48,2)	35,7 (34,1; 49,7)	41,2 (35,8; 51,2)	28,8 (23,6; 31,3) *	27,9 (25,7; 32,6) *	44,2 (43,4; 44,9) #
ОТ- індуко- вана СІС	38,3 (33,7; 45,7)	44,0 (40,7; 69,6)	44,1 (39,6; 49,5)	27,9 (22,6; 29,8) *	31,0 (28,0; 34,5) *	42,7 (42,2; 49,1) #

Примітка: * – показник значуще відрізняється порівняно з показником інтактного контролю РВ, $p < 0,05$; # – показник значуще відрізняється порівняно з показником інтактного контролю відповідного віку, $p < 0,05$.

У тварин ПРВ значуще змінювалися ОТ-індукована ЧС, ОТ-індукована АС, КСІ- та ОТ-індукована СІС за введення зКЕСГ порівняно з інтактним контролем відповідного віку (таблиця 4.1). Показники підвищувалися: ОТ-індукована ЧС у 1,25 рази, ОТ-індукована АС у 1,06 рази, КСІ-індукована СІС у 1,54 рази, ОТ-індукована СІС у 1,53 рази.

Показники САМ щурів після введенням фКЕСГ представлені у таблиці 4.2. Показник базальної ЧС фКЕСГ підвищувався у щурів обох вікових груп. Щодо решти показників САМ, ефект введення фКЕСГ відрізнявся у тварин в залежності від віку. У щурів РВ введення фКЕСГ або не приводило до зміни показників САМ (ОТ-індукована ЧС; базальна та індукована АС), або пригнічувало КСІ- та ОТ-індуковану СІС. При цьому пригнічення КСІ-індукованої СІС відбувалося на 33,9%, тоді як ОТ-індукованої СІС – на 39,9%.

У щурів ПРВ після введення фКЕСГ встановлено статистично значуще збільшення ОТ-індукованої ЧС, КСІ- та ОТ-індукованої АС, а також індукованої СІС порівняно з інтактними тваринами відповідного віку. Показники підвищувалися: ОТ-індукована ЧС у 1,3 рази, КСІ-індукована АС у 1,23 рази, ОТ-індукована АС у 1,16 рази, КСІ-індукована СІС у 1,08 рази.

Отримані нами ефекти підвищення показників САМ під впливом зКЕСГ або його фракції могли реалізуватися за рахунок або підвищення експресії рецепторів до ОТ у матці або за рахунок гіпертрофії/гіперплазії гладеньком'язових міоцитів під впливом трофічних факторів, присутніх у кріоекстракті. З огляду на це, нами було проаналізовано морфологічні показники міометрію матки на гістологічних зрізах (таблиця 4.3).

Таблиця 4.2. Показники САМ щурів РВ та ПРВ після введення фКЕСГ

Показник	РВ		ПРВ	
	Інтактний контроль	фКЕСГ	Інтактний контроль	фКЕСГ
Базальна ЧС	0,2 (0,1; 0,2)	0,7 (0,6; 0,7)*	0,2 (0,2; 0,3)	0,7 (0,5; 0,7)*#
ОТ-індукована ЧС	0,9 (0,5; 1,1)	0,7 (0,7; 0,9)	0,8 (0,4; 0,9)	1,1 (0,8; 1,2)#
Базальна АС	10,7 (10,3; 11,4)	10,8 (10,7; 10,8)	10,9 (10,8; 11,0)	10,8 (10,7; 11,5)
КСІ-індукована АС	11,5 (11,0; 12,1)	11,9 (11,7; 12,1)	12,1 (11,5; 12,2)	15,0 (14,5; 15,3)*#
ОТ-індукована АС	11,5 (11,2; 13,1)	11,8 (11,7; 12,0)	11,8 (11,7; 12,5)	13,8 (13,2; 14,9)*#
Базальна СІС	35,2 (25,0; 44,9)	22,5 (20,8; 27,3)	25,8 (21,9; 28,4)*	25,1 (24,0; 27,4)*
КСІ-індукована СІС	35,9 (26,7; 48,2)	23,7 (22,1; 28,8)*	28,8 (23,6; 31,3)*	31,2 (29,0; 31,3)#
ОТ-індукована СІС	38,3 (33,7; 45,7)	23,0 (21,3; 29,0)*	27,9 (22,6; 29,8)*	28,7 (27,8; 29,9)*

Примітка: * – показник значуще відрізняється порівняно з показником інтактного контролю РВ, $p < 0,05$; # – показник значуще відрізняється порівняно з показником інтактного контролю відповідного віку, $p < 0,05$.

Результати морфометричних досліджень свідчили про відсутність значущих змін у товщині міометрію, щільності розташування міоцитів у його поздовжньому (Dп) та циркулярному (Dц) шарах між експериментальними та контрольними групами обох віків (таблиця 4.3). Це свідчило на користь того, що ефект підвищення САМ реалізується більше за рахунок змін у рецепторному полі матки, ніж за рахунок гіперплазії гладеньких міоцитів. На

користь цього також є факт, що в основному ефекти підвищення показників САМ під впливом кріоекстракту або його фракції стосувалися ОТ-індукованих показників (таблиці 4.1 та 4.2).

Таблиця. 4.3. Морфологічні показники міометрію матки щурів різних груп після введення зКЕСГ або його фракції.

Показ- ник	РВ				ПРВ			
	ІК	ФР	зКЕСГ	фКЕСГ	ІК	ФР	зКЕСГ	фКЕСГ
Товщи на, мкм	210 (180; 280)	216 (198; 270)	230 (228; 276)	226 (224; 278)	230 (226; 300)	250 (238; 310)	224 (224; 234)	234 (222; 254)
Sm, %	51,6 (47,8; 54,1)	52,5 (51,1; 56,5)	51,9 (48,5; 54,3)	52,2 (50,5; 54,7)	49,3 (46,5; 53,9)	50,4 (45,7; 60,2)	50,3 (45,6; 58,6)	52,6 (37,7; 59,9)
Дц	13,5 (11,3; 16,0)	11,0 (9,0; 11,1)	14,0 (12,0; 16,3)	15,0 (12,0; 16,0)	13,0 (11,5; 16,0)	13,0 (11,2; 16,0)	12,5 (11,0; 15,3)	12,0 (10,2; 12,5)
Дп	24,0 (19,3; 30,7)	17,9 (13,5; 27,5)	22,0 (18,8; 29,3)	21,2 (17,3; 22,0)	20,2 (17,0; 20,5)	24,0 (23,0; 28,2)	20,0 (17,0; 21,2)	20,0 (20,0; 23,0)

Примітка: Sm – площа міометрію; Дп – щільність міоцитів у подовжньому шарі міометрію матки; Дц – щільність міоцитів у циркулярному шарі міометрію матки.

З чим міг бути пов'язаний ефект пригнічення САМ у тварин РВ за введення фКЕСГ, встановлений у наших експериментах (таблиця 4.2)? Як було показано раніше, циклічні перебудови матки, які зачіпають у тому числі й периферичну іннервацію, відбуваються за рахунок естрогенів і прогестерону [184, 185]. На тлі високих рівнів естрогенів відбувається дегенерація аксонів симпатичних нервів у матці. Вважається, що це є

адаптаційним пристосуванням для сприяння спокою гладкої мускулатури матки ссавців на пізніх термінах вагітності [184, 185]. Щільність нервових волокон в матці щурів зменшується під час проєструсу та еструсу, але повертається до вихідного рівня під час метеструсу та дієструсу [186]. Регуляторні механізми де- та реіннервації матки досі до кінця не з'ясовано, але вважається, що НФ відіграють в цьому значну роль. Є припущення, що фізіологічна симпатична денервація матки пов'язана з підвищенням рівню проNGF, який викликає апоптоз нейронів, а також BDNF, який пригнічує зростання нейритів у присутності естрогенів [187]. У наших експериментах зменшення САМ у щурів РВ може бути пов'язане зі зниженням її іннервації під впливом НФ, які сконцентровані у фКЕСГ.

Проведені експерименти дозволили встановити, що з віком знижується САМ щурів. Використання зКЕСГ не впливало на показники САМ тварин РВ, але підвищувало показники скорочення у тварин ПРВ. Використання фКЕСГ мало різноспрямовану дію в залежності від віку експериментальних тварин. У щурів РВ введення фКЕСГ навіть пригнічувало індуковану СІС, тоді як активувало її у щурів ПРВ.

Висновки за розділом

1. На основі гістологічного аналізу зрізів матки показано, що загальний кріоекстракт та його фракція не впливають на морфологічні характеристики ендометрію та міометрію матки.
2. Встановлені вікові інволютивні зміни скоротливої активності матки щурів, які характеризувалися зниженням сили ізометричного скорочення. У порівнянні з інтактними щурами РВ, у інтактних тварин ПРВ спостерігалось зменшення базальної СІС на 26,7%, КСІ-індукованої СІС – на 19,7%; ОТ-індукованої СІС – на 23,1%.
3. Внутрішньочеревне введення зКЕСГ мало різноспрямовану дію в залежності від віку експериментальних тварин: не

впливало на САМ щурів РВ, але стимулювало САМ щурів ПРВ. Порівняно з інтактним контролем, застосування зКЕСГ приводило до підвищення ОТ-індукованої частоти скорочень у 1,25 рази, ОТ-індукованої амплітуди скорочень у 1,06 рази, КСІ-індукованої СІС у 1,54 рази, ОТ-індукованої СІС у 1,53 рази.

4. Внутрішньочеревне введення фКЕСГ також мало різноспрямовану дію на показники САМ в залежності від віку експериментальних тварин. Порівняно з інтактними тваринами РВ введення фКЕСГ не змінювало частоту та амплітуду скорочень, але пригнічувало КСІ- та ОТ-індуковану СІС на 33,9% та 39,9% відповідно. У щурів ПРВ введення фКЕСГ збільшувало КСІ-індуковану та ОТ-індуковану амплітуду скорочень у 1,2 та 1,16 рази відповідно; КСІ-індуковану СІС у 1,08 рази.

Публікації за розділом: [35], [36], [39], [42], [44].

РОЗДІЛ 5. ВПЛИВ СЕКРЕТОМІВ ВІД КУЛЬТУР КЛІТИН ЗІ СПІНАЛЬНИХ ГАНГЛІЇВ НА МОРФОЛОГІЧНІ ТА ФУНКЦІОНАЛЬНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ ЯЄЧНИКІВ ЩУРІВ РІЗНОГО ВІКУ

Використання клітинної та тканинної терапії протягом останніх десятиріч поширюється як метод корекції функції жіночої репродуктивної системи [11, 188]. Однак ризики неадекватного приживлення та диференціювання стовбурових клітин, їх імунного відторгнення або виникнення пухлин обмежують безпечне використання клітинних препаратів. В останні роки з'ясовано, що ефекти від трансплантації клітин базуються на секреції ними біологічно активних факторів та регуляторних речовин [12]. Зважаючи на це, секрети (кондиціоновані середовища) від культур клітин пропонуються як альтернатива клітинної терапії [13–15]. Культура клітин зі спінальних гангліїв є збагаченою на сателітні гліальні клітини [144], які секретують нейротрофічні фактори, основний фактор росту фібробластів (bFGF), антиоксиданти та інші регуляторні білки [29, 30]. З огляду на це, нами було зроблено припущення, що використання секретому від культури клітин зі СГ має перспективи у корекції вікових інволютивних змін репродуктивної системи.

У зв'язку з цим, на наступному етапі роботи було вивчено вплив секретомів, отриманих від інтактною та кріоконсервованою культур клітин спінальних гангліїв, на морфофункціональні особливості яєчників та рівні статевих та гонадотропних гормонів у щурів різного віку.

В експериментах були використані: кондиціоноване середовище від інтактною культури (КС) та середовище від кріоконсервованою культури (ККС). Базове середовище (БС) культивування було застосоване як контроль на розчин-носії.

По-перше, було вивчено вплив біологічно активних композицій на ЕЦ щурів. Оскільки на попередньому етапі роботи (див. розд. 3) основні ефекти від введення кріоекстракту зі СГ проявлялися у змінненні кількості фаз дієструсу та еструсу, надалі увагу було зосереджено саме на цих показниках.

Після введення секретомів та БС тваринам РВ середня кількість діб з фазою еструсу (ФЕ) у структурі ЕЦ у щурів істотно не змінювалася (рис. 5.1). У тварин ПРВ відбувалося статистично значуще підвищення показника після введенням КС у 1,3 рази, тоді як після введення ККС – у 2 рази.

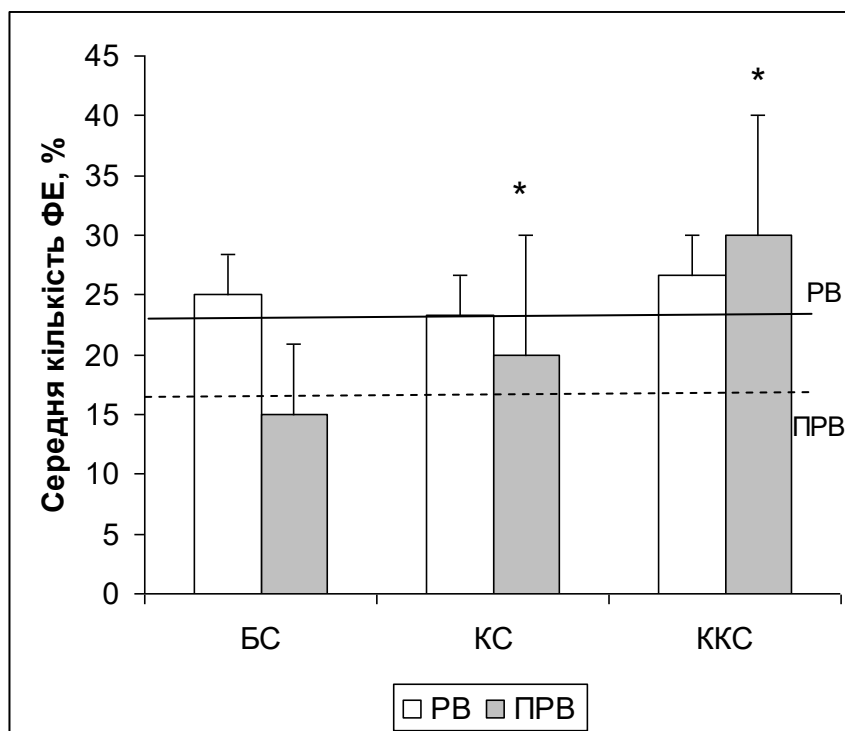


Рис. 5.1. Середня кількість діб з фазою еструсу (ФЕ) у щурів різного віку після введення БС (базового середовища), КС (кондиціонованого середовища від інтактної культури) та ККС (кондиціонованого середовища від кріоконсервованої культури). Лінії вказують рівень показника для кожної вікової групи до введення середовищ; дані представлені як $Me \pm IP$; * – показник статистично значуще відрізняється від показника інтактних тварин відповідного віку, $p < 0,05$.

Середня кількість діб з фазою дієструсу (ФД) у структурі ЕЦ після введення секретомів та БС тваринам РВ значуще підвищувалася (рис. 5.2). Порівняно з інтактним контролем підвищення показника відбувалося після введенням КС у 1,2 рази, тоді як після введення ККС – у 1,5 рази. Ці зміни профілю ЕЦ у тварин РВ збігалися з тими, що були встановлені за умов введення кріоекстракту (див. розд. 3).

У тварин ПРВ не спостерігалось статистично значущих змін цього показника після введення секретомів.

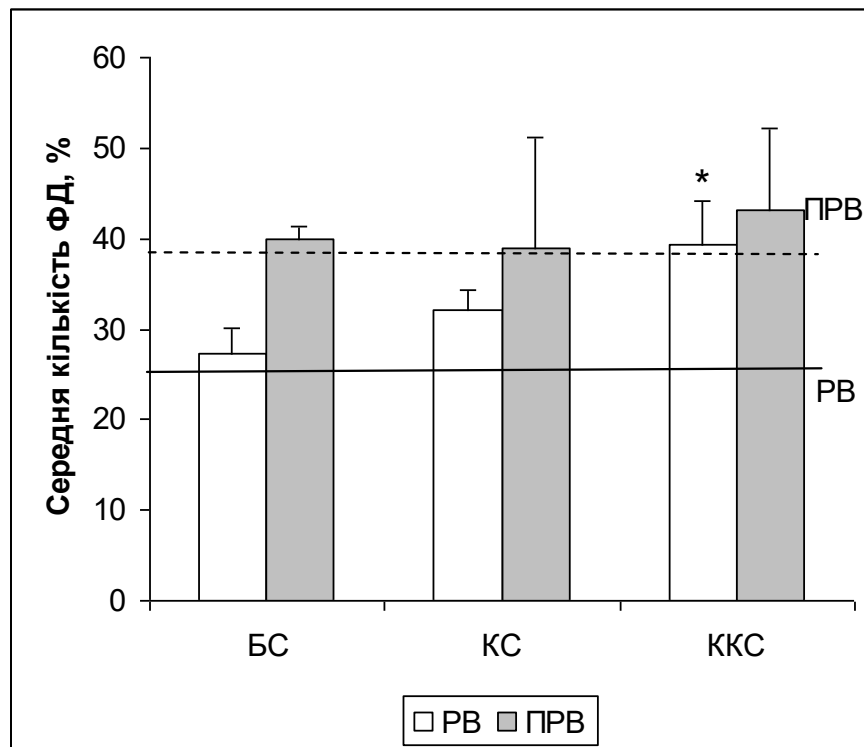


Рис. 5.2. Середня кількість діб з фазою дієструсу (ФД) у щурів різного віку після введення БС (базового середовища), КС (кондиціонованого середовища від інтактної культури) та ККС (кондиціонованого середовища від кріоконсервованої культури). Лінії вказують рівень показника для кожної вікової групи до введення середовищ; дані представлені як $Me \pm IP$; * – показник статистично значуще відрізняється від показника інтактних тварин відповідного віку, $p < 0,05$.

У тварин обох вікових груп, яким вводили секретоми, гістологічна будова яєчників була схожою до тих, які описані у розділі 3, та мали особливості, характерні для їх вікових груп.

На гістологічних зрізах було підраховано кількість фолікулів гормонально незалежної (примордіальних і первинних фолікулів) та гормонально залежної (антральні фолікули та Граафові пухирці) стадій розвитку.

Як вже було встановлено у попередніх експериментах з введення кріоекстракту та його низькомолекулярної фракції (див. розділ 3), вікові зміни у інтраоваріальному пулі інтактних щурів ПРВ виражалися у значущому зменшенні кількості фолікулів та ЖТЯ, а також підвищенні кількості кіст порівняно з тваринами РВ (таблиця 5.1).

Таблиця 5.1. Кількісні гістологічні показники яєчників щурів різного віку після введення БС, КС та ККС. Дані представлені як $Me \pm IP$.

Показ- ник	РВ				ПРВ			
	Інтакт- ні	БС	КС	ККС	Інтакт- ні	БС	КС	ККС
ПрФ+	32,0	29,3	15,4	15,5	26,5	23,5	16,5	16,5
ПФ	(25,5; 36,5)	(17,5; 35,3)	(11,3; 17,0)*	(7,2; 16,5)*	(19,3; 29,0)*	(15,3; 26,0)*	(9,5; 19,0)* #	(14,5; 18,8)* #
АнФ	9,5 (4,5; 11,5)	8,2 (6,2; 10,5)	7,5 (3,5; 11,0)	7,0 (4,5; 10,2)	8,0 (4,6; 9,5)	7,0 (3,3; 10,8)	6,5 (3,0; 10,0)	6,2 (4,2; 12,0)
АтФ	12,0 (10,3; 14,5)	10,5 (9,7; 13,2)	17,0 (13,5; 18,0)*	21,0 (18,2;2 4,0)*	10,5 (9,3; 15,8)	11,0 (9,8; 15,3)	21,5 (13,5; 26,0) *#	19,5 (11,8; 23,5)*#
ЖТЯ	23,0 (19,1; 26,2)	22,5 (19,2; 24,2)	19,0 (16,0; 22,0)	36,5 (26,3; 38,8)*	20,5 (13,3; 24,0)	18,5 (15,2; 22,0)	16,5 (14,0; 17,8)	20,5 (14,8; 25,3)
Кісти	0 (0; 1,2)	0 (0; 1,0)	1,0 (0,5; 1,0)	0 (0; 1,0)	3,0 (2,0; 4,5)*	1,5 (1,0; 2,0)	0 (0; 0,75) #	0 (0; 1,0)#

Примітка: ПрФ+ПФ – сума примордіальних та первинних фолікулів, АнФ – антральні фолікули, АтФ – атретичні фолікули; * – показник статистично значуще відрізняється від інтактного контролю РВ, $p < 0,05$; # – показник статистично значуще відрізняється від інтактного контролю відповідного віку, $p < 0,05$.

Введення БС щурам РВ не приводило до статистично значущих змін у кількості фолікулів усіх стадій розвитку, а також ЖТЯ.

У порівнянні з інтактним контролем у тварин РВ спостерігалася статистично значуще зменшення сумарної кількості примордіальних і первинних фолікулів (ПрФ+ПФ) за введення КС на 51,8%, тоді як за введення ККС на 51,5% (таблиця 5.1). На цьому фоні відбувалося підвищення кількості атретичних фолікулів за введення КС у 1,4 рази, тоді як за введення ККС у 1,75 рази.

Введення усіх середовищ тваринам ПРВ приводило до змін, подібних тим, які спостерігалися у тварин РВ. За введення КС та ККС відбувалося зменшення сумарної кількості примордіальних і первинних фолікулів на 37,7% (таблиця 5.1). Кількість атретичних фолікулів за введення КС підвищувалася у 2 рази, тоді як за введення ККС у 1,86 рази. Крім того, у тварин ПРВ відбувалося зниження кількості кіст у яєчниках після введення КС та ККС.

Оскільки щури відносяться до тварин з дуже коротким ЕЦ, циклічне змінення рівню гонадотропних та статевих гормонів у них має певні особливості. Нами було вивчено рівні E_2 , ПГ, ЛГ та ФСГ у інтактних щурів РВ та ПРВ в залежності від фази ЕЦ (таблиця 5.2). У тварин обох вікових груп встановлено фізіологічний профіль секреції з характерним підвищенням рівнів усіх досліджених гормонів у фазі проєструсу [53]. При цьому статистично значущих відмінностей у рівнях досліджуваних гормонів в залежності від віку не було зафіксовано.

Таблиця 5.2. Змінення рівню гонадотропних та статевих гормонів у інтактних щурів РВ та ПРВ в залежності від фази ЕЦ

ЕЦ	РВ				ПРВ			
	Е ₂ , пг/мл	ПГ, нг/мл	ЛГ, МЕ/л	ФСГ, МЕ/л	Е ₂ , пг/мл	ПГ, нг/мл	ЛГ, МЕ/л	ФСГ, МЕ/л
П	68,0 ±7,5	27,6 ±14,7	1,2 ±1,9	40,2 ±13,8	61,2 ±14,9	34,2 ±19,6	0,85 ±0,22	34,8 ±39,7
Е	66,5 ±10,2	10,5 ±11,1	0,50 ±0,40	2,3 ±6,9	63,9 ±9,5	15,9 ±11,7	0,85 ±0,17	5,6 ±5,1
М	62,6 ±19,0	30,8 ±10,2	0,45 ±0,17	0,7 ±1,0	59,8 ±6,12	33,8 ±28,2	0,31 ±0,20	1,1 ±1,37
Д	69,3 ±11,5	26,0 ±18,9	0,30 ±0,10	2,5 ±1,4	65,3 ±10,9	43,9 ±22,1	0,40 ±0,31	3,4 ±3,1

Примітка: П – фаза проеструсу, Е – фаза еструсу, М – фаза мета еструсу, Д – фаза діструсу; дані представлені як $Me \pm IP$.

Відомо, що у самиць щурів з віком змінюється співвідношення між гонадотропними (ЛГ/ФСГ) та статевими (Е₂/ПГ) гормонами [161, 186]. Нами також було встановлено значуще зниження у 4 рази співвідношення ЛГ/ФСГ у щурів ПРВ порівняно з щурами РВ (таблиця 5.3). Введення усіх середовищ не приводило до значущих змін співвідношень у щурів РВ. На відміну від цього, у щурів ПРВ відбувалося значуще підвищення показника ЛГ/ФСГ у 2,5 рази при введенні БС, у 6,5 рази при введенні КС та у 14 разів при введенні ККС.

Таблиця 5.3. Співвідношення гонадотропних та статевих гормонів самиць щурів різного віку після введення БС, КС та ККС.

Показник	РВ				ПРВ			
	Інтактні	БС	КС	ККС	Інтактні	БС	КС	ККС
E ₂ /ЛГ	0,33 ±0,24	0,19 ±0,11	0,33 ±0,04	0,53 ±0,57	0,24 ±0,37	0,29 ±0,47	0,14 ±0,06	0,17 ±0,12
ЛГ/ФСГ	0,16 ±0,26	0,14 ±0,13	0,10 ±0,22	0,29 ±0,13	0,04 ±0,02#	0,11 ±0,35*	0,26 ±1,18*	0,57 ±0,32*

Примітка: дані представлені як $Me \pm IP$; співвідношення E₂/ЛГ визначали після перерахунку рівнів гормонів у нМоль/л та представляли у експоненціальному форматі, де $E=10^{-2}$; * – показник статистично значуще відрізняється від інтактного контролю відповідного віку, $p < 0,05$; # - показник статистично значуще відрізняється від інтактного контролю РВ, $p < 0,05$.

До ознак репродуктивного згасання у щурів відноситься зниження пікових концентрацій ЛГ та ФСГ у фазі проєструсу, що обумовлено зміною здатності гіпоталамо-гіпофізарної системи секретувати гонадотропіни у відповідь на фізіологічні стимули [189, 190]. У наших експериментах вікові зміни у самиць щурів також включали зниження рівню ЛГ у фазі проєструсу, загальне зменшення співвідношення ЛГ/ФСГ. Цікаво, що після введення КС та ККС щурам ПРВ спостерігалось зниження кількості кіст у яєчнику. Можливо, що підвищення співвідношення ЛГ/ФСГ (за рахунок підвищення рівню ЛГ) при введенні середовищ сприяло нормальної овуляції зрілих фолікулів. Крім того, раніше встановлено, що нейротрофічні фактори NGF та BDNF безпосередньо приймають участь у розвитку нормального процесу овуляції [21].

Таким чином, секрети від культури клітин зі СГ активують зміни у фолікулярному профілі яєчників за рахунок активації дормантних фолікулів. Кріоконсервування культури клітин спінальних гангліїв за обраним режимом не впливає на біологічну активність КС, про що свідчать односпрямовані

зміни показників експериментальних тварин за умов введення як КС, так й ККС.

Висновки за розділом:

1. Встановлено ефект введення секретому від інтактної культури клітин зі СГ на естральний цикл та фолікулярний профіль яєчників щурів РВ. У порівнянні з інтактними щурами застосування секретому приводило до підвищення тривалості ЕЦ за рахунок збільшення кількості діб з фазою дієструсу; зниження сумарної кількості фолікулів гормононезалежних стадій (примордіальних та первинних фолікулів) на 51,8% та водночас підвищення кількості атретичних фолікулів у 1,4 рази.
2. Встановлено ефект введення секретому від кріоконсервованої культури клітин зі СГ на естральний цикл та фолікулярний профіль яєчників щурів РВ. У порівнянні з інтактними щурами застосування секретому приводило до збільшення кількості діб з фазою дієструсу; зменшення сумарної кількості фолікулів гормононезалежних стадій на 51,5% та водночас підвищення збільшення кількості атретичних фолікулів у 1,75 рази.
3. Показано ефект введення секретому від інтактної культури клітин зі СГ на естральний цикл та фолікулярний профіль яєчників щурів ПРВ. У порівнянні з інтактними щурами застосування секретому приводило до збільшення кількості діб з фазою еструсу у ЕЦ; зниження сумарної кількості фолікулів гормононезалежних стадій (примордіальних та первинних фолікулів) на 37,7% та водночас підвищення кількості атретичних фолікулів у 2 рази.
4. Продемонстровано ефект введення від кріоконсервованої культури клітин зі СГ на естральний цикл та фолікулярний профіль яєчників щурів ПРВ. У порівнянні з інтактними щурами застосування фракції кріоекстракту приводило до збільшення кількості діб з фазою еструсу у ЕЦ; зменшення сумарної кількості фолікулів гормононезалежних

стадій (примордіальних та первинних фолікулів) на 37,7% та водночас збільшення кількості атретичних фолікулів у 1,86 рази.

5. Введення секретомів, отриманих від інтактної та кріоконсервованої культур гліальних клітин, сприяло підвищенню співвідношення ЛГ/ФСГ та пригніченню формування асоційованих з віком кіст у щурів пізнього ПРВ.
6. Біологічний ефект на фолікулярний профіль яєчників щурів обох вікових груп від введення секретому кріоконсервованої культури клітин був схожим з тим, що спостерігався у разі застосування секретому від інтактної культури.

Публікації за розділом: [37].

РОЗДІЛ 6. ВПЛИВ СЕКРЕТОМІВ ВІД КУЛЬТУР КЛІТИН ЗІ СПІНАЛЬНИХ ГАНГЛІЇВ НА МОРФОЛОГІЧНІ ТА ФУНКЦІОНАЛЬНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ МАТКИ ЩУРІВ РІЗНОГО ВІКУ

Метою наступного етапу роботи було вивчення впливу кондиціонованих середовищ, отриманих від інтактної та кріоконсервованої культур гліальних клітин, на морфологічні характеристики та скоротливу активність матки щурів різного репродуктивного віку.

Гістологічна будова матки у щурів усіх експериментальних груп залежала певною мірою від фази циклу, але не відрізнялася в залежності від введення секретомів (Рис. 6.1, а – г).

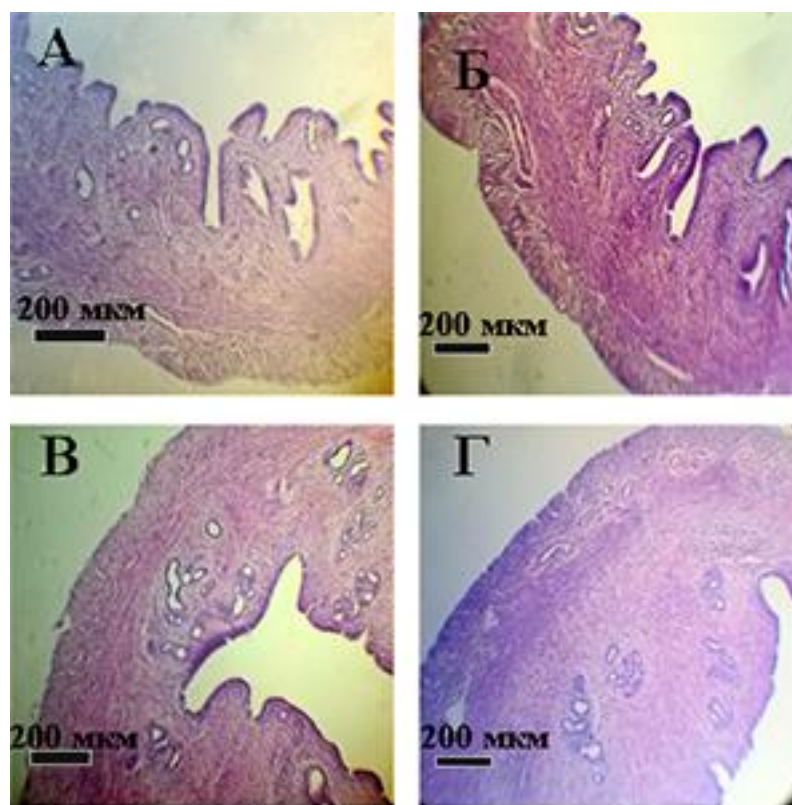


Рис. 6.1. Мікрофотографії гістологічних препаратів матки щурів за умов введення фКЕСГ: А – репрезентативний зразок матки тварини РВ з введенням КС; Б – репрезентативний зразок матки тварини ПРВ з введенням КС; В – репрезентативний зразок матки тварини РВ з введенням ККС; Г –

репрезентативний зразок матки тварини ПРВ з введенням ККС. Забарвлення гематоксиліном та еозином.

Ендометрій був представлений одношаровим епітелієм та звивистими трубчастими залозами, відокремленими між собою пухкою волокнистою сполучною тканиною власної пластинки. Два шари гладеньких м'язів, розташованих поздовжньо та циркулярно, спостерігалися у міометрії. Шари гладеньких м'язів були відокремлені один від одного прошарками пухкої сполучної тканини.

Кількісний аналіз показав, що площа міометрію (S_m) тварин РВ не змінювалася в залежності від введення біологічно активних композицій (таблиця 6.1).

Таблиця 6.1. Гістологічні показники матки щурів різного віку після введення БС, КС та ККС

Показник	РВ				ПРВ			
	К	БС	КС	ККС	К	БС	КС	ККС
S_m	51,8 $\pm 5,9$	49,6 $\pm 6,8$	52,3 $\pm 8,9$	48,7 $\pm 9,9$	50,3 $\pm 10,8$	52,5 $\pm 9,1$	62,8 $\pm 15,5\#$	58,0 $\pm 12,8\#$
Дц	13,5 $\pm 4,7$	14,5 $\pm 3,0$	14,0 $\pm 4,0$	14,1 $\pm 2,5$	13,0 $\pm 4,5$	14,0 $\pm 5,5$	12,5 $\pm 4,8$	12,0 $\pm 4,5$
Дп	24,0 $\pm 11,5$	27,5 $\pm 10,2$	22,9 $\pm 6,5$	30,0 $\pm 7,1^*$	20,2 $\pm 3,5$	22,5 $\pm 16,5$	23,1 $\pm 5,2\#$	25,0 $\pm 5,5\#$

Примітка: S_m – площа міометрію; Дп – щільність міоцитів у подовжньому шарі міометрію матки; Дц – щільність міоцитів у циркулярному шарі міометрію матки; К – інтактний контроль; дані представлені як $Me \pm IP$; * – показник статистично значуще відрізняється від інтактного контролю РВ, $p < 0,05$; # - показник статистично значуще відрізняється від інтактного контролю ПРВ, $p < 0,05$.

У тварин ПРВ спостерігалось значуще підвищення площі міометрію у тварин, яких піддавали обробці КС та ККС. Водночас у цих груп значуще зростала щільність міоцитів у подовжньому шарі міометрію (Дп). Щільність міоцитів у циркулярному шарі міометрію (Дц) не зазнавала значущих змін.

Надалі було перевірено скоротливу активність матки щурів РВ та ПРВ після введення секретомів.

Спонтанна активність ізольованої смужки (ІС) матки у щурів усіх груп характеризувалася рідкісними ритмічними скороченнями невеликої амплітуди. Додавання КСІ приводило до виникнення піку напруги зі збільшенням амплітуди. ОТ-індуковане скорочення мало два яскраво виражених компонента – тонічний та фазовий з підвищенням як АС, та і ЧС (див. розділ 4).

Введення базального середовища, яке у аналізі використовували як контроль на розчин-носій, не приводило до статистично значущих змін порівняно з інтактним контролем відповідного віку. Порівняно з тваринами РВ, яким вводили БС, тварини ПРВ з введенням БС характеризувалися зменшенням базальної, КСІ- та ОТ-індукованої СІС (таблиця 6.2). Це відображало вікові зміни САМ.

Застосування секретомів значуще не впливало на показники САМ у щурів РВ (таблиця 6.2).

У тварин ПРВ після введення КС відбувалося значуще підвищення ОТ-індукованої СІС у 1,1 рази. Після введення ККС відбувалося значуще підвищення спонтанної СІС у 1,3 рази, ОТ-індукованої СІС у 1,2 рази та КСІ-індукованої СІС у 1,4 рази порівняно з контролем відповідного віку. Цікаво, що за введення секретомів показники СІС у тварин ПРВ наближалися до рівня САМ щурів РВ. Також потрібно відзначити, що після введення секретомів спостерігалось підвищення частоти та амплітуди скорочень у тварин ПРВ.

Таблиця 6.2. Показники скоротливої активності матки щурів різного віку після введення БС, КС та ККС.

Показник	РВ			ПРВ		
	БС	КС	ККС	БС	КС	ККС
Базальна ЧС	0,3±0,2	0,3±0,1	0,2±0,1	0,4±0,4	0,3±0,1	0,2±0,1
ОТ-індукована ЧС	0,6±0,4	0,6±0,2	0,9±0,3	0,6±0,1	1,0±0,2*#	1,0±0,5*#
ОТ-індукована АС	12,0±0,7	13,5±0,6	12,1±0,6	13,1±1,8	13,9±1,0	12,7±1,0
КСІ-індукована АС	11,9±0,7	13,4±0,3	12,5±0,7	13,2±3,5	14,8±1,9*	14,2±0,7*
Базальна СІС	31,1±7,8	28,8±2,1	33,4±12,6	26,6±7,6*	27,7±1,2*	32,7±2,1#
ОТ-індукована СІС	31,9±7,7	29,7±2,5	38,1±14,8	28,4±8,4*	32,3±2,7#	34,8±3,4#
КСІ-індукована СІС	32,0±9,1	30,8±2,0	40,0±13,2	28,4±5,4*	30,3±1,9	39,0±4,5#

Примітка: * – показник статистично значуще відрізняється від показника САМ за введення БС тварин РВ, $p < 0,05$; # - показник статистично значуще відрізняється від показника САМ за введення БС тварин ПРВ, $p < 0,05$. Дані представлені як $Me \pm IP$.

Для з'ясування можливих механізмів отриманих змін у скоротливої активності матки щурів, було проведено імуногістохімічне мічення актину

гладеньких м'язів (Рис. 6.2). Специфічне мічення на зрізах матки спостерігалось у тварин усіх досліджених груп в основному у міометрії та t. media судин. У інтактних тварин ПРВ різко зменшувалася експресія актину у міометрії, особливо у циркулярному шарі (Рис. 6.2, б). Відзначалося розростання міжм'язових та внутрішньом'язових прошарків сполучної тканини з підвищенням васкуляризації останній. Після введення КС та ККС візуально було встановлено підвищення експресії актину у зразках матки щурів ПРВ (Рис. 6.2, в, г).

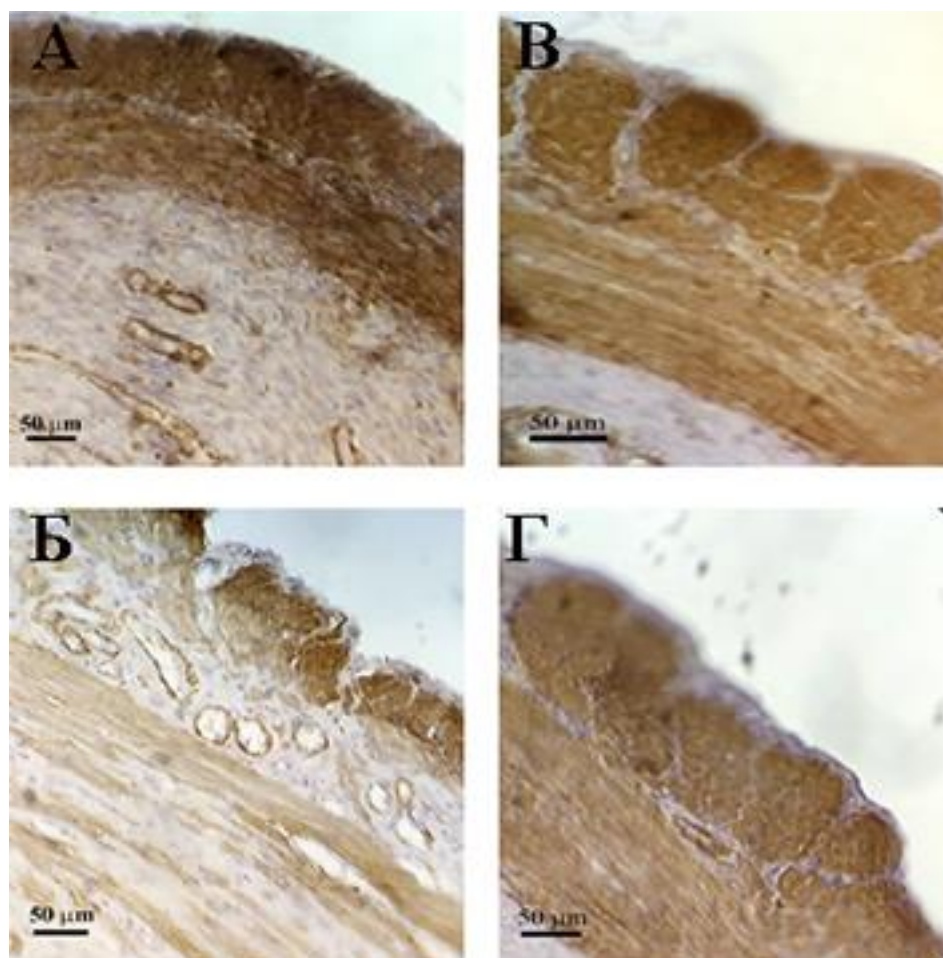


Рис. 6.2. Імуногістохімічне мічення актину гладеньких м'язів у матці щурів: А – інтактні РВ; Б – інтактні ПРВ; В – ПРВ з введенням ККС; В – ПРВ з введенням КС. Ділянки позитивного мічення мають коричневе забарвлення, контрастування ядер гематоксиліном.

Кількісний аналіз ІГХ забарвлення підтвердив зменшення у 1,5 рази забарвлення антитілами до актину гладеньких м'язів у інтактних тварин ПРВ порівняно з РВ (рис. 6.3). При застосування КС та ККС у тварин обох вікових груп площа позитивного мічення відповідно підвищувалася: у 1,3 та 1,1 рази у тварин РВ ($p>0,05$); у 2,7 та 2,6 рази у тварин ПРВ ($p<0,05$).

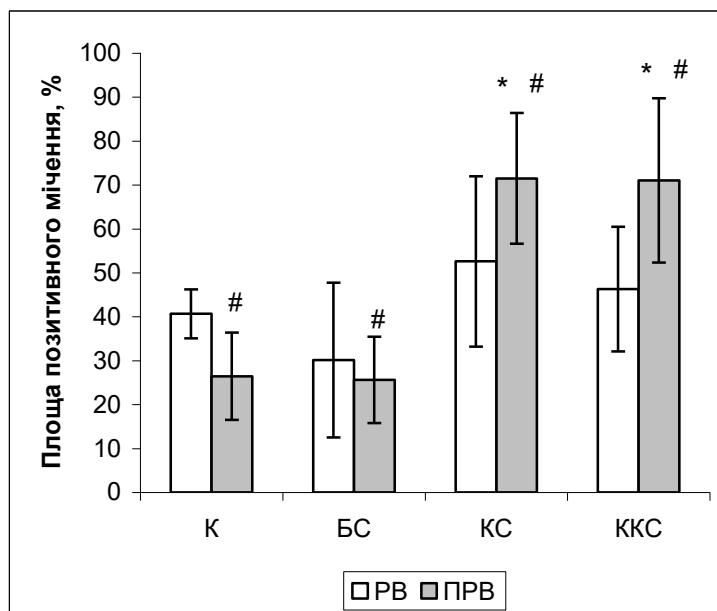


Рис. 6.3. Площа специфічного мічення зрізів матки антитілами до актину гладких м'язів. К – інтактний контроль; дані представлені як $Me \pm IP$; * – показник статистично значуще відрізняється від інтактного контролю відповідного віку, $p<0,05$; # - показник статистично значуще відрізняється від інтактного контролю РВ, $p<0,05$.

Відомо, що розчин КСІ є неспецифічним стимулятором гладенькомязового скорочення за рахунок зміни градієнту калію через клітинну мембрану, що у свою чергу веде до зміни мембранного потенціалу та активації потенціал-чутливих Ca^{2+} -каналів [181]. Окситоцин, навпаки, є специфічним активатором скорочення біометрії, який зв'язується зі специфічним рецептором OXTR, що викликає вивільнення Ca^{2+} з саркоплазматичного ретикулулу [182]. Зважаючи на це, на основі отриманих даних щодо КСІ- та ОТ-індукованої скоротливої активності зразків, можна заключити, що з віком спостерігається зниження як загальної, так і рецептор-

опосередкованої СІС міометрію. Цікаво, що підвищення обох типів активованої СІС відбувалося за умов введення ККС, підвищення ОТ-індукованої активності – також і за умов застосування КС. Це може свідчити про те, що під впливом екзогенних НФ та, вірогідно, інших трофічних факторів кондиціонованих середовищ відбуваються перебудови скоротливого апарату міометрію та підвищення його чутливості до специфічних стимулів.

Підтвердженням цьому є отримані нами дані про значуще підвищення відносної площі міометрію у тварин, яким вводили КС та ККС, яке реалізувалося в тому числі й за рахунок гіперпластичних процесів, про що свідчить збільшена щільність міоцитів у поперечному шарі міометрію. Імуногістохімічне дослідження експресії актину гладеньких м'язів також підкріплює це припущення, оскільки площа, яку займали позитивно-мічені клітини, також зростала у разі використання КС та ККС. Водночас підвищувалася інтенсивність ІГХ-забарвлення. Низка цих фактів вказує на те, що під впливом кондиціонованих середовищ відбувається не тільки проліферація гладеньких міоцитів, але й підвищення синтезу актину в клітинах.

Відомо, що НФ, зокрема BDNF, індукують проліферацію гладеньком'язових клітин [192–194]. Таким чином, отриманий у наших дослідження ефект можна пояснити мітогенним впливом НФ, які містять секретони від гліальних клітин. Однак не можна випускати з уваги й інші біологічно активні речовини, які є у складі секретонів та мають подібну дію. Подібність біологічних ефектів від середовищ, отриманих як від інтактної, так й кріоконсервованої культур, свідчить про можливість використання кріоконсервування у використаному режимі для довготривалого зберігання клітинної культури клітин зі спінальних гангліїв та продукування секретонів за необхідністю.

Висновки за розділом

1. На основі гістологічного аналізу зрізів матки показано, що секретомі від інтактно́ї та кріоконсервовано́ї культур зі СГ не впливають на морфологічні характеристики ендометрію матки.

2. Внутрішньочеревне введення секретому від інтактно́ї та кріоконсервовано́ї культур гліальних клітин підвищує показники скоротливо́ї активності матки у щурів ПРВ. Після введення КС відбувалося значуще підвищення ОТ-індуковано́ї СІС у 1,1 рази. Після введення ККС відбувалося значуще підвищення спонтанно́ї СІС у 1,3 рази, ОТ-індуковано́ї СІС у 1,2 рази та КСІ-індуковано́ї СІС у 1,4 рази порівняно з контролем відповідного віку.

3. Ефект підвищення скоротливо́ї активності матки у щурів ПРВ реалізується за рахунок збільшення відносно́ї площі міомерію, щільності міоцитів та площі експресії актину гладеньких м'язів міометрію. У тварин РВ при застосування КС та ККС площа позитивного мічення актину підвищувалася у 1,3 та 1,1 рази відповідно. У тварин ПРВ тварин при застосування КС та ККС площа позитивного мічення актину підвищувалася у 2,7 та 2,6 рази відповідно.

4. Вплив середовищ від інтактно́ї та кріоконсервовано́ї культур на скоротливу активність матки був схожим, що дозволяє використовувати технології низькотемпературного зберігання культури для отримання КС без втрати її біологічного ефекту.

Публікації за розділом: [38], [43].

РОЗДІЛ 7. БІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ КОМПОЗИЦІЙ, ОТРИМАНИХ ЗІ СПІНАЛЬНИХ ГАНГЛІЇВ, *IN VITRO* ТА *IN VIVO*

На теперішній час вважається, що терапевтичний ефект від трансплантованих стовбурових клітин пов'язаний з їх секрет омами [12–15, 195]. Зважаючи на це, дуже перспективними є секретоми (кондиціоновані середовища) від культур нейральних клітин, які містять ростові фактори, у тому числі й нейротрофічні. Отже, на наступному етапі роботи було проведено дослідження біологічної активності композицій, отриманих зі спінальних гангліїв, *in vitro* на клітинах лінії PC12 та *in vivo* на самицях щурів РВ та ПРВ.

7.1. Біологічна активність композицій, отриманих зі спінальних гангліїв, *in vitro*

По-перше, у фокусі досліджень була специфічна НФ-подібна дія біологічно активних композицій, яку було протестовано на клітинах лінії PC12.

У 1976 році Greene L. та Tischler A. створили клітинну лінію з трансплантованої феохромоцитоми надниркових залоз щурів, яка мала здібність у відповідь на NGF змінювати свої морфологічні властивості [196]. Відтоді лінія PC12 стала корисною моделлю у нейробиологічних і нейрохімічних дослідженнях.

Автори описували, що під впливом NGF клітини PC12 припиняють розмножуватися та починають поширювати розгалужені відростки, подібні до тих, що утворюються симпатичними нейронами в первинній культурі клітин. Через кілька тижнів впливу NGF на клітини лінії PC12 їхні відростки сягають довжини 500-1000 мкм. Видалення NGF супроводжується дегенерацією відростків протягом 24 годин і відновленням розмноження клітин протягом 72 годин [196].

Пізніше було встановлено, що клітини PC12 мають здатність набувати фенотипових ознак симпатичних нейронів під час культивування у присутності не тільки NGF, але й інших НФ [197–199].

У наших експериментах клітини лінії PC12 без обробки біологічно активними композиціями або NGF мали округлу або багатокутну форму і росли невеликими скупченнями (Рис. 7.1).

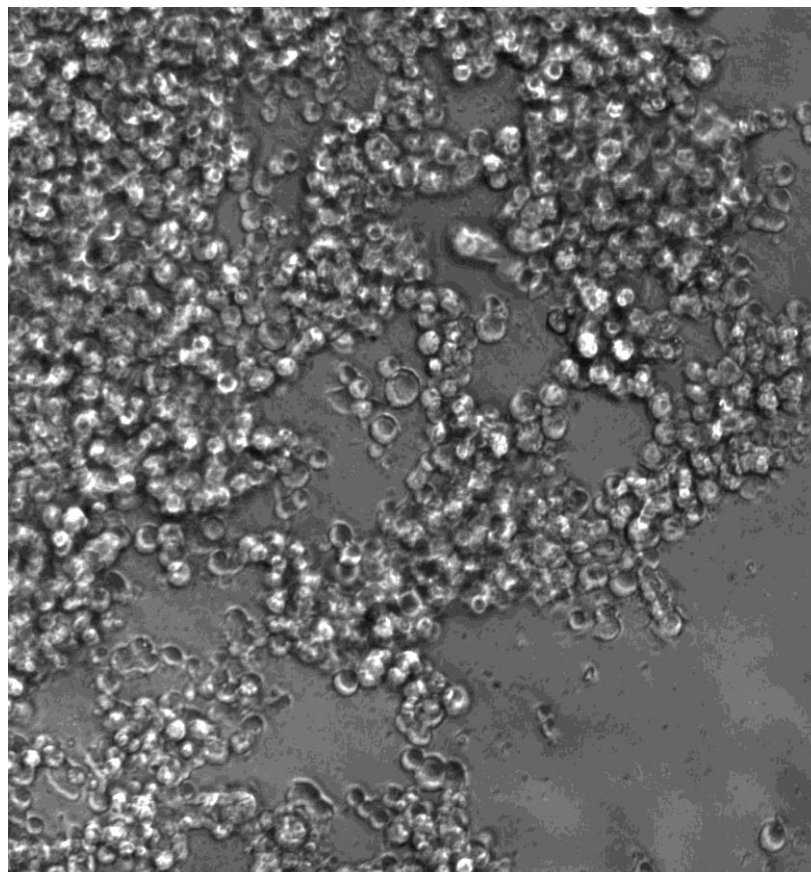


Рис. 7.1. Культура клітин лінії PC12 на 8 добу культивування у базовому середовищі культивування. Прижиттєва фазово-контрастна мікроскопія.

У присутності NGF (позитивний контроль) вже у першу добу частина клітин розпластувалася. Клітини починали трансформацію з округлих у видовжені з формуванням горбочків (Рис. 7.2, а). Спостерігалось збільшення діаметру більшості клітин (Рис. 7.3). Формування довгих відростків у

частини клітин культури спостерігалися з першої доби культивування (7.2, б, в).

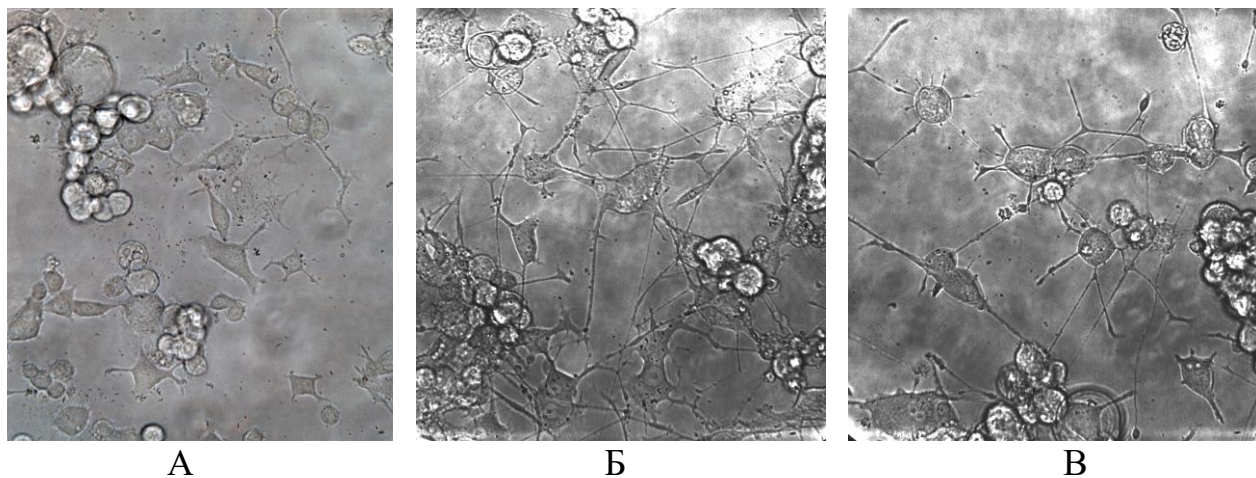


Рис. 7.2. Клітини лінії PC12, культивовані у присутності NGF; А – 50 нг/мл, 1 доба; Б – 50 нг/мл, 5 доба; В – 100 нг/мл, 5 доба. Прижиттєва фазово-контрастна мікроскопія.

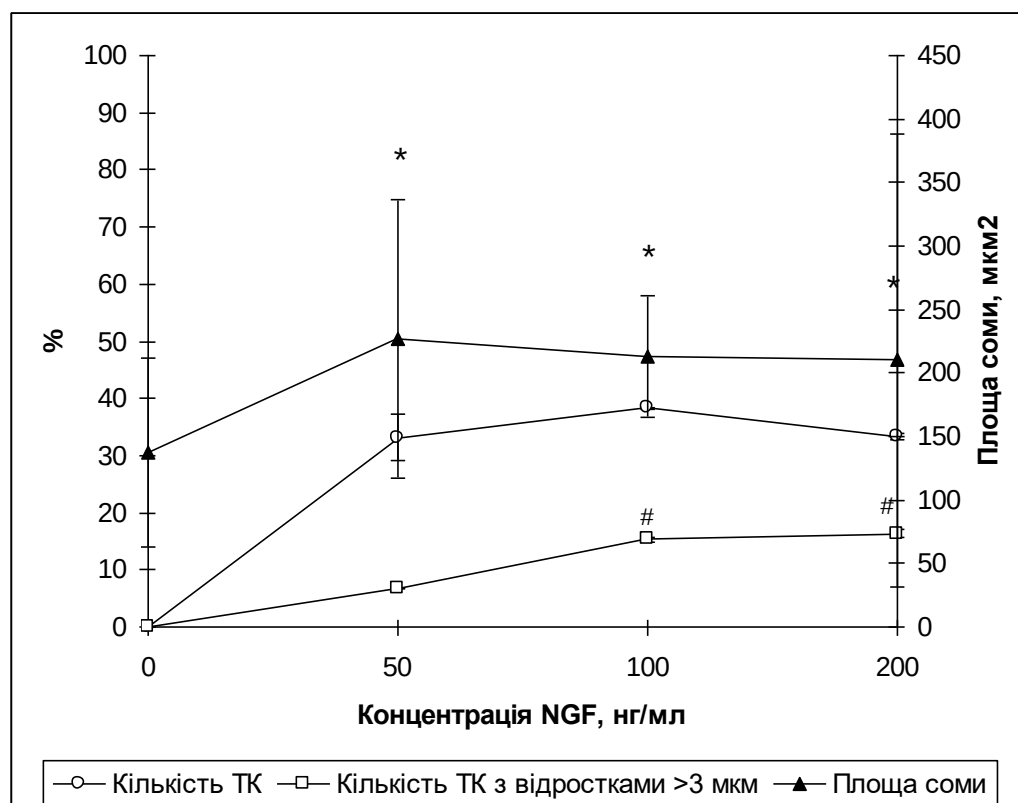


Рис. 7.3. Морфологічні параметри клітин лінії PC12, які були культивовані у присутності різних концентрацій NGF, 1 доба культивування. Дані представлені у вигляді $ME \pm IP$.

Довжина відростків збільшувалася протягом культивування та була більшою у присутності NGF у концентрації 100 та 200 нг/мл (Рис. 7.3). Згодом відростки клітин подовжувалися, рясно розгалужувалися та мали численні розширення.

На фіксованих та забарвлених гематоксиліном/еозином препаратах NGF-обробленої культури (Рис. 7.4), спостерігалися нейрони, які мали крупну сому з світло базofilним ядром та темними щільними ядерцями. У цитоплазмі клітин спостерігалася рясне базofilне забарвлення шорсткого ендоплазматичного ретикулуму у вигляді тілець Ніссля.

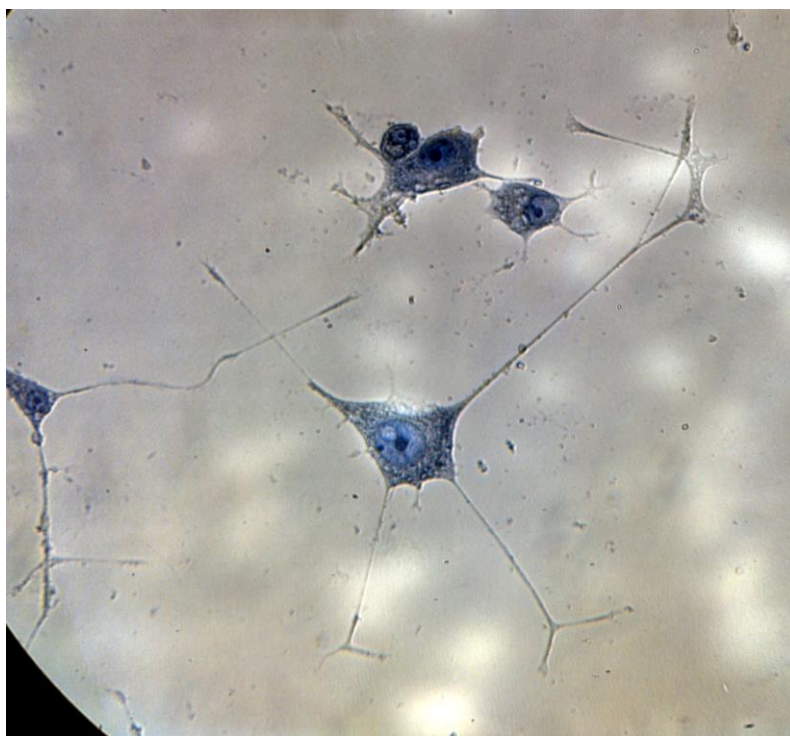


Рис. 7.4. Клітини лінії PC12, культивовані впродовж 5 діб у присутності 50 нг/мл NGF. Забарвлення гематоксиліном та еозином.

За умов культивування у присутності 5 або 10% БС (негативний контроль) не спостерігалася морфологічних змін клітини лінії PC12 (таблиця 7.1). Використання ретиноєвої кислоти як ростового фактору, який сприяє

диференціюванню стовбурових мезенхімальних клітин у нейральному напрямку [200], приводило до збільшення розмірів клітин лінії PC12 порівняно з БС, але утворення розгалужених відростків не спостерігалось. Також у присутності 5 або 10% зКЕСГ відбувалося збільшення розмірів клітин, але без утворення відростків (таблиця 7.1).

У присутності 5 та 10% КС або ККС вже у першу добу спостерігалось формування відростків (Рис. 7.5). Клітини збільшувалися у розмірі (таблиця 7.1). При цьому, за умов підвищеної концентрації КС та ККС (10%) у культурі були добре виражені ознаки нейрональної трансформації клітин, характерні для дії NGF: збільшення розмірів клітин, формування коротких та довгих відростків (таблиця 7.1).

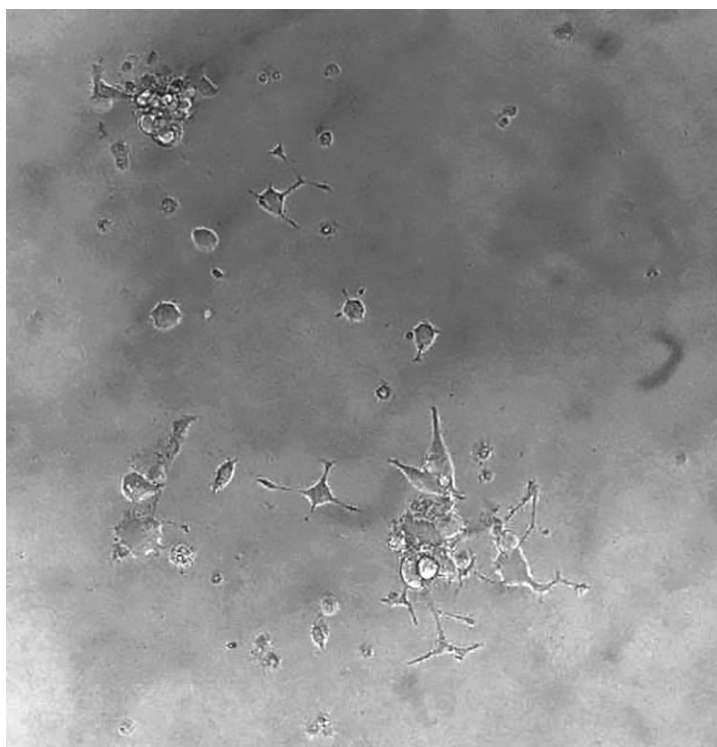


Рис. 7.5. Клітини лінії PC12, культивовані у присутності 10% КС, 1 доба культивування. Прижиттєва фазово-контрастна мікроскопія

Таблиця 7.1. Морфологічні ознаки нейрональної трансформації клітин лінії PC12 за умов культивування у присутності біологічно активних композицій впродовж 24 годин.

	Біологічно активні композиції									
	NGF	РК	зКЕСГ, %		БС, %		КС, %		ККС, %	
			5	10	5	10	5	10	5	10
Кількість ТК, %	33,1 (27,9 ; 32,0)	-	-	-	-	-	34,3 (33,9 ; 35,0)	43,3 (42,8; 43,1)	36,3 (32,3 ; 33,9)	38,3 (33,9 ; 34,1)
ТК з відростками <3 мкм	24,7 (21,4 ; 23,1)	-	-	-	-	-	27,6 (19,6 ; 29,6)	31,6 (30,6; 31,1)	24,6 (22,5 ; 24,4)	24,4 (18,9 ; 19,3)
ТК з відростками >3 мкм	6,7 (5,6; 5,7)	-	-	-	-	-	5,9 (5,7; 6,4)	12,9 (12,2; 12,6)	11,9 (10,5 ; 10,9) #	15,3 (14,3 ; 14,7) #
Площа соми, мкм ²	227,0 (141,7; 351,7) *	180,0 (132,0; 271,3) *	204,0 (151,2; 366,8) *	234,0 (141,3; 330,2) *	131,3 (103,0; 171,2)	134,5 (126,0; 165,2)	210,0 (126,3; 311,0) *	210,4 (143,1; 321,0) *	209,5 (169,7; 277,8) *	213,1 (164,5; 213,0) *

Примітки: * – відмінності значущі порівняно з 5% БС, $p < 0,05$; ТК – трансформовані клітини (з відростками); # – відмінності значущі порівняно з

інтактною культурою клітин, $p < 0,05$; NGF у концентрації 50 нг/мл; РК – ретиноева кислота у концентрації 10^{-6} моль.

Таким чином, НФ-подібна активність була виявлена у фракціонованих кондиціонованих середовищах, отриманих від інтактної та кріоконсервованої культур клітин зі спінальних гангліїв. При цьому, досягнутий ефект нейрональної трансформації клітин PC12 у присутності КС та ККС був схожий на той, що спостерігався у присутності NGF у концентрації 50 нг/мл. Однак не можна стверджувати, що нейрональна трансформація клітин лінії PC12 відбувається тільки за рахунок NGF. Раніше було встановлено, що інші НФ теж сприяють нейрональної трансформації клітин лінії PC12 [197–199]. Отже, можна стверджувати, що дія секретомів від культури клітин зі СГ обумовлена НФ, які входять до їх складу.

7.2. Біологічна активність композицій, отриманих зі спінальних гангліїв, *in vivo*

Метою досліджень цього етапу роботи було з'ясування стану репродуктивної функції самок щурів РВ та ПРВ при введенні зКЕСГ, БС, КС та ККС.

Відомо, що процес репродуктивного старіння щурів розвивається поступово. У щурів ПРВ спостерігається перехід від регулярних ЕЦ до іррегулярних, за якими йде постійна течка, потім стійкий дієструс і, нарешті, анєструс [155]. Однак щодо тривалості періодів ІЕЦ та константного еструсу у щурів ПРВ є певні розбіжності. Наприклад, за даними LeFevre J. приблизно у 50% самиць лінії Sprague-Dawley не спостерігається фази константного еструсу, а тільки ІЕЦ [155, 201]. Крім того, наявність періоду константного еструсу у великій мірі залежить від фізико-хімічних факторів навколишнього середовища (забруднення ксенобіотиками, тривалість світлового дня тощо) [201]. Введення біологічно активних композицій має впливати на паттерни

репродуктивного старіння самиць щурів та відображатися на репродукційній функції загалом.

На попередніх етапах нашої роботи було показано, що біологічно активні композиції, отримані зі спінальних гангліїв, мають вплив як на фолікулярний профіль яєчників (активація виходу примордіальних фолікулів з дормантного стану), так й на скоротливу активність матки (підвищення параметрів скоротливої активності матки) щурів обох вікових груп. У зв'язку з цим, необхідно було перевірити, як такий вплив відображається на реалізації репродуктивної функції самиць.

З огляду на вищесказане, на наступному етапі роботи було проведено експерименти *in vivo* з запліднення щурів РВ та ПРВ. Біологічно активні композиції (зКЕСГ, КС, ККС) та ФР (контроль на розчин-носій) вводили щурам, після чого підсаджували до самців на 10 діб. Результати експерименту представлено у таблицях 7.2 та 7.3.

Таблиця 7.2. Показники репродуктивної функції самиць щурів РВ за умов введення біологічно активних субстанцій

Показники	ФР	зКЕСГ	КС	ККС
Середня маса тіла самиці, г	200 (192; 207)	210 (205; 210)	200 (200; 200)	220 (205; 225)
Середня тривалість вагітності, діб	21 (21; 21,5)	21 (20,5; 21,5)	21 (20,5; 22)	21 (20; 21)
Запліднюваність, %	89,8	92,5	81,4	82,3
Середня кількість народженого приплоду	6 (3; 9)	10 (7; 11)	10 (5; 10)	6 (3; 8)

Примітка: * – відмінності значущі порівняно з введенням ФР, $p < 0,05$

Таблиця 7.3. Показники репродуктивної функції самиць щурів ПРВ за умов введення біологічно активних субстанцій

Показники	ФР	зКЕСГ	КС	ККС
Середня маса тіла самиці, г	290 (280; 300)	260 (255; 280)	300 (295; 305)	260 (260; 255)
Середня тривалість вагітності, діб	21 (21; 21)	-	21 (21; 22)	21 (20; 21,5)
Запліднюваність, %	20,5	0	66,8*	70,1*
Середня кількість народженого приплоду	0 (0; 1)	0 (0; 0)	8 (4; 9,5)*	3 (1,5; 5,5)*

Примітка: * – відмінності значущі порівняно з введенням ФР, $p < 0,05$

З даних, представлених у таблицях, випливає, що введення зКЕСГ, КС та ККС суттєво не впливає на показники репродуктивної функції самиць щурів РВ. Помітно також, що самиці ПРВ не були спроможні дати потомство у контролі (введення ФР) та у групі з введенням зКЕСГ. Щодо введення КС та ККС самицям ПРВ було отримано у середньому 66-70% запліднюваності тварин. Це в цілому відповідає отриманим даним при вивченні впливу секретомів культур клітин зі СГ на морфофункціональні показники яєчників та матки щурів ПРВ, які були представлені у попередніх розділах. Зрозуміло, головним при цьому є ефект активації примордіальних фолікулів у яєчниках щурів ПРВ, що за сприятливих для запліднення умов приводить до отримання потомства. Однак цей ефект не може бути тривалим внаслідок виснаження оваріального резерву у самиць ПРВ.

Відомо, що сучасні протоколи індукції овуляції включають використання низки речовин, які підвищують рівні гонадотропінів. Кломіфен цитрат вибірково зв'язується з рецепторами до естрогену в гіпоталамусі, блокуючи взаємодію з ними гормону. Гіпоталамус реагує на відсутність

зв'язування естрогену вивільненням гонадотропін-рилізінг гормону (GRH), який стимулює гіпофіз секретувати більше ФСГ та ЛГ. Високі рівні ФСГ та ЛГ у свою чергу активують розвиток фолікулів гормонозалежних стадій [202]. Для цього ж використовуються інші антиестрогенні препарати тамоксифен (вибірково зв'язується з рецепторами естрогену, робляючи як естрогенну, так і антиестрогенну дію) та летрозол (блокує перетворення андрогенів в естроген) [203]. З цією ж метою застосовують гонадотропіни та їх синтетичні аналоги, що опосередковано збільшує одночасно ФСГ і ЛГ. Метформін соло або у комбінації з антиестрогенами також збільшує частоту овуляції [204]. Отже, на теперішній час стратегія підвищення овуляції шляхом стимуляції фолікулів гормонозалежних стадій є основною у ДРТ. Терапія передчасної недостатності яєчників за рекомендаціями ESHRE також включає використання естрогенів, гонадотропінів та кортикостероїдів як потенційних засобів для збільшення ймовірності настання вагітності [205]. Однак, як вказується, на цей час немає методів лікування, які надійно підвищують активність яєчників, швидкість овуляції та можливість зачаття. Таким чином, секретом з НФ-подібною активністю є можливим кандидатом на роль стимулятора оваріальної функції на гормоно незалежних стадіях розвитку фолікулів.

Висновки

1. За допомогою специфічної реакції клітин лінії PC12 доведено НФ-подібну біологічну дію кондиціонованих середовищ, отриманих від інтактної та кріоконсервованої культур клітин зі спінальних гангліїв, яка проявлялася у стимуляції нейротрансформації клітин (збільшення розмірів клітин, формування розгалужених відростків). Кріоекстракт спінальних гангліїв не показав НФ-подібну біологічну активність.

2. Біологічна активність композицій, отриманих зі спінальних гангліїв, *in vivo*, залежить від репродуктивного віку самиць щурів. Введення КС та ККС не впливає на показники репродуктивної функції самиць щурів РВ, тоді

як приводить до статистично значущого підвищення запліднюваності та середньої кількості народженого приплоду у щурів ПРВ.

Публікації за розділом: [45].

УЗАГАЛЬНЕННЯ ТА ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Зважаючи на те, що основні ефекти клітинної терапії реалізуються завдяки секретованим біологічно активним речовинам [12], сучасний підхід полягає у застосуванні секретомів від культур клітин як унікальних терапевтичних засобів [13–15]. Секретом від культури гліальних клітин зі спінальних гангліїв серед інших біологічно активних речовин містить НФ [29, 30], тому вони мають неабиякий терапевтичний потенціал у регенеративній та відновлювальній медицині. Взагалі, в організмі секретони гліальних клітин відіграють важливу роль у опосередкуванні різних біологічних процесів за умов норми та патології. Наприклад, вони ініціюють внутрішньоклітинні сигнальні каскади, що призводять до змін у експресії генів і індуюють проліферацію, диференціацію, міграцію, секрецію тощо. Нещодавно створена База Gliome містить аналіз даних щодо секретомів гліальних клітин ЦНС та ПНС, які були вивчені на теперішній час [206]. У Базі накопичено інформацію про 3293 білки, які виділяються клітинами глії та мають різні функції [206].

За останні десятиліття у моделях на тваринах було отримано багатообіцяючі результати лікування захворювань з використанням НФ. Наприклад, ін'єкції BDNF та CNTF покращували рухову функцію у мишей з моделлю бічного аміотрофічного склерозу [207, 208]. Внутрішньомозкове введення GDNF у гризунів і мавп із симптомами хвороби Паркінсона продемонструвало підвищення рівня дофаміну та покращення рухової активності [209]. Позитивні результати, отримані у доклінічних дослідженнях, стимулювали проведення багатоцентрових клінічних випробувань НФ [210–214].

Нейротрофічним факторам належить особлива роль у розвитку та функціонуванні жіночої репродуктивної системи. Вони мають важливе значення для розвитку та формування фолікулярного профілю яєчників,

приймають участь у процесах виходу примордіальних фолікулів яєчників у фазу подальшого росту та є важливим фактором росту фолікулів у негонадотропін-залежній фазі [26, 68–72, 78, 85–87]. З віком спостерігається з одного боку інволютивні зміни жіночої репродуктивної системи, а з іншого – трансформація рецептор-опосередкованих шляхів сигналіngu [94]. Це призводить до порушення природних механізмів регуляції та виникнення патологій репродукції.

Не тільки яєчники потерпають вікові зміни. Попередні експериментальні дослідження доводять, що профіль скоротливої активності матки змінюється з віком [177, 178, 214]. У гладеньком'язових клітинах матки теж виникають структурні перебудови, асоційовані з віком. У гладеньком'язових клітинах з віком знижується експресія білків, асоційованих із скороченням [216–218]. У міометрії матки змінюється експресія генів, які кодують іонний транспорт, метаболізм стероїдних гормонів і рецепторів до утеротоніків [219]. У жінок з підвищенням віку знижується сила, однак підвищується вірогідність багатофазних спонтанних скорочень міометрію, що вказує на дискоординацію скоротливої активності матки [177, 178]. У матці 24-місячних щурів утричі знижується амплітуда та сила спонтанних скорочень, однак підвищується чутливість до індукторів скоротливої активності [218].

Нейротрофічні фактори відіграють важливу роль у підтримці скоротливої функції матки протягом всього репродуктивного періоду життя [185, 220, 221] та беруть участь у регуляції проліферації, міграції та скоротливої здатності гладеньком'язових клітин [180, 192].

Враховуючи вищесказане, у роботі було використано низку біологічно активних речовин, отриманих зі СГ, які містять НФ. Використані у роботі біологічно активні композиції було обрано за наступними міркуваннями. Загальний КЕСГ використовували як тотальний препарат усіх водорозчинних речовин СГ, тоді як фКЕСГ з молекулярною масою до 30 кДа – як тотальний препарат з речовинами з молекулярною масою діапазону, в який входять НФ. Більш сфокусованими на вмісті НФ мали бути фракціоновані кондиціоновані

середовища (з молекулярною масою до 30 кДа) від культури клітин зі СГ, яка в основному складалася з сателітних гліальних клітин.

У роботі були встановлені вікові зміни яєчників щурів, які включали підвищення фази дієструсу у структурі ЕЦ (на 4% для 4-денного циклу та на 10% для 5-денного циклу); спостерігалася підвищення середньої тривалості ЕЦ з 4 до 5 діб; підвищення кількості діб з фазою дієструсу у структурі ЕЦ (на 4% для 4-денного ЕЦ та на 10% для 5-денного ЕЦ); підвищення кількості іррегулярних ЕЦ у 4,6 рази; зменшення сумарної кількості фолікулів та жовтих тіл у яєчниках на 13,2%, підвищення кількості фолікулярних кіст. Вікові зміни матки щурів включали зниження сили ізометричного скорочення (СІС): базальна СІС знижувалася на 26,7%; КСІ-індукована СІС – на 19,7%; ОТ-індукована СІС – на 23,1% порівняно з інтактним контролем РВ. Вищевказані зміни САМ самиць щурів ПРВ відбувалися за рахунок зменшення відносної площі гладеньком'язових клітин міометрію, визначених імуногістохімічно за експресією маркерів актину.

На наступному етапі було застосовано низку біологічно активних композицій (зКЕСГ, фКЕСГ, КС та ККС) зі СГ для внутрішньочеревного введення експериментальним тваринам ПРВ та відстежено їх основні ефекти на репродуктивну систему.

Результати досліджень свідчать про можливість активації примордіальних фолікулів за рахунок НФ, що містяться у секретомативних та кріоконсервованих культурах клітин зі СГ. По-перше, введення секретомативних від культур зі СГ (КС та ККС) тваринам ПРВ підвищувало середню кількість діб з фазою еструсу (ФЕ) у структурі ЕЦ. При цьому, більш вираженим ефект був від використання секретомативних від кріоконсервованої культури клітин (показник підвищувався після введення ККС у 2 рази проти підвищення у 1,3 рази після введенням КС).

По-друге, отримані дані вказують на те, що введення секретомативних від культур клітин зі СГ зменшувало сумарну кількість примордіальних та

первинних фолікулів у яєчниках тварин обох вікових груп. Це свідчило про стимулюючий вплив середовищ на вихід фолікулів з дормантного стану.

Схожий ефект було встановлено при застосуванні загального КЕСГ та його низькомолекулярної фракції. Підвищення кількості атретичних фолікулів за умов застосування усіх використаних біологічно активних композицій показує, що в результаті активації примордіальних фолікулів та вступу їх на шлях подальшого розвитку, виникає надлишок антральних фолікулів, який пізніше піддається атрезії.

По-третє, було встановлено відновлення балансу гонадотропінів після введення щурам ПРВ секретомів від культур клітин зі СГ. З віком у тварин цієї групи відбувалося зниження співвідношення ЛГ/ФСГ у 4 рази порівняно з щурами РВ. Введення секретомів приводило до підвищення показника ЛГ/ФСГ у 6,5 рази при введенні КС та у 14 разів при введенні ККС. Потрібно знов відзначити, що ефект був більш вираженим за умов введення секретому від криоконсервованої культури клітин.

Все вищенаведене говорить про те, що секретоми від культури клітин зі СГ є потужними модуляторами фолікулогенезу у яєчниках, особливо у пізньому репродуктивному віці. Механізм цього феномену, вірогідно, полягає в тому, що секретоми є збагаченими на NGF, NT-3 та GDNF, які приймають участь у регуляції переходу примордіальних фолікулів у первинні [24, 25].

Ефекти від введення кріоекстракту та секретомів були встановлені не тільки на морфофункціональні характеристики яєчників, але й на скоротливу активність матки щурів.

Застосування зКЕСГ мало різноспрямовану дію в залежності від віку експериментальних тварин. Воно не впливало на САМ щурів РВ, але стимулювало її у тварин ПРВ. Порівняно з інтактним контролем, застосування зКЕСГ приводило до підвищення ОТ-індукованої частоти скорочень у 1,25 рази, ОТ-індукованої амплітуди скорочень у 1,06 рази, КСІ-індукованої СІС у 1,54 рази, ОТ-індукованої СІС у 1,53 рази.

Даний ефект спостерігався на фоні збереження нормальної гістологічної структури ендометрію та міометрію.

Введення фКЕСГ також мало різноспрямовану дію на показники САМ в залежності від віку експериментальних тварин. Порівняно з інтактними тваринами РВ введення фКЕСГ не змінювало частоту та амплітуду скорочень, але пригнічувало КСІ- та ОТ-індуковану СІС на 33,9% та 39,9% відповідно. У щурів ПРВ введення фКЕСГ збільшувало КСІ-індуковану та ОТ-індуковану амплітуду скорочень у 1,2 та 1,16 рази відповідно; КСІ-індуковану СІС у 1,08 рази.

За введення секретомів від культур клітин зі СГ тваринам ПРВ також відбувалося значуще підвищення САМ. Після введення КС відбувалося значуще підвищення ОТ-індукованої СІС у 1,1 рази. Після введення ККС відбувалося значуще підвищення спонтанної СІС у 1,3 рази, ОТ-індукованої СІС у 1,2 рази та КСІ-індукованої СІС у 1,4 рази порівняно з контролем відповідного віку.

Периферична іннервація матки представлена чутливими, парасимпатичними та симпатичними нейронами, які регулюють скорочувальну активність гладеньких м'язів, наповнення мікроциркуляторного русла, секрецію залоз і відповідають за передачу інформації у центральну нервову систему. Відомо, що фізіологічні перебудови іннервації матки відбуваються протягом всього репродуктивного періоду життя і, насамперед, під час вагітності [177, 184, 185, 220]. Регуляція денервації і регенерації нервових закінчень у матці знаходяться під контролем естрогенів та НФ [184, 185]. Встановлено, що НФ та НФ-подібні фактори синтезуються безпосередньо в ендометрії й міометрії матки [185, 222]. Крім того, в органі широко експресовані рецептори до НФ [92], а у тварин із генетично-детермінованим дефектом цього пулу рецепторів порушується фізіологічний процес ремоделювання іннервації матки [185]. Якщо нейропластичність матки та реалізація її нормальної скорочувальної функції залежить зокрема й від НФ, то можна припустити, що отриманий

ефект підвищення САМ пов'язаний зі збільшенням рівня НФ за рахунок їх екзогенного введення у складі кріоекстракту та секретомів від культур клітин зі СГ.

За допомогою ІГХ мічення та морфометричного аналізу у наших експериментах було з'ясовано, на чому базується ефект збільшення САМ після введення секретомів. Виявилося, що ефект реалізується за рахунок підвищення відносної площі міомерію, щільності міоцитів та площі експресії актину гладеньких м'язів у матці тварин ПРВ. У інтактних тварин ПРВ відбувалося зменшення забарвлення антитілами до актину гладеньких м'язів у 1,5 рази порівняно з РВ. Тоді як застосування секретомів у тварин цієї вікової групи приводило до підвищення площі позитивного мічення актину у 2,7 (КС) та 2,6 (ККС) рази.

Ще одним можливим шляхом реалізації отриманого ефекту може бути підвищення експресії рецепторів до специфічних активаторів САМ, зокрема ОТ. Рецептор до ОТ – це трансмембранний білок, який належить до суперродини рецепторів, асоційованих із G-білком (GPCR) [182, 183, 223]. Під час зв'язування ОТ із рецептором одночасно активуються декілька шляхів, які ведуть до появи САМ. Основним є процес передачі сигналу через систему G-білок – фосфоліпаза C – інозитол 1,4,5-трифосфат (InsP3). Крім того, сигнал передається через MAP- та Rho-кінази, що сприяє не тільки скороченню міометрію, але й збільшенню продукції простагландинів. Дослідження М. Elmes та співавт. [218] свідчать, що вікові зміни САМ стосуються, насамперед, G-білок-асоційованої стимуляції та скорочення. Підвищення показників ОТ-індукованої САМ у щурів ПРВ у наших експериментах може свідчити про підвищення чутливості міометрію з віком до утеротоніків. Даний факт узгоджується з результатами роботи М. Elmes та співавт. [218], які встановили більш високу чутливість матки старих щурів до фенілефріну та карбахолу.

Загальновідомо, що у процесі кріоконсервування клітини піддаються обробці кріопротектором та охолодженню, в результаті чого спостерігається

зниження їх життєздатності, модифікація проліферативної та функціональної активності. Як було показано Алі та спіавт. [144] за використаного режиму кріоконсервування з 7,5% кріопротектору ДМСО зберігається близько 90% гліальних клітин у культурі. Біологічний ефект секретомів від культур зі СГ на вивчені показники був схожим, що дозволяє використовувати технології низькотемпературного зберігання культури для отримання секретому без втрати його біологічного ефекту.

Отже, на попередніх етапах нашої роботи було показано, що кріоекстракт та секретомі зі спінальних гангліїв впливають на фолікулярний профіль яєчників та САМ щурів. У зв'язку з цим, необхідно було перевірити, як такий вплив відображається на реалізації репродуктивної функції. Зважаючи на це, на наступному етапі роботи було проведено експерименти *in vivo* з запліднення щурів РВ та ПРВ.

Самиці ПРВ не давали потомство у групі контролю (введення ФР) та у групі з введенням зКЕСГ. У групах тварин цього ж віку з введенням секретомів від культур клітин зі СГ було отримано потомство. При цьому, за використання секретому від кріоконсервованої культури середня запліднюваність тварин була у середньому 70%, тоді як за використання секретому від інтактної – 66,8%.

Чи можна було трактувати отримані ефекти як ті, що реалізуються за рахунок саме нейротрофічних факторів? Для відповіді на це запитання було проведено експерименти з клітинною лінією PC12, яка має специфічні властивості змінювати морфологію у відповідь на присутність НФ. У наших експериментах НФ-подібна активність була виявлена у секретомах, отриманих від інтактної та кріоконсервованої культур клітин зі СГ. Кріоекстракт спінальних гангліїв не показав НФ-подібну біологічну активність за умов культивування лінії PC12.

Вірогідно, це пов'язано з тим, що у складі КЕСГ (загального або фракціонованого) НФ присутні у невеликій кількості. Підвищення ефективності НФ-подібної дії відбувається після культивування та

кріоконсервування клітин зі СГ. Це означає, що під час культивування спостерігається експансія клітин, які секретують НФ. На роль цих клітин, вочевидь, претендують сателітні гліальні клітини, які виділяють біологічно активні речовини, включаючи НФ, АТФ, глутамат, гліальний фібрилярний кислий білок (GFAP), цитокіни, TNF, IL-1 β [29, 30, 206]. Доречи, підвищення секреції трофічних та інших регуляторних факторів сателітними гліоцитами зазвичай відбувається у сенсорних гангліях після ушкодження нервів чи запалення [224]. При цьому відбувається проліферація сателітних гліоцитів [225] та зміна в них експресії (upregulation або downregulation) більше 300 генів, включаючи upregulation генів CNTFR та NTRK2, які є рецепторами до циліарного нейротрофіну та BDNF [226]. З точки зору нормальної фізіології, ізоляція клітин зі СГ, яка включає етапи вилучення гангліїв, обробку ферментативним розчином тощо, має привести до активації подібних змін у сателітних гліоцитах. Тобто у культурі клітин, вірогідно, відбувається підвищення секреції сигнальних та регуляторних речовин ними за аналогією з пошкодженням СГ. Зважаючи на це, секретом від культури клітин зі СГ на відміну від КЕСГ є більш збагаченими на біологічно активні композиції. Вірогідно з цим пов'язано те, що секретом виявилися більш ефективними за своєю біологічною дією, ніж КЕСГ.

Цікаво що, підвищення вивчених морфофункціональних показників репродуктивної системи спостерігалось за умов використання кріоконсервованої культури порівняно з інтактною. Це свідчить про те, що кріоконсервування (заморожування-відігрів та пов'язані з цим процедури відкріплення клітин та пересів) є додатковим фактором, який активує клітинну культуру до секреції речовин. Отже, секретом від культури клітин зі СГ не тільки не втрачає свої біологічної активності після кріоконсервування, а навпроти у деяких аспектах підвищує її. Отримані результати свідчать про підвищення НФ-подібної біологічної дії секретомів, отриманих від кріоконсервованої культури клітин зі спінальних гангліїв у порівнянні з інтактною культурою.

Узагальнюючи отримані дані, можна описати корегуючий механізм дії кріоекстракту та секретомів від культур клітин зі СГ на репродуктивну систему самиць ПРВ як той, що представлений на наступній схемі.

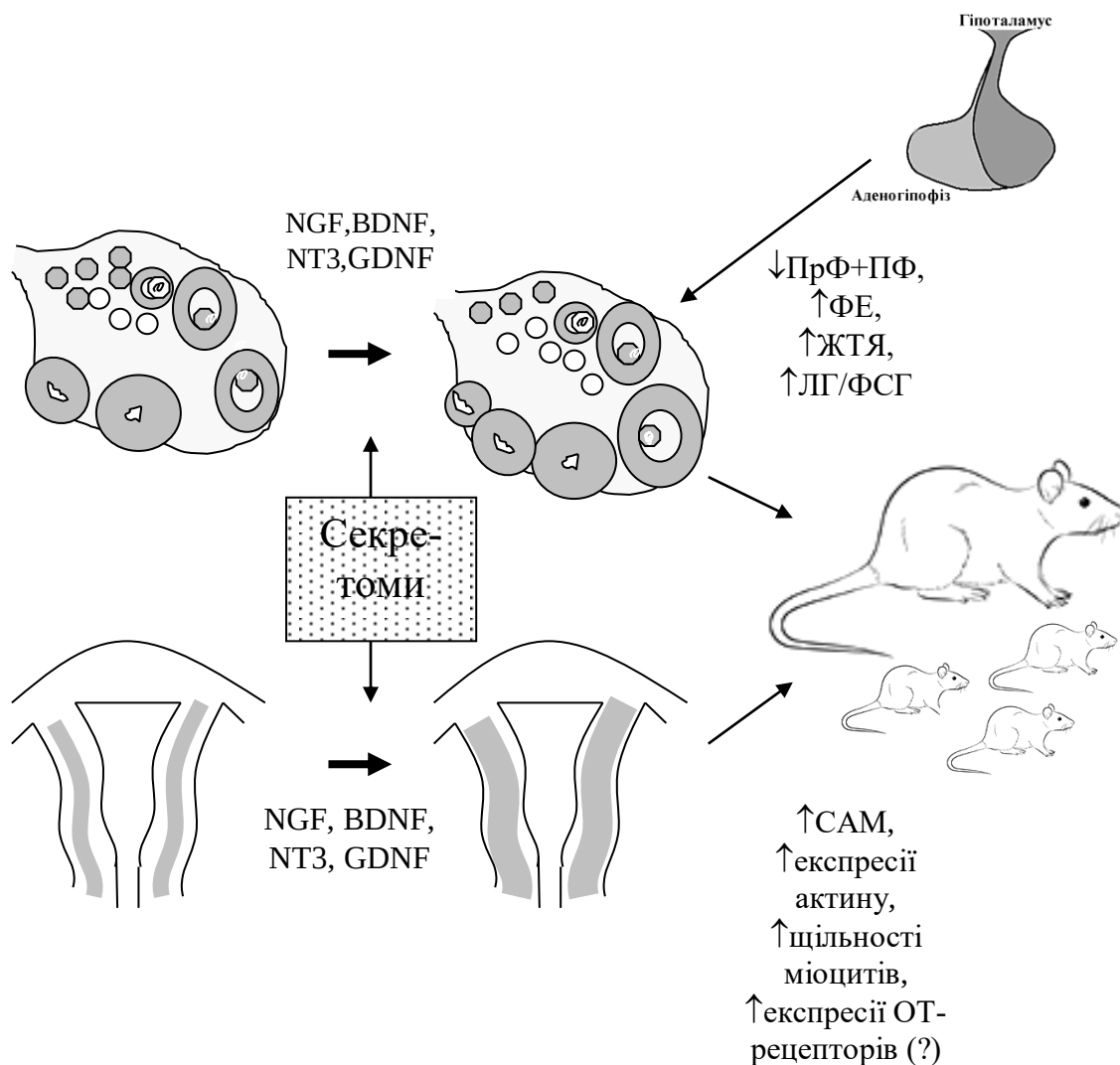


Схема. Вірогідний механізм дії кріоекстракту та секретомів від культур клітин зі СГ на репродуктивну систему самиць ПРВ.

Стимуляція пулу примордіальних фолікулів за рахунок кріоекстракту або секретому приводить до підвищення кількості фолікулів гормоно залежних стадій розвитку у яєчниках самиць ПРВ. Це у свою чергу на фоні нормалізації рівнів ЛГ та ФСГ веде до підвищення кількості овуляцій.

Побічним явищем є зростання кількості атретичних фолікулів, оскільки не всі фолікули досягають кінцевих стадій зрілості. Нормалізація скоротливої функції матки самиць ПРВ відбувається за рахунок підвищення гіперплазії та гіпертрофії гладеньком'язових клітин та, можливо, підвищення експресії рецепторів до окситоцину.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі представлено теоретичне узагальнення та нове експериментальне вирішення наукового завдання, спрямованого на активацію процесів виходу примордіальних фолікулів яєчників з дормантного стану та нормалізацію скоротливої активності матки, яка знижується з віком, за рахунок введення біологічно активних композицій з нейротрофічними факторами, отриманих зі спінальних гангліїв (кріоекстракт, секретомі від інтактної та кріоконсервованої культур клітин).

1. Встановлені вікові зміни яєчників та матки самиць щурів, які включали: підвищення діб з фазою дієструсу у структурі ЕЦ (на 4% для 4-денного циклу та на 10% для 5-денного циклу); зменшення загальної кількості фолікулів та жовтих тіл у яєчниках на 13%; зниження сили спонтанного, КСІ- та ОТ-індукованого скорочення матки відповідно на 26,7%; 19,7% та 23,1% порівняно з інтактним контролем РВ. Зменшення скоротливої активності матки відбувалося за рахунок зниження відносної площі гладеньком'язових клітин міометрію, визначених імуногістохімічно за експресією маркерів актину.

2. Введення кріоекстракту та секретомів від інтактної та кріоконсервованої культур клітин зі СГ стимулює вихід примордіальних фолікулів з дормантного стану та подальший розвиток фолікулів у яєчниках тварин репродуктивного та пізнього репродуктивного віку. Водночас відбувається перебудова інтраоваріального фолікулярного пулу зі зменшенням кількості фолікулів гормоно-незалежних стадій розвитку (примордіальних та первинних) та підвищенням кількості атретичних фолікулів.

3. Застосування кріоекстракту та секретомів від інтактної та кріоконсервованої культур клітин зі СГ підвищують скоротливу активність

матки тварин пізнього репродуктивного віку. За введення секретомів від культур клітин зі СГ тваринам ПРВ відбувалося підвищення скоротливої активності матки до значень інтактного контролю щурів РВ. Активуючий ефект був більш виражений за умов використання секретому від кріоконсервованої культури клітин, коли підвищувалися спонтанна та ОТ-індукована у 1,2 рази, KCl-індукована у 1,3 рази сила ізометричного скорочення. Встановлений ефект реалізується за рахунок збільшення відносної площі міомерію, щільності міоцитів та площі експресії актину гладеньких м'язів у матці тварин ПРВ.

4. Застосування секретомів від культур клітин зі СГ сприяють відновленню балансу гонадотропінів у щурів пізнього репродуктивного віку. Підвищення показника ЛГ/ФСГ спостерігалось у 6,5 рази при введенні секретому від інтактної культури клітин та у 14 разів при введенні секретому від кріоконсервованої культури клітин.

5. Введення секретомів від культур клітин зі СГ сприяло реалізації репродуктивної функції у щурів пізнього репродуктивного віку. Порівняно з інтактними тваринами ПРВ, які не давали потомство, у тварин за введення секретому від інтактної культури клітин середня запліднюваність була 66,8%, тоді як за введення секретому від кріоконсервованої культури клітин – 70%.

6. У експериментах з клітинною лінією PC12, яка має властивості до нейротрансформації у присутності нейротрофічних факторів, НФ-подібна активність була виявлена у секретах від інтактної та кріоконсервованої культур клітин зі спінальних гангліїв, але не у кріоекстракті зі спінальних гангліїв.

7. Кріоконсервування культури клітин зі СГ у кріозахисному середовищі з 7,5% кріопротектору ДМСО та 25% фетальної телячої

сироватки за двохетапною програмою (швидкість охолодження $1^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ до -40°C , потім занурення у рідкий азот) не призводить до втрати біологічного ефекту її секретому на жіночу репродуктивну систему.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Хміль СВ, Корда ІВ, Микула РП, Хміль МС. Вік пацієнток як один із факторів ризику невдалих спроб у циклах екстракорпорального запліднення. *Вісник соціальної гігієни та організації охорони здоров'я України*. 2017; 74(4): 110-115. Available from: <file:///C:/Users/1/Downloads/admin,+20.pdf>.
2. Жабченко ІА. Сюдмак О.Р. Проблеми відкладеного дітонародження: порушення фертильності у жінок старшого репродуктивного віку та методи їх корекції. *Здоров'я України*. 2019; – 35(3):12-14. Available from: <https://health-ua.com/article/45002-problemi-vdkladenogo-dtonarodzhennya--porushennya-fertilnost-uzhnok-starsho>.
3. Shirasuna K, Iwata H. Effect of aging on the female reproductive function. *Contracept Reprod Med*. 2017; 2:23. doi: 10.1186/s40834-017-0050-9.
4. Jirge PR. Poor ovarian reserve. *J Hum Reprod Sci*. 2016; 9(2):63-69. doi: 10.4103/0974-1208.183514.
5. Singh K, Dewani D. Recent advancements in in vitro fertilisation. *Cureus*. 2022;14(10):e30116. doi: 10.7759/cureus.30116 .
6. Kushnir VA, Smith GD, Adashi EY. The future of IVF: The new normal in human reproduction. *Reprod Sci*. 2022;29(3):849-856. doi: 10.1007/s43032-021-00829-3.
7. Christianson MS, Segars J. Unleashing the potential of stem cells to help poor responders. *Fertil Steril*. 2018;110(3):410-411. doi: 10.1016/j.fertnstert.2018.06.011.
8. Herraiz S, Romeu M, Buigues A, Martínez S, Díaz-García C, Gómez-Seguí I, Martínez J, Pellicer N, Pellicer A. Autologous stem cell ovarian transplantation to increase reproductive potential in patients who are poor responders. *Fertil Steril*. 2018;110(3):496-505.e1. doi: 10.1016/j.fertnstert.2018.04.025.

9. Na J, Kim GJ. Recent trends in stem cell therapy for premature ovarian insufficiency and its therapeutic potential: a review. *J Ovarian Res.* 2020;13(1):74. doi: 10.1186/s13048-020-00671-2 .
10. Прокопюк ВЮ, Прокопюк ОС, Мусатова ІБ, Сорокіна ІВ, Логінова ОО, Сомова КВ. Корекція інволютивних змін репродуктивної системи самиць старих щурів імплантацією кріоконсервованих фрагментів плаценти. *Фізіол. журн.*, 2018; 64(4): 74-81. Available from: https://fz.kiev.ua/journals/2018_V.64/2018_4/4-2018-74-81.pdf;
11. Prokopyuk VYu, Karpenko VG, Shevchenko MV, et al. Experience in clinical application of cryopreserved placental derivatives: cells, tissue, membranes, extract, and cord blood serum. *Innov Biosyst Bioeng.* 2020; 4 (3): 168-176. doi: 10.20535/ibb.2020.4.3.215215.
12. Teixeira FG, Carvalho MM, Sousa N, Salgado AJ. Mesenchymal stem cells secretome: a new paradigm for central nervous system regeneration? *Cell Mol Life Sci.* 2013; 70(20):3871-3882.
13. Vizoso FJ, Eiro N, Cid S, Schneider J, Perez-Fernandez R. Mesenchymal stem cell secretome: Toward cell-free therapeutic strategies in regenerative medicine. *International Journal of Molecular Sciences.* 2017; 18(9):1852. <https://doi.org/10.3390/ijms18091852> .
14. El Moshy S, Radwan IA, Rady D, Abbass MMS, El-Rashidy AA, Sadek KM, Dörfer CE, Fawzy El-Sayed KM. Dental stem cell-derived secretome/conditioned medium: The future for regenerative therapeutic applications. *Stem Cells Int.* 2020;2020:7593402. doi: 10.1155/2020/7593402.
15. Gwam C, Mohammed N, Ma X. Stem cell secretome, regeneration, and clinical translation: a narrative review. *Ann Transl Med.* 2021;9(1):70. doi:10.21037/atm-20-5030.
16. Dowling P, Clynes M. Conditioned media from cell lines: a complementary model to clinical specimens for the discovery of disease-specific biomarkers. *Proteomics.* 2011;11(4):794-804. doi: 10.1002/pmic.201000530.

17. Abdel-Maguid EM, Awad SM, Hassan YS, El-Mokhtar MA, El-Deek HE, Mekawy MM. Efficacy of stem cell-conditioned medium vs. platelet-rich plasma as an adjuvant to ablative fractional CO₂ laser resurfacing for atrophic post-acne scars: a split-face clinical trial. *J Dermatolog Treat.* 2021;32(2):242-249. doi: 10.1080/09546634.2019.1630701.
18. Katagiri W, Watanabe J, Toyama N, Osugi M, Sakaguchi K, Hibi H. Clinical study of bone regeneration by conditioned medium from mesenchymal stem cells after maxillary sinus floor elevation. *Implant Dent.* 2017; 26(4):607-612. <https://doi.org/10.1155/2014/965849>.
19. Prakoeswa CRS, Natallya FR, Harnindya D, Thohiroh A, Oktaviyanti RN, Pratiwi KD, Rubianti MA, Yogatri B, Primasari PI, Herwanto N, Alinda MD, Kusumaputra BH, Astari L, Listiawan MY, Agusni I, Rantam FA. The efficacy of topical human amniotic membrane-mesenchymal stem cell-conditioned medium (hAMMSC-CM) and a mixture of topical hAMMSC-CM + vitamin C and hAMMSC-CM + vitamin E on chronic plantar ulcers in leprosy: a randomized control trial. *J Dermatolog Treat.* 2018;29(8):835-840. doi: 10.1080/09546634.2018.1467541.
20. Lee YI, Kim J, Kim J, Park S, Lee JH. The effect of conditioned media from human adipocyte-derived mesenchymal stem cells on androgenetic alopecia after nonablative fractional laser treatment. *Dermatol Surg.* 2020;46(12):1698-1704. doi: 10.1097/DSS.0000000000002518.
21. Streiter S, Fisch B, Sabbah B, Ao A, Abir R. The importance of neuronal growth factors in the ovary. *Mol Hum Reprod.* 2016;22(1):3-17. doi: 10.1093/molehr/gav057.
22. Dissen GA, Romero C, Paredes A, Ojeda SR. Neurotrophic control of ovarian development. *Microsc Res Tech.* 2002;59(6):509-515. doi: 10.1002/jemt.10227.
23. Kerr B, Garcia-Rudaz C, Dorfman M, Paredes A, Ojeda SR. NTRK1 and NTRK2 receptors facilitate follicle assembly and early follicular

- development in the mouse ovary. *Reproduction*. 2009; 138 (1): 131-40. DOI: 10.1530/REP-08-0474.
24. Dole G, Nilsson EE, Skinner MK. Glial-derived neurotrophic factor promotes ovarian primordial follicle development and cell-cell interactions during folliculogenesis. *Reproduction*. 2008; 135 (5): 671-82. DOI: 10.1530/REP-07-0405.
25. Nilsson E, Dole G, Skinner MK. Neurotrophin NT3 promotes ovarian primordial to primary follicle transition. *Reproduction*. 2009;138(4):697-707. doi: 10.1530/REP-09-0179.
26. Chaves R. N., Alves A. M. C. V., Lima L. F., Matos H. M. T., Rodrigues A. P. R., Figueiredo J. R. Role of nerve growth factor (NGF) and its receptors in folliculogenesis. *Zygote*. 2013;21(2):187–197. doi: 10.1017/S0967199412000111.
27. Salas C, Julio-Pieper M, Valladares M, Pommer R, Vega M, Mastronardi C, Kerr B, Ojeda SR, Lara HE, Romero C. Nerve growth factor-dependent activation of trkA receptors in the human ovary results in synthesis of follicle-stimulating hormone receptors and estrogen secretion. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(6):2396-403. doi: 10.1210/jc.2005-1925.
28. The human nervous system. Ed. by Mai J.K., Paxinos G. Third Edition, Elsevier Inc.: 2012, p.82-140. <https://doi.org/10.1016/C2009-0-02721-4>.
29. Walker MJ, Xu XM. History of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) and its use for spinal cord injury repair. *Brain Sci*. 2018;8(6):109. doi:10.3390/brainsci8060109 .
30. Ruiz C, Casarejos MJ, Gomez A, Solano R, de Yebenes JG, Mena MA. Protection by glia-conditioned medium in a cell model of Huntington disease. *PLoS Curr*. 2012;4:e4fbca54a2028b. Published 2012 Jul 2. doi:10.1371/4fbca54a2028b.
31. Грищенко Н. Г., Геродес А. Г., Перлигін І. В. Вплив терапії препаратами екстракту плаценти на динаміку показників клітинної ланки імунітету в периферичній крові та фолікулярній рідині пацієнток

- із трубно-перитонеальною безплідністю. *Міжнародний медичний журнал*. 2011; 1: 84-89 . Available from: <http://dspace.nbu.gov.ua/bitstream/handle/123456789/30638/17-Grischenko.pdf?sequence=1> .
32. Трифонов В.Ю., Прокопюк В.Ю., Зайченко О.В. Кріоконсервована сироватка кордової крові у відновленні репродуктивної функції при антифосфоліпідному синдромі. *Проблеми кріобіології*. 2011; 21(1): 75-84. Available from: <http://dspace.nbu.gov.ua/bitstream/handle/123456789/44884/09-Trifonov.pdf?sequence=1> .
33. Globa VYu, Bozhok GA, Legach EI. Morphological parameters of bladder rats with infravesical obstruction with the introduction of biologically active compositions. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2020; 8: 327–333. https://papers.ssrn.com/sol3/papers.cfm?abstract_id=3844247 .
34. Нестерук Г. В., Колот Н. В., Проценко О. С., Падалко В. І., Легач Є. І. Вплив кріоекстракту спінальних гангліїв на структурно-функціональні характеристики яєчників щурів різного віку. *Вісник проблем біології і медицини*. 2020, 4(158): 173-177. <http://dx.doi.org/10.29254/2077-4214-2020-4-158-173-177>
35. Нестерук Г.В., Легач Є.І. Біологічні ефекти низькомолекулярної фракції кріоекстракту спінальних гангліїв на репродуктивну систему самиць щурів. *Вісник проблем біології і медицини*. 2023, 2 (169): 402-409. <http://dx.doi.org/10.29254/2077-4214-2023-2-169-402-409> .
36. Нестерук Г.В., Устиченко В.Д., Алабедацькарім Н.М., Падалко В.І., Проценко О.С., Легач Є.І. Вплив кріоекстракту спінальних гангліїв на гістологічні характеристики та скорочувальну активність матки щурів різного віку. *Проблеми кріобіології і кріомедицини*. 2021; 31(3):258–267. <https://doi.org/10.15407/cryo31.03.258>
37. Нестерук Г.В., Алабедацькарім Н.М., Колот Н.В., Комаромі Н.А., Проценко О.С., Легач Є.І. Вплив кондиційованих середовищ від

- культур гліальних клітин на репродуктивну систему щурів різного віку. *Проблеми ендокринної патології*. 2022; 2: 88-96. <https://doi.org/10.21856/j-PEP.2022.2.13>
38. Nesteruk H.V., Alabedalkarim N.M., Komaromi N.A., Tkachenko N.O., Protsenko O.S., Lehach E.Y. Influence of conditioned media from glial cell cultures on contractility of uterine in rats of different ages . *Reproductive Endocrinology*. 2022; 1-2 (63-64):85–90. <https://doi.org/10.18370/2309-4117.2022.63.85-90>
39. Нестерук А. В., Устиченко В. Д., Алабедацькарим Н. М., Легач Е. И., Бондаренко Т. П. Морфофункціональні характеристики матки крыс позднего репродуктивного возраста при введении криоэкстракта спинальных ганглиев // Dynamics of the development of world science. Abstracts of the 9th International scientific and practical conference. Perfect Publishing. Vancouver, Canada. 2020. P. 756-761.
40. Нестерук Г.В, Колот Н.В., Проценко О.С., Падалко В.І., Шаповал О.В., Легач Є.І. Вплив кріоекстракту спінальних гангліїв на складові пулу жовтих тіл в яєчниках щурів різного віку. Матеріали Четвертої Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю «Теорія та практика сучасної морфології», Дніпро, 4-6 листопада 2020. – С. 79-81.
41. Нестерук Г.В., Устиченко В.Д., Алабедацькарім Н.М., Легач Є.І. Вплив кріоекстракту спінальних гангліїв на естральний цикл щурів різного віку // Науково-практична конференція «Фундаментальні науки – практичній медицині: морфо-функціональні методи дослідження онтогенетичних перетворень, фізіологічних та метаболічних процесів, змодельованих патологічних станів, при захворюваннях внутрішніх органів (присвяченої 80-річчю з Дня народження професора Шутки Б.В.)», Івано-Франківськ, Івано-Франківський національний медичний університет, 30 вересня - 2 жовтня 2020, С. 44-46.

42. Nesteruk H., Legach E. Impact of spinal ganglia cryoextract introduction on contractile activity of uterine myometrium of late reproductive age rats. Щорічна міжнародна конференція молодих вчених «Cold in Biology and Medicine: Current Problems in Cryobiology, Transplantology, and Biotechnology», Харків, 2020, Problems of Cryobiology and Cryomedicine, 2020; 30(3), 291. <https://doi.org/10.15407/cryo30.03.291>
43. Nesteruk H., Legach E. Uterine contractility in aged rats after administration of conditioned media from cryopreserved glial cell culture, Щорічна міжнародна конференція молодих вчених «Cold in Biology and Medicine: Current Problems in Cryobiology, Transplantology, and Biotechnology», Харків, 25 травня, 2022, Problems of Cryobiology and Cryomedicine, 2022; 32 (4), 300. <https://doi.org/10.15407/cryo32.04.300>
44. Нестерук Г.В., Устиченко В.Д., Алабедацькарім Н.М., Легач Є.І., Шевцова М.Ю. Вплив кріоекстракту спінальних гангліїв на КСІ-індуковану скорочувальну активність матки щурів різного віку. Матеріали XI Міжнародної науково-практичної конференції «Actual trends of modern scientific research», 6-8 червня 2021, Мюнхен, Німеччина; 2021: 114-119.
45. Нестерук Г.В., Сидоренко О.С., Легач Є.І. Нейротрофін-подібна активність кондиціонованих середовищ від культур клітин зі спінальних гангліїв. Матеріали VI Міжнародної науково-практичної конференції «European scientific congress», 10-12 липня, 2023, Мадрид, Іспанія; 2023: 48-52. Available from: <https://sci-conf.com.ua/vi-mizhnarodna-naukovo-praktichna-konferentsiya-european-scientific-congress-10-12-07-2023-madrid-ispaniya-arhiv/>
46. Ліхачов В. К. Гінекологія : керівництво для лікарів / В. К. Ліхачов. – Вінниця : Нова Книга, 2018. – 688 с. ISBN 978-966-382-692-9.
47. Paterni I, Granchi C, Katzenellenbogen JA, Minutolo F. Estrogen receptors alpha (ER α) and beta (ER β): subtype-selective ligands and clinical potential. Steroids. 2014 Nov;90:13-29. doi: 10.1016/j.steroids.2014.06.012

48. Ross M. H., Pawlina W. Histology. A text and atlas with correlated cell and molecular biology, 8th Edition. Philadelphia Lippincott Williams & Wilkins: 2018, 1072 p.
49. Spergel DJ. Modulation of Gonadotropin-Releasing Hormone Neuron Activity and Secretion in Mice by Non-peptide Neurotransmitters, Gasotransmitters, and Gliotransmitters. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2019 May 22;10:329. doi: 10.3389/fendo.2019.00329.
50. Karampetsou M, Vekrellis K, Melachroinou K. The promise of the TGF- β superfamily as a therapeutic target for Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*. 2022; 171:105805. doi: 10.1016/j.nbd.2022.105805.
51. Mowla SJ, Farhadi HF, Pareek S, Atwal JK, Morris SJ, Seidah NG, Murphy RA. Biosynthesis and post-translational processing of the precursor to brain-derived neurotrophic factor. *J Biol Chem*. 2001; 276(16): 12660-6. doi: 10.1074/jbc.M008104200.
52. Neuroscience. 6nd edition. Ed. by Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D. Sunderland (MA): Sinauer Associates; 2018, 960 p. ISBN: 978160535841.
53. Dissen GA, Hirshfield AN, Malamed S, Ojeda SR. Expression of neurotrophins and their receptors in the mammalian ovary is developmentally regulated: changes at the time of folliculogenesis. *Endocrinology*. 1995; 136(10): 4681-4692. doi: 10.1210/endo.136.10.7664689.
54. Bradshaw RA. Nerve growth factor. *Annu Rev Biochem*. 1978; 47:191-216. doi: 10.1146/annurev.bi.47.070178.001203.
55. Liu Z, Wu H, Huang S. Role of NGF and its receptors in wound healing (Review). *Exp Ther Med*. 2021; 21(6): 599. doi: 10.3892/etm.2021.10031.
56. Barker PA, Mantyh P, Arendt-Nielsen L, Viktrup L, Tive L. Nerve growth factor signaling and its contribution to pain. *J Pain Res*. 2020; 13:1223-1241. doi: 10.2147/JPR.S247472.

57. Rocco ML, Soligo M, Manni L, Aloe L. Nerve growth factor: Early studies and recent clinical trials. *Curr Neuroparmacol*. 2018; 16(10): 1455-1465. doi: 10.2174/1570159X16666180412092859.
58. Aloe L, Rocco ML, Balzamino BO, Micera A. Nerve growth factor: A focus on neuroscience and therapy. *Curr Neuroparmacol*. 2015; 13(3): 294-303. doi: 10.2174/1570159x13666150403231920.
59. Aloe L, Rocco ML, Balzamino BO, Micera A. Nerve growth factor: role in growth, differentiation and controlling cancer cell development. *J Exp Clin Cancer Res*. 2016; 35(1): 116. doi: 10.1186/s13046-016-0395-y.
60. Dissen GA, Garcia-Rudaz C, Paredes A, Mayer C, Mayerhofer A, Ojeda SR. Excessive ovarian production of nerve growth factor facilitates development of cystic ovarian morphology in mice and is a feature of polycystic ovarian syndrome in humans. *Endocrinology*. 2009; 150 (6): 2906-14. DOI:10.1210/en.2008-1575.
61. Lara HE, Dissen GA, Leyton V, Paredes A, Fuenzalida H, Fiedler JL, Ojeda SR. An increased intraovarian synthesis of nerve growth factor and its low affinity receptor is a principal component of steroid-induced polycystic ovary in the rat. *Endocrinology*. 2000; 141 (3): 1059-1072. DOI: 10.1210/endo.141.3.7395.
62. Honea RA, Cruchaga C, Perea RD, Saykin AJ, Burns JM, Weinberger DR, Goate AM; Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (ADNI). Characterizing the role of brain derived neurotrophic factor genetic variation in Alzheimer's disease neurodegeneration. *PLoS One*. 2013; 8(9):e76001. doi: 10.1371/journal.pone.0076001.
63. Howells DW, Porritt MJ, Wong JY, Batchelor PE, Kalnins R, Hughes AJ, Donnan GA. Reduced BDNF mRNA expression in the Parkinson's disease substantia nigra. *Exp Neurol*. 2000; 166(1): 127-135. doi: 10.1006/exnr.2000.7483.
64. Ciammola A, Sassone J, Cannella M, Calza S, Poletti B, Frati L, Squitieri F, Silani V. Low brain-derived neurotrophic factor (BDNF) levels in serum of

- Huntington's disease patients. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*. 2007 Jun 5;144B(4):574-7. doi: 10.1002/ajmg.b.30501.
- 65.Zhang HT, Li LY, Zou XL, Song XB, Hu YL, Feng ZT, Wang TT. Immunohistochemical distribution of NGF, BDNF, NT-3, and NT-4 in adult rhesus monkey brains. *J Histochem Cytochem*. 2007 Jan;55(1):1-19. doi: 10.1369/jhc.6A6952.2006;
 - 66.Robinson RC, Radziejewski C, Spraggon G, Greenwald J, Kostura MR, Burtnick LD, Stuart DI, Choe S, Jones EY. The structures of the neurotrophin 4 homodimer and the brain-derived neurotrophic factor/neurotrophin 4 heterodimer reveal a common Trk-binding site. *Protein Sci*. 1999; 8(12): 2589-97. doi: 10.1110/ps.8.12.2589.
 - 67.Miranda M, Morici JF, Zanoni MB, Bekinschtein P. Brain-derived neurotrophic factor: A key molecule for memory in the healthy and the pathological brain. *Front Cell Neurosci*. 2019; 13:363. doi: 10.3389/fncel.2019.00363
 - 68.Kim M, Hyun SH. Neurotrophic factors in the porcine ovary: Their effects on follicular growth, oocyte maturation, and developmental competence. *Front Vet Sci*. 2022; 9:931402. doi: 10.3389/fvets.2022.931402.
 - 69.Paredes A, Romero C, Dissen GA, DeChiara TM, Reichardt L, Cornea A, et al. TrkB receptors are required for follicular growth and oocyte survival in the mammalian ovary. *Dev Biol*. 2004; 267:430–49. doi: 10.1016/j.ydbio.2003.12.001.
 - 70.Zhao X, Du F, Liu X, Ruan Q, Wu Z, Lei C, et al. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is expressed in buffalo (*Bubalus bubalis*) ovarian follicles and promotes oocyte maturation and early embryonic development. *Theriogenology*. 2019; 130: 79–88. doi: 10.1016/j.theriogenology.2019.02.020.
 - 71.Li J, Kawamura K, Cheng Y, Liu S, Klein C, Liu S, Duan E-K, Hsueh AJW. Activation of dormant ovarian follicles to generate mature eggs. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2010; 107 (22):10280-284. DOI: 10.1073/pnas.1001198107.

72. Marlin MC, Li G. Biogenesis and function of the NGF/TrkA signaling endosome. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2015; 314: 239-57. DOI: 10.1016/bs.ircmb.2014.10.002.
73. Engele, J.; Schubert, D.; Bohn, M.C. Conditioned media derived from glial cell lines promote survival and differentiation of dopaminergic neurons in vitro: Role of mesencephalic glia. *J. Neurosci. Res.* 1991,30, 359–371 ;
74. Lin LF, Doherty DH, Lile JD, Bektesh S, Collins F. GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science.* 1993; 260(5111):1130-1132. doi: 10.1126/science.8493557.
75. Zhu S, Li Y, Bennett S, Chen J, Weng IZ, Huang L, Xu H, Xu J. The role of glial cell line-derived neurotrophic factor family member artemin in neurological disorders and cancers. *Cell Prolif.* 2020; 53(7):e12860. doi: 10.1111/cpr.12860.
76. Cortés D, Carballo-Molina OA, Castellanos-Montiel MJ, Velasco I. The non-survival effects of glial cell line-derived neurotrophic factor on neural cells. *Front Mol Neurosci.* 2017; 10:258. doi: 10.3389/fnmol.2017.00258.
77. Kotliarova A, Sidorova YA. Glial cell line-derived neurotrophic factor family ligands, players at the interface of neuroinflammation and neuroprotection: Focus onto the glia. *Front Cell Neurosci.* 2021; 15:679034. doi: 10.3389/fncel.2021.679034.
78. Linher K, Wu D, Li J. Glial cell line-derived neurotrophic factor: an intraovarian factor that enhances oocyte developmental competence in vitro. *Endocrinology.* 2007; 148: 4292–4301. doi: 10.1210/en.2007-0021.
79. Toms D, Tsoi S, Dobrinsky J, Dyck MK, Li J. The effects of glial cell line-derived neurotrophic factor on the in vitro matured porcine oocyte transcriptome. *Mol Reprod Dev.* 2014; 81: 217–229. doi: 10.1002/mrd.22288.
80. Blais M, Lévesque P, Bellenfant S, Berthod F. Nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-3 and glial-derived neurotrophic

- factor enhance angiogenesis in a tissue-engineered in vitro model. *Tissue Eng Part A*. 2013; 19(15-16): 1655-1664. doi: 10.1089/ten.tea.2012.0745.
81. Bové M, Monto F, Guillem-Llobat P, Ivorra MD, Noguera MA, Zambrano A, Sirerol-Piquer MS, Requena AC, García-Alonso M, Tejerina T, Real JT, Fariñas I, D'Ocon P. NT3/TrkC Pathway Modulates the Expression of UCP-1 and Adipocyte Size in Human and Rodent Adipose Tissue. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021; 12:630097. doi: 10.3389/fendo.2021.630097.
 82. Oron G, Ao A, Friedman O, Fisch B, Zhang XY, Ben-Haroush A, Peled Y, Abir R. Expression of neurotrophin 3 and its tropomyosin-related kinase receptor C in human preantral follicles. *Fertil Steril*. 2011; 95(6): 2056-2062. doi: 10.1016/j.fertnstert.2011.02.012.
 83. Katoh-Semba R, Ichisaka S, Hata Y, Tsumoto T, Eguchi K, Miyazaki N, Matsuda M, Takeuchi IK, Kato K. NT-4 protein is localized in neuronal cells in the brain stem as well as the dorsal root ganglion of embryonic and adult rats. *J Neurochem*. 2003; 86(3):660-668. doi: 10.1046/j.1471-4159.2003.01874.x.
 84. Chung JY, Kim MW, Bang MS, Kim M. Increased expression of neurotrophin 4 following focal cerebral ischemia in adult rat brain with treadmill exercise. *PLoS One*. 2013; 8(3):e52461. doi: 10.1371/journal.pone.0052461.
 85. Farhi J, Fisch B, Garor R, Peled Y, Pinkas H, Abir R. Neurotrophin 4 enhances in vitro follicular assembly in human fetal ovaries. *Fertil Steril*. 2011; 95: 1267–1271. doi: 10.1016/j.fertnstert.2010.03.051.
 86. Anderson RA, Robinson LL, Brooks J, Spears N. Neurotrophins and their receptors are expressed in the human fetal ovary. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002; 87: 890–897. doi: 10.1210/jcem.87.2.8221.
 87. Guo Y, Chen P, Li T, Jia L, Zhou Y, Huang J, et al. Single-cell transcriptome and cell-specific network analysis reveal the reparative effect of neurotrophin-4 in preantral follicles grown in vitro. *Reprod Biol Endocrinol*. 2021; 19:1–18. doi: 10.1186/s12958-021-00818-w.

- 88.Götz R, Köster R, Winkler C, Raulf F, Lottspeich F, Scharl M, Thoenen H. Neurotrophin-6 is a new member of the nerve growth factor family. *Nature*. 1994; 372(6503): 266-269. doi: 10.1038/372266a0.
- 89.Leggieri A, Attanasio C, Palladino A, Cellerino A, Lucini C, Paolucci M, Terzibasi Tozzini E, de Girolamo P, D'Angelo L. Identification and Expression of Neurotrophin-6 in the Brain of *Nothobranchius furzeri*: One More Piece in Neurotrophin Research. *J Clin Med*. 2019; 8(5): 595. doi: 10.3390/jcm8050595.
- 90.Cruz G, Fernandois D, Paredes A. Ovarian Function and Reproductive Senescence in the Rat: Role of Ovarian Sympathetic Innervation. *Reproduction*. 2017; 153 (2): 157-174. <https://doi.org/10.1530/REP-16-0117>.
- 91.Richeri A, Bianchimano P, Mármol NM, Viettro L, Cowen T, Brauer MM. Plasticity in rat uterine sympathetic nerves: the role of TrkA and p75 nerve growth factor receptors. *J Anat*. 2005; 207(2): 125–134. doi: 10.1111/j.1469-7580.2005.00435.x.
- 92.Shi Z, Arai KY, Jin W, Weng Q, Watanabe G, Suzuki AK, Taya K. Expression of nerve growth factor and its receptors NTRK1 and TNFRSF1B is regulated by estrogen and progesterone in the uteri of golden hamsters. *Biol Reprod*. 2006; 74(5): 850-6. doi: 10.1095/biolreprod.105.044917.
- 93.Camerino C, Conte E, Cannone M, Caloiero R, Fonzino A, Tricarico D. Nerve Growth Factor, Brain-Derived Neurotrophic Factor and Osteocalcin Gene Relationship in Energy Regulation, Bone Homeostasis and Reproductive Organs Analyzed by mRNA Quantitative Evaluation and Linear Correlation Analysis. *Front Physiol*. 2016; 7:456. doi: 10.3389/fphys.2016.00456.
- 94.Jackson TC, Rani A, Kumar A, Foster TC. Regional hippocampal differences in AKT survival signaling across the lifespan: implications for CA1 vulnerability with aging. *Cell Death Differ*. 2009; 16(3): 439-48. doi: 10.1038/cdd.2008.171.

95. Skalnikova H, Motlik J, Gadher SJ, Kovarova H. Mapping of the secretome of primary isolates of mammalian cells, stem cells and derived cell lines. *Proteomics*. 2011; 11(4): 691-708. doi: 10.1002/pmic.201000402.
96. Gneccchi M, He H, Liang OD, Melo LG, Morello F, Mu H, Noiseux N, Zhang L, Pratt RE, Ingwall JS, Dzau VJ. Paracrine action accounts for marked protection of ischemic heart by Akt-modified mesenchymal stem cells. *Nat Med*. 2005;11(4): 367-8. doi: 10.1038/nm0405-367
97. Maguire G. Stem cell therapy without the cells. *Commun Integr Biol*. 2013; 6(6):e26631. doi: 10.4161/cib.26631.
98. Brini AT, Amodeo G, Ferreira LM, Milani A, Niada S, Moschetti G, Franchi S, Borsani E, Rodella LF, Panerai AE, Sacerdote P. Therapeutic effect of human adipose-derived stem cells and their secretome in experimental diabetic pain. *Sci Rep*. 2017; 7(1): 9904. doi: 10.1038/s41598-017-09487-5.
99. Moshly SE, Radwan IA, Rady D, Abbass MMS, El-Rashidy AA, Sadek KM, Dörfer CE, Fawzy El-Sayed KM. Therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived secretomes in regenerative medicine. *Hindawi Stem Cells International*. 2020; Article ID 7593402 <https://doi.org/10.1155/2020/7593402>.
100. Bermudez MA, Sendon-Lago J, Seoane S, Eiro N, Gonzalez F, Saa J, Vizoso F, Perez-Fernandez R. Anti-inflammatory effect of conditioned medium from human uterine cervical stem cells in uveitis. *Exp Eye Res*. 2016; 149:84-92. doi: 10.1016/j.exer.2016.06.022.
101. Osugi M, Katagiri W, Yoshimi R, Inukai T, Hibi H, Ueda M. Conditioned media from mesenchymal stem cells enhanced bone regeneration in rat calvarial bone defects. *Tissue Eng Part A*. 2012; 18(13-14): 1479-1489. doi: 10.1089/ten.TEA.2011.0325.
102. Pawitan JA. Prospect of stem cell conditioned medium in regenerative medicine. *Biomed Res Int*. 2014; 2014: 965849. doi: 10.1155/2014/965849.
103. Wilkins A, Kemp K, Ginty M, Hares K, Mallam E, Scolding N. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells secrete brain-derived

- neurotrophic factor which promotes neuronal survival in vitro. *Stem Cell Res.* 2009; 3(1): 63-70. doi: 10.1016/j.scr.2009.02.006.
104. Wangler S, Kamali A, Wapp C, Wuertz-Kozak K, Häckel S, Fortes C, Benneker LM, Haglund L, Richards RG, Alini M, Peroglio M, Grad S. Uncovering the secretome of mesenchymal stromal cells exposed to healthy, traumatic, and degenerative intervertebral discs: a proteomic analysis. *Stem Cell Res Ther.* 2021; 12(1): 11. doi: 10.1186/s13287-020-02062-2.
 105. Kehl D, Generali M, Mallone A, Heller M, Uldry AC, Cheng P, Gantenbein B, Hoerstrup SP, Weber B. Proteomic analysis of human mesenchymal stromal cell secretomes: a systematic comparison of the angiogenic potential. *NPJ Regen Med.* 2019; 4:8. doi: 10.1038/s41536-019-0070-y.
 106. Lara ML, Carvalho MG, de Souza FF, Schmith RA, Codognoto VM, De Vita B, Freitas Dell'Aqua CP, Landim FDC, Alvarenga MLE. Influence of culture conditions on the secretome of mesenchymal stem cells derived from feline adipose tissue: Proteomics approach. *Biochimie.* 2023; 211: 78-86. doi: 10.1016/j.biochi.2023.03.004.
 107. Budiariati V, Rinendyaputri R, Noviantari A, Budiono D, Fahrudin M, Juliandi B, Boediono A. Heterogeneity of cells population and secretome profile of differentiated cells from E17 rat neural progenitor cells. *J Stem Cells Regen Med.* 2019; 15(2): 35-44. doi: 10.46582/jsrm.1502008. ;
 108. Gneccchi M, He H, Noiseux N, Liang OD, Zhang L, Morello F, Mu H, Melo LG, Pratt RE, Ingwall JS, Dzau VJ. Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement. *FASEB J.* 2006; 20(6): 661-669. doi: 10.1096/fj.05-5211com.
 109. Yu B, Kim HW, Gong M, Wang J, Millard RW, Wang Y, Ashraf M, Xu M. Exosomes secreted from GATA-4 overexpressing mesenchymal stem cells serve as a reservoir of anti-apoptotic microRNAs for cardioprotection. *Int J Cardiol.* 2015; 182: 349-60. doi: 10.1016/j.ijcard.2014.12.043.

110. Yang D, Wang W, Li L, Peng Y, Chen P, Huang H, Guo Y, Xia X, Wang Y, Wang H, Wang WE, Zeng C. The relative contribution of paracrine effect versus direct differentiation on adipose-derived stem cell transplantation mediated cardiac repair. *PLoS One*. 2013; 8(3): e59020. doi: 10.1371/journal.pone.0059020
111. Salgado AJ, Reis RL, Sousa NJ, Gimble JM. Adipose tissue derived stem cells secretome: soluble factors and their roles in regenerative medicine. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2010; 5(2): 103-110. doi: 10.2174/157488810791268564.
112. Wang T, Guo S, Liu X, Xv N, Zhang S. Protective effects of adipose-derived stem cells secretome on human dermal fibroblasts from ageing damages. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015; 8(12): 15739-48. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4730056/>
113. Wang X, Chen Y, Zhao Z, Meng Q, Yu Y, Sun J, Yang Z, Chen Y, Li J, Ma T, Liu H, Li Z, Yang J, Shen Z. Engineered exosomes with ischemic myocardium-targeting peptide for targeted therapy in myocardial infarction. *J Am Heart Assoc*. 2018; 7(15): e008737. doi: 10.1161/JAHA.118.008737.
114. Kshitiz, Ellison DD, Suhail Y, Afzal J, Woo L, Kilic O, Spees J, Levchenko A. Dynamic secretome of bone marrow-derived stromal cells reveals a cardioprotective biochemical cocktail. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019; 116(28): 14374-14383. doi: 10.1073/pnas.1902598116.
115. Xia J, Minamino S, Kuwabara K, Arai S. Stem cell secretome as a new booster for regenerative medicine. *Biosci Trends*. 2019; 13(4): 299-307. doi: 10.5582/bst.2019.01226.
116. Sellmeyer DE, Civitelli R, Hofbauer LC, Khosla S, Lecka-Czernik B, Schwartz AV. Skeletal Metabolism, Fracture Risk, and Fracture Outcomes in Type 1 and Type 2 Diabetes. *Diabetes*. 2016; 65(7): 1757-1766. doi: 10.2337/db16-0063.
117. Zhu Y, Jia Y, Wang Y, Xu J, Chai Y. Impaired bone regenerative effect of exosomes derived from bone marrow mesenchymal stem cells in

- type 1 diabetes. *Stem Cells Transl Med.* 2019; 8(6): 593-605. doi: 10.1002/sctm.18-0199.
118. Eiro N, Sendon-Lago J, Seoane S, Bermúdez MA, Lamelas ML, Garcia-Caballero T, Schneider J, Perez-Fernandez R, Vizoso FJ. Potential therapeutic effect of the secretome from human uterine cervical stem cells against both cancer and stromal cells compared with adipose tissue stem cells. *Oncotarget.* 2014; 5(21): 10692-10708. doi: 10.18632/oncotarget.2530.
 119. Eiro N, Fraile M, Fernández-Francos S, Sánchez R, Costa LA, Vizoso FJ. Importance of the origin of mesenchymal (stem) stromal cells in cancer biology: "alliance" or "war" in intercellular signals. *Cell Biosci.* 2021; 11(1): 109. doi: 10.1186/s13578-021-00620-6.
 120. Bliss SA, Sinha G, Sandiford OA, Williams LM, Engelberth DJ, Guiro K, Isenalumhe LL, Greco SJ, Ayer S, Bryan M, Kumar R, Ponzio NM, Rameshwar P. Mesenchymal stem cell-derived exosomes stimulate cycling quiescence and early breast cancer dormancy in bone marrow. *Cancer Res.* 2016; 76(19): 5832-5844. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-1092.
 121. Takahara K, Ii M, Inamoto T, Nakagawa T, Ibuki N, Yoshikawa Y, Tsujino T, Uchimoto T, Saito K, Takai T, Tanda N, Minami K, Uehara H, Komura K, Hirano H, Nomi H, Kiyama S, Asahi M, Azuma H. MicroRNA-145 mediates the inhibitory effect of adipose tissue-derived stromal cells on prostate cancer. *Stem Cells Dev.* 2016; 25(17): 1290-1298. doi: 10.1089/scd.2016.0093.
 122. Pacioni S, D'Alessandris QG, Giannetti S, Morgante L, Coccè V, Bonomi A, Buccarelli M, Pascucci L, Alessandri G, Pessina A, Ricci-Vitiani L, Falchetti ML, Pallini R. Human mesenchymal stromal cells inhibit tumor growth in orthotopic glioblastoma xenografts. *Stem Cell Res Ther.* 2017; 8(1): 53. doi: 10.1186/s13287-017-0516-3.

123. Nakajima H, Uchida K, Guerrero AR, Watanabe S, Sugita D, Takeura N, Yoshida A, Long G, Wright KT, Johnson WE, Baba H. Transplantation of mesenchymal stem cells promotes an alternative pathway of macrophage activation and functional recovery after spinal cord injury. *J Neurotrauma*. 2012; 29(8): 1614-1625. doi: 10.1089/neu.2011.2109.
124. Chen YT, Tsai MJ, Hsieh N, Lo MJ, Lee MJ, Cheng H, Huang WC. The superiority of conditioned medium derived from rapidly expanded mesenchymal stem cells for neural repair. *Stem Cell Res Ther*. 2019; 10(1): 390. doi: 10.1186/s13287-019-1491-7.
125. Villegas GM, Haustein AT, Villegas R. Neuronal differentiation of PC12 and chick embryo ganglion cells induced by a sciatic nerve conditioned medium: characterization of the neurotrophic activity. *Brain Res*. 1995; 685(1-2): 77-90. doi: 10.1016/0006-8993(95)00412-j.
126. Villegas R, Villegas GM, Núñez J, Hernández M, Castillo C. Neuron-like differentiation of PC12 cells treated with media conditioned by either sciatic nerves, optic nerves, or Schwann cells. *Cell Mol Neurobiol*. 2005; 25(2): 451-461. doi: 10.1007/s10571-005-3153-9.
127. Ebrahimi-Barough S, Hoveizi E, Norouzi Javidan A, Ai J. Investigating the neuroglial differentiation effect of neuroblastoma conditioned medium in human endometrial stem cells cultured on 3D nanofibrous scaffold. *J Biomed Mater Res A*. 2015; 103(8): 2621-2627. doi: 10.1002/jbm.a.35397.
128. Li H, Liu D, Li C, Zhou S, Tian D, Xiao D, Zhang H, Gao F, Huang J. Exosomes secreted from mutant-HIF-1 α -modified bone-marrow-derived mesenchymal stem cells attenuate early steroid-induced avascular necrosis of femoral head in rabbit. *Cell Biol Int*. 2017; 41(12): 1379-1390. doi: 10.1002/cbin.10869.
129. Drago D, Cossetti C, Iraci N, Gaude E, Musco G, Bachi A, Pluchino S. The stem cell secretome and its role in brain repair. *Biochimie*. 2013; 95(12): 2271-85. doi: 10.1016/j.biochi.2013.06.020

130. Riazifar M, Mohammadi MR, Pone EJ, Yeri A, Lässer C, Segaliny AI, McIntyre LL, Shelke GV, Hutchins E, Hamamoto A, Calle EN, Crescitelli R, Liao W, Pham V, Yin Y, Jayaraman J, Lakey JRT, Walsh CM, Van Keuren-Jensen K, Lotvall J, Zhao W. Stem Cell-Derived Exosomes as Nanotherapeutics for Autoimmune and Neurodegenerative Disorders. *ACS Nano*. 2019; 13(6): 6670-6688. doi: 10.1021/acsnano.9b01004.
131. Jarmalavičiūtė A, Tunaitis V, Pivoraitė U, Venalis A, Pivoriūnas A. Exosomes from dental pulp stem cells rescue human dopaminergic neurons from 6-hydroxy-dopamine-induced apoptosis. *Cytotherapy*. 2015; 17(7): 932-939. doi: 10.1016/j.jcyt.2014.07.013.
132. Polazzi E, Contestabile A. Neuron-conditioned media differentially affect the survival of activated or unstimulated microglia: evidence for neuronal control on apoptotic elimination of activated microglia. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2003; 62(4): 351-62. doi: 10.1093/jnen/62.4.351.
133. Ahanbazi Jahan-Abad A, Karima S, Sahab Negah S, Noorbakhsh F, Borhani-Haghighi M, Gorji A. Therapeutic potential of conditioned medium derived from oligodendrocytes cultured in a self-assembling peptide nanoscaffold in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Res*. 2019; 1711: 226-235. doi: 10.1016/j.brainres.2019.01.035.
134. Gaire BP. Microglia as the Critical Regulators of Neuroprotection and Functional Recovery in Cerebral Ischemia. *Cell Mol Neurobiol*. 2022; 42(8): 2505-2525. doi: 10.1007/s10571-021-01145-9.
135. Lo Furno D, Mannino G, Pellitteri R, Zappalà A, Parenti R, Gili E, Vancheri C, Giuffrida R. Conditioned Media From Glial Cells Promote a Neural-Like Connexin Expression in Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Front Physiol*. 2018; 9: 1742. doi: 10.3389/fphys.2018.01742.
136. Pereiro X, Miltner AM, La Torre A, Vecino E. Effects of adult Müller cells and their conditioned media on the survival of stem cell-derived retinal ganglion cells. *Cells*. 2020; 9(8): 1759. <https://doi.org/10.3390/cells9081759>

137. Enes J, Haburčák M, Sona S, Gerard N, Mitchell AC, Fu W, Birren SJ. Satellite glial cells modulate cholinergic transmission between sympathetic neurons. *PLoS One*. 2020; 15(2): e0218643. doi: 10.1371/journal.pone.0218643.
138. Feng R, Muraleedharan Saraswathy V, Mokalled MH, Cavalli V. Self-renewing macrophages in dorsal root ganglia contribute to promote nerve regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2023; 120(7): e2215906120. doi: 10.1073/pnas.2215906120.
139. Ogawa R, Fujita K, Ito K. Mouse embryonic dorsal root ganglia contain pluripotent stem cells that show features similar to embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *Biol Open*. 2017; 6(5): 602–618. doi: 10.1242/bio.021758.
140. Singh RP, Cheng YH, Nelson P, Zhou FC. Retentive multipotency of adult dorsal root ganglia stem cells. *Cell Transplant*. 2009; 18(1): 55–68. doi: 10.3727/096368909788237177;
141. Li HY, Say EH, Zhou XF. Isolation and characterization of neural crest progenitors from adult dorsal root ganglia. *Stem Cells*. 2007; 25(8): 2053–65. doi: 10.1634/stemcells.2007-0080.
142. Hanani M. Satellite glial cells in sympathetic and parasympathetic ganglia: in search of function. *Brain Res Rev*. 2010; 64(2): 304–327. doi: 10.1016/j.brainresrev.2010.04.009.
143. Cui ZK, Li SY, Liao K, Wang ZJ, Guo YL, Tang LS, Tang SB, Ma JH, Chen JS. Characteristics of neural growth and cryopreservation of the dorsal root ganglion using three-dimensional collagen hydrogel culture *versus* conventional culture. *Neural Regen Res*. 2021; 16(9): 1856–1864. doi: 10.4103/1673-5374.306097.
144. Ali S, Moiseieva N, Bozhok G. Cryopreservation of cell culture derived from dorsal root ganglia of neonatal pigs. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine*. 2020; 30(2): 158–168. doi: 10.15407/cryo30.02.158.

145. Fukuoka H, Suga H, Narita K, Watanabe R, Shintani S. The latest advance in hair regeneration therapy using proteins secreted by adipose-derived stem cells. 2012; *American Journal of Cosmetic Surgery*. 29(4): 273–282. Available from: <https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.5992/AJCS-D-12-00015.1>
146. Zhou BR, Xu Y, Guo SL, Xu Y, Wang Y, Zhu F, Permatasari F, Wu D, Yin ZQ, Luo D. The effect of conditioned media of adipose-derived stem cells on wound healing after ablative fractional carbon dioxide laser resurfacing. *Biomed Res Int*. 2013; 2013: 519126. doi: 10.1155/2013/519126.
147. Sato J, Nasu M, Tsuchitani M. Comparative histopathology of the estrous or menstrual cycle in laboratory animals. *J Toxicol Pathol*. 2016; 29(3):155-162. doi: 10.1293/tox.2016-0021.
148. Westwood FR. The female rat reproductive cycle: a practical histological guide to staging. *Toxicol Pathol*. 2008; 36(3):375-384. doi: 10.1177/0192623308315665.
149. Pedersen T, Peters H. Proposal for a classification of oocytes and follicles in the mouse ovary. *J Reprod Fertil*. 1968; 17(3): 555-557. doi: 10.1530/jrf.0.0170555.
150. Emori C, Sugiura K. Role of oocyte-derived paracrine factors in follicular development. *Anim Sci J*. 2014; 85(6): 627-633. doi: 10.1111/asj.12200.
151. Zeleznik AJ. The physiology of follicle selection. *Reprod Biol Endocrinol*. 2004; 2:31. doi: 10.1186/1477-7827-2-31.
152. Cox E, Takov V. Embryology, Ovarian Follicle Development. 2022 Aug 8. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532300>.
153. Butcher R. L., Collins W. E., Fugo N. W. Plasma concentration of LH, FSH, prolactin, progesterone and estradiol-17 β throughout the 4-Day

- estrous cycle of the rat, *Endocrinology*. 1974; 94(6): 1704-1708. <https://doi.org/10.1210/endo-94-6-1704> .
154. Huang H.H., Meites J. Reproductive capacity of aging female rats. *Neuroendocrinology*. 1975; 17(4): 289–295. doi:10.1159/000122367.
 155. LeFevre J, McClintock MK. Reproductive senescence in female rats: a longitudinal study of individual differences in estrous cycles and behavior. *Biol Reprod*. 1988; 38(4): 780-789. doi: 10.1095/biolreprod38.4.780.
 156. Sengupta P. The laboratory rat: Relating its age with human's. *Int J Prev Med*. 2013; 4(6): 624-30. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23930179/>
 157. Globa VY, Bondarenko TP, Ali SG, Bozhok GA, Legach EI. Contractile activity of detrusor of rats with infravesical obstruction after introduced cryoextract of spinal ganglia and biologically active products of mantle gliocyte culture. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine*. 2019; 29(2): 164. <https://doi.org/10.15407/cryo29.02.164>
 158. de Luca AC, Faroni A, Reid AJ. Dorsal root ganglia neurons and differentiated adipose-derived stem cells: an in vitro co-culture model to study peripheral nerve regeneration. *J Vis Exp*. 2015; (96): 52543. doi: 10.3791/52543.
 159. Cora MC, Kooistra L, Travlos G. Vaginal Cytology of the Laboratory Rat and Mouse: Review and Criteria for the Staging of the Estrous Cycle Using Stained Vaginal Smears. *Toxicol Pathol*. 2015; 43(6): 776-793. doi: 10.1177/0192623315570339.
 160. Hirshfield AN. Size-frequency analysis of atresia in cycling rats. *Biol Reprod*. 1988; 38(5): 1181-1188. doi: 10.1095/biolreprod38.5.1181.
 161. Hirshfield AN, Midgley AR Jr. Morphometric analysis of follicular development in the rat. *Biol Reprod*. 1978; 19(3): 597-605. doi: 10.1095/biolreprod19.3.597.

162. Sharma D, Sangha GK, Khera KS. Triazophos-induced oxidative stress and histomorphological changes in ovary of female Wistar rats. *Pestic Biochem Physiol.* 2015; 117: 9-18. doi: 10.1016/j.pestbp.2014.09.004.
163. Wang W, Liu HL, Tian W, Zhang FF, Gong Y, Chen JW, Mao DG, Shi FX. Morphologic observation and classification criteria of atretic follicles in guinea pigs. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2010; 11(5): 307-314. doi: 10.1631/jzus.B0900391 .
164. Dixon D, Alison R, Bach U, et al. Nonproliferative and proliferative lesions of the rat and mouse female reproductive system. *J Toxicol Pathol.* 2014; 27(3-4 Suppl): 1S-107S. doi:10.1293/tox.27.1S.
165. Rhee JW, Zhang L, Ducusay CA. Suppression of myometrial contractile responses to oxytocin after different durations of chronic hypoxia in the near-term pregnant rat. *Am J Obstet Gynecol.* 1997; 177 (3): 639-644. doi: 10.1016/s0002-9378(97)70158-3
166. Garfield RE, Beir S. Increased myometrial responsiveness to oxytocin during term and preterm labor. *Am. J Obstet Gynecol.* 1989; 161: 454-461. doi: 10.1016/0002-9378(89)90541-3 .
167. Dissen GA, Romero C, Hirshfield AN, Ojeda SR. Nerve growth factor is required for early follicular development in the mammalian ovary. *Endocrinology.* 2001; 142(5): 2078-2086. doi:10.1210/endo.142.5.8126.
168. Obata K, Tsujino H, Yamanaka H, Yi D, Fukuoka T, Hashimoto N, Yonenobu K, Yoshikawa H, Noguchi K. Expression of neurotrophic factors in the dorsal root ganglion in a rat model of lumbar disc herniation. *Pain.* 2002; 99(1-2): 121-132. doi: 10.1016/s0304-3959(02)00068-4 .
169. Haberberger RV, Barry C, Dominguez N, Matusica D. Human dorsal root ganglia. *Front Cell Neurosci.* 2019; 13: 271. doi:10.3389/fncel.2019.00271.
170. Fu X, Zheng Q, Zhang N, Ding M, Pan X, Wang W, Chen H. CUMS promotes the development of premature ovarian insufficiency mediated by

- nerve growth factor and its receptor in rats. *Biomed Res Int*. 2020 Jun 30;2020:1946853. doi: 10.1155/2020/1946853.
171. Acuña E, Fornes R, Fernandois D, Garrido MP, Greiner M, Lara HE, Paredes AH. Increases in norepinephrine release and ovarian cyst formation during ageing in the rat. *Reprod Biol Endocrinol*. 2009; 7: 64. doi: 10.1186/1477-7827-7-64.
 172. Fernandois D, Na E, Cuevas F, Cruz G, Lara HE, Paredes AH. Kisspeptin is involved in ovarian follicular development during aging in rats. *J Endocrinol*. 2016; 228(3): 161-170. doi: 10.1530/JOE-15-0429.
 173. Peluso JJ, Steger RW, Huang H, Meites J. Pattern of follicular growth and steroidogenesis in the ovary of aging cycling rats. *Exp Aging Res*. 1979; 5(4): 319-33. doi: 10.1080/03610737908257208.
 174. Stocco C, Telleria C, Gibori G. The molecular control of corpus luteum formation, function, and regression. *Endocr Rev*. 2007; 28(1): 117-149. doi:10.1210/er.2006-0022.
 175. Begliuomini S, Casarosa E, Pluchino N, Lenzi E, Centofanti M, Freschi L, Pieri M, Genazzani AD, Luisi S, Genazzani AR. Influence of endogenous and exogenous sex hormones on plasma brain-derived neurotrophic factor. *Hum Reprod*. 2007; 22(4): 995-1002. doi: 10.1093/humrep/del479.
 176. Montan S. Increased risk in the elderly parturient. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2007; 19(2): 110-112. doi: 10.1097/GCO.0b013e3280825603
 177. Arrowsmith S, Robinson H, Noble K, Wray S. What do we know about what happens to myometrial function as women age? *J Muscle Res Cell Motil*. 2012; 33(3-4): 209-217. doi: 10.1007/s10974-012-9300-2.
 178. Smith GC, Cordeaux Y, White IR, Pasupathy D, Missfelder-Lobos H, Pell JP, Charnock-Jones DS, Fleming M. The effect of delaying childbirth on primary cesarean section rates. *PLoS Med*. 2008; 5(7): e144. doi: 10.1371/journal.pmed.0050144.

179. Chang HM, Wu HC, Sun ZG, Lian F, Leung PCK. Neurotrophins and glial cell line-derived neurotrophic factor in the ovary: physiological and pathophysiological implications. *Hum Reprod Update*. 2019; 25(2): 224-242. doi: 10.1093/humupd/dmy047.
180. Chai NL, Dong L, Li ZF, Du KX, Wang JH, Yan LK, Dong XL. Effects of neurotrophins on gastrointestinal myoelectric activities of rats. *World J Gastroenterol*. 2003; 9(8): 1874-1877. doi: 10.3748/wjg.v9.i8.1874.
181. Bolton TB. Mechanisms of action of transmitters and other substances on smooth muscle. *Physiol Rev*. 1979; 59(3): 606-718. doi: 10.1152/physrev.1979.59.3.606.
182. Ferreira JJ, Butler A, Stewart R, Gonzalez-Cota AL, Lybaert P, Amazu C, Reinl EL, Wakle-Prabakaran M, Salkoff L, England SK, Santi CM. Oxytocin can regulate myometrial smooth muscle excitability by inhibiting the Na⁺-activated K⁺ channel, Slo2.1. *J Physiol*. 2019; 597(1): 137-149. doi: 10.1113/JP276806.
183. Edwards D, Good DM, Granger SE, Hollingsworth M, Robson A, Small RC, Weston AH. The spasmogenic action of oxytocin in the rat uterus--comparison with other agonists. *Br J Pharmacol*. 1986; 88(4): 899-908. doi: 10.1111/j.1476-5381.1986.tb16264.x.
184. Brauer MM. Plasticity in Uterine Innervation: State of the Art. *Curr Protein Pept Sci*. 2017; 18(2): 108-119. doi: 10.2174/1389203717666160322145411.
185. Brauer MM, Smith PG. Estrogen and female reproductive tract innervation: cellular and molecular mechanisms of autonomic neuroplasticity. *Auton Neurosci*. 2015; 187: 1-17. doi: 10.1016/j.autneu.2014.11.009.
186. Latini C, Frontini A, Morroni M, Marzioni D, Castellucci M, Smith PG. Remodeling of uterine innervation. *Cell Tissue Res*. 2008; 334(1): 1-6. doi: 10.1007/s00441-008-0657-x.

187. Al-Shawi R, Hafner A, Olsen J, Chun S, Raza S, Thrasyvoulou C, Lovestone S, Killick R, Simons P, Cowen T. Neurotoxic and neurotrophic roles of proNGF and the receptor sortilin in the adult and ageing nervous system. *Eur J Neurosci.* 2008; 27(8): 2103-2114. doi: 10.1111/j.1460-9568.2008.06152.x.
188. Ding C, Zou Q, Wang F, Wu H, Chen R, Lv J, Ling M, Sun J, Wang W, Li H, Huang B. Human amniotic mesenchymal stem cells improve ovarian function in natural aging through secreting hepatocyte growth factor and epidermal growth factor. *Stem Cell Res Ther.* 2018; 9(1): 55. doi: 10.1186/s13287-018-0781-9.
189. Steger RW, Peluso JJ. Effects of age on hormone levels and in vitro steroidogenesis by rat ovary and adrenal. *Exp Aging Res.* 1982; 8(3-4): 203-208. doi: 10.1080/03610738208260367.
190. Wise PM. Alterations in proestrous LH, FSH, and prolactin surges in middle-aged rats. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1982; 169(3): 348-354. doi: 10.3181/00379727-169-41356;
191. Bahougne T, Angelopoulou E, Jeandidier N, Simonneaux V. Individual evaluation of luteinizing hormone in aged C57BL/6 J female mice. *Geroscience.* 2020; 42(1): 323-331. doi: 10.1007/s11357-019-00104-z.
192. Aravamudan B, Thompson M, Pabelick C, Prakash YS. Brain-derived neurotrophic factor induces proliferation of human airway smooth muscle cells. *J Cell Mol Med.* 2012; 16(4): 812-823. doi:10.1111/j.1582-4934.2011.01356.x;
193. Kwapiszewska G, Chwalek K, Marsh LM, Wygrecka M, Wilhelm J, Best J, Egemnazarov B, Weisel FC, Osswald SL, Schermuly RT, Olschewski A, Seeger W, Weissmann N, Eickelberg O, Fink L. BDNF/TrkB signaling augments smooth muscle cell proliferation in pulmonary hypertension. *Am J Pathol.* 2012; 181(6): 2018-2029. doi: 10.1016/j.ajpath.2012.08.028.

194. Zierold S, Buschmann K, Gachkar S, Bochenek ML, Velmeden D, Hobohm L, Vahl CF, Schäfer K. Brain-derived neurotrophic factor expression and signaling in different perivascular adipose tissue depots of patients with coronary artery disease. *J Am Heart Assoc.* 2021; 10(6): e018322. doi: 10.1161/JAHA.120.018322.
195. González-González A, García-Sánchez D, Dotta M, Rodríguez-Rey JC, Pérez-Campo FM. Mesenchymal stem cells secretome: The cornerstone of cell-free regenerative medicine. *World J Stem Cells.* 2020; 12(12): 1529-1552. doi: 10.4252/wjsc.v12.i12.1529.
196. Greene LA, Tischler AS. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1976; 73(7) :2424-2428. doi: 10.1073/pnas.73.7.2424.
197. Hu R, Cao Q, Sun Z, Chen J, Zheng Q, Xiao F. A novel method of neural differentiation of PC12 cells by using Opti-MEM as a basic induction medium. *Int J Mol Med.* 2018; 41(1): 195-201. doi: 10.3892/ijmm.2017.3195.
198. Iwasaki Y, Ishikawa M, Okada N, Koizumi S. Induction of a distinct morphology and signal transduction in TrkB/PC12 cells by nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor. *J Neurochem.* 1997; 68(3): 927-34. doi: 10.1046/j.1471-4159.1997.68030927.x..
199. Mohtaram NK , Ko J , Agbay A , Rattray D , Neill PO , Rajwani A , Vasandani R , Thu HL , Jun MBG , Willerth SM . Development of a glial cell-derived neurotrophic factor-releasing artificial dura for neural tissue engineering applications. *J Mater Chem B.* 2015; 3(40): 7974-7985. doi: 10.1039/c5tb00871a.
200. Mishra S, Kelly KK, Rumian NL, Siegenthaler JA. Retinoic acid is required for neural stem and progenitor cell proliferation in the adult hippocampus. *Stem Cell Reports.* 2018; 10(6):1705-1720. doi: 10.1016/j.stemcr.2018.04.024.

201. Shirai N, Houle C, Mirsky ML. Using Histopathologic evidence to differentiate reproductive senescence from xenobiotic effects in middle-aged female sprague-dawley rats. *Toxicol Pathol.* 2015; 43(8): 1158-1161. doi: 10.1177/0192623315595137.
202. Yilmaz S, Yilmaz Sezer N, Gönenç İM, İlhan SE, Yilmaz E. Safety of clomiphene citrate: a literature review. *Cytotechnology.* 2018; 70(2): 489-495. doi: 10.1007/s10616-017-0169-1.
203. Lindheim SR, Glenn TL, Smith MC, Gagneux P. Ovulation induction for the general gynecologist. *J Obstet Gynaecol India.* 2018; 68(4): 242-252. doi: 10.1007/s13224-018-1130-8.
204. Penzias A, Bendikson K, Butts S, et al. Role of metformin for ovulation induction in infertile patients with polycystic ovary syndrome (PCOS): A guideline. *Fertil Steril.* 2017; 108(3) :426–441. doi: 10.1016/j.fertnstert.2017.06.026.
205. The ESHRE Guideline Group on POI and others, ESHRE Guideline: management of women with premature ovarian insufficiency. *Human Reproduction.* 2016; 31(5): 926–937. <https://doi.org/10.1093/humrep/dew027>.
206. Kim JH, Park SH, Han J, Ko PW, Kwon D, Suk K. Gliome database: a comprehensive web-based tool to access and analyze glia secretome data. Database (Oxford). 2020 Jan 1;2020:baaa057. www.gliome.org, doi: 10.1093/database/baaa057,
207. Sendter M., Schmalbruch H., Stockli K.A., Carroll P., Kreutzberg G.W., Thoenen H. Ciliary neurotrophic factor prevents degeneration of motor neurons in mouse mutant progressive motor neuronopathy. *Nature.* 1992;358:502–504. doi: 10.1038/358502a0;
208. Mitsumoto H, Ikeda K, Klinkosz B, Cedarbaum JM, Wong V, Lindsay RM. Arrest of motor neuron disease in wobbler mice cotreated with CNTF and BDNF. *Science.* 1994 Aug 19;265(5175):1107-10. doi: 10.1126/science.8066451.

209. Gash D.M., Zhang Z., Ovadia W.A.G., Cass W.A., Yi A., Simmerman L., Russell D., Martin D., Lapchak P.A., Collins F., et al. Functional recovery in Parkinsonian monkeys treated with GDNF. *Nature*. 1996;380:252–255. doi: 10.1038/380252a0
210. Rolan P.E., O’Neil G., Versage E., Rana J., Tang Y., Galluppi G., Aycardi E. First-in-human, double-blind, placebo-controlled, randomized, dose-escalation study of BG00010, a glial cell line-derived neurotrophic factor family member, in subjects with unilateral sciatica. *PLoS ONE*. 2015;10:e0125034. doi: 10.1371/journal.pone.0125034. ;
211. Lang A.E., Gill S., Patel N.K., Lozano A., Nutt J.G., Penn R., Brooks D.J., Hotton G., Moro E., Heywood P., et al. Randomized controlled trial of intraputamenal glial cell line-derived neurotrophic factor infusion in Parkinson disease. *Ann. Neurol*. 2006;59:459–466. doi: 10.1002/ana.20737. ;
212. Zhang K., Hopkins J.J., Heier J.S., Birch D.G., Halperin L.S., Albin T.A., Brown D.M., Jaffe G.J., Tao W., Williams G.A. Ciliary neurotrophic factor delivered by encapsulated cell intraocular implants for treatment of geographic atrophy in age-related macular degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2011;108:6241–6245. doi: 10.1073/pnas.1018987108.;
213. Gill S.S., Patel N.K., Hotton G.R., O’Sullivan K., McCarter R., Bunnage M., Brooks D.J., Svendsen C.N., Heywood P. Direct brain infusion of glial cell line-derived neurotrophic factor in Parkinson disease. *Nat. Med*. 2003;9:589–595. doi: 10.1038/nm850. ;
214. Nutt J.G., Burchiel K.J., Comella C.L., Jankovic J., Lang A.E., Laws E.R., Jr., Lozano A.M., Penn R.D., Simpson R.K., Jr., Stacy M., et al. Randomized, double-blind trial of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) in PD. *Neurology*. 2003;60:69–73. doi: 10.1212/WNL.60.1.69.
215. Marlin MC, Li G. Biogenesis and function of the NGF/TrkA signaling endosome. *Int Rev Cell Mol Biol*. 2015;314:239-257. doi:10.1016/bs.ircmb.2014.10.002.

216. Jackson, T. C. , Rani, A. , Kumar, A. , & Foster, T. C. (2009). Regional hippocampal differences in AKT survival signaling across the lifespan: Implications for CA1 vulnerability with aging. *Cell Death and Differentiation*, 16(3), 439–448. 10.1038/cdd.2008.171.
217. Seawright JW, Sreenivasappa H, Gibbs HC, et al. Vascular Smooth Muscle Contractile Function Declines With Age in Skeletal Muscle Feed Arteries. *Front Physiol.* 2018;9:856. Published 2018 Jul 31. doi:10.3389/fphys.2018.00856;
218. Elmes M, Szyszka A, Pauliat C, Clifford B, Daniel Z, Cheng Z, Wathes C, McMullen S. Maternal age effects on myometrial expression of contractile proteins, uterine gene expression, and contractile activity during labor in the rat. *Physiol Rep.* 2015; 3(4):e12305. doi: 10.14814/phy2.12305. PMID: 25876907; PMCID: PMC4425948
219. Somara S, Gilmont RR, Martens JR, Bitar KN. Ectopic expression of caveolin-1 restores physiological contractile response of aged colonic smooth muscle. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2007 ; 293(1): G240-9. doi: 10.1152/ajpgi.00064.2007.
220. Barcena de Arellano ML, Oldeweme J, Arnold J, et al. Remodeling of estrogen-dependent sympathetic nerve fibers seems to be disturbed in adenomyosis. *Fertil Steril.* 2013; 100 (3): 801-809. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.05.013>;
221. Uvnäs-Moberg, K., Ekström-Bergström, A., Berg, M. et al. Maternal plasma levels of oxytocin during physiological childbirth – a systematic review with implications for uterine contractions and central actions of oxytocin. *BMC Pregnancy Childbirth.* 2019; 19: 285. <https://doi.org/10.1186/s12884-019-2365-9>.
222. Browne AS, Yu J, Huang RP, et al. Proteomic identification of neurotrophins in the eutopic endometrium of women with endometriosis. *Fertil Steril.* 2012; 98 (3): 713–719. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.05.027>

223. Vrachnis N, Malamas FM, Sifakis S, et al. The oxytocin-oxytocin receptor system and its antagonists as tocolytic agents [Internet]. *Int J Endocrinol*; 2011[cited 2011 Jul 2011]. <https://doi.org/10.1155/2011/350546>.
224. Hanani M, Spray DC. Author Correction: Emerging importance of satellite glia in nervous system function and dysfunction. *Nat Rev Neurosci*. 2020; 21(12): 732. doi: 10.1038/s41583-020-00402-y.
225. Donegan, M., Kernisant, M., Cua, C., Jasmin, L. & Ohara, P. T. Satellite glial cell proliferation in the trigeminal ganglia after chronic constriction injury of the infraorbital nerve. *Glia*. 201;361, 2000–2008.
226. Avraham O, Deng PY, Jones S, Kuruvilla R, Semenkovich CF, Klyachko VA, Cavalli V. Satellite glial cells promote regenerative growth in sensory neurons. *Nat Commun*. 2020; 11(1): 4891. doi: 10.1038/s41467-020-18642-y.

ДОДАТОК А

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації

Статті у фахових журналах України

6. Нестерук Г. В., Колот Н. В., Проценко О. С., Падалко В. І., Легач Є. І. Вплив кріоекстракту спінальних гангліїв на структурно-функціональні характеристики яєчників щурів різного віку. Вісник проблем біології і медицини. 2020, 4(158): 173-177. <http://dx.doi.org/10.29254/2077-4214-2020-4-158-173-177>
7. Нестерук Г.В., Легач Є.І. Біологічні ефекти низькомолекулярної фракції кріоекстракту спінальних гангліїв на репродуктивну систему самиць щурів. Вісник проблем біології і медицини. 2023, 2 (169): 402-409. <http://dx.doi.org/10.29254/2077-4214-2023-2-169-402-409>

Статті у фахових журналах, внесених у міжнародну базу Scopus

8. Нестерук Г.В., Устиченко В.Д., Алабедацькарім Н.М., Падалко В.І., Проценко О.С., Легач Є.І. Вплив кріоекстракту спінальних гангліїв на гістологічні характеристики та скорочувальну активність матки щурів різного віку. Проблеми кріобіології і кріомедицини. 2021; 31(3):258–267. <https://doi.org/10.15407/cryo31.03.258>
9. Нестерук Г.В., Алабедацькарім Н.М., Колот Н.В., Комаромі Н.А., Проценко О.С., Легач Є.І. Вплив кондиційованих середовищ від культур гліальних клітин на репродуктивну систему щурів різного віку. Проблеми ендокринної патології. 2022; 2: 88-96. <https://doi.org/10.21856/j-PEP.2022.2.13>
10. Nesteruk H.V., Alabedalkarim N.M., Komaromi N.A., Tkachenko N.O., Protsenko O.S., Lehach E.Y. Influence of conditioned media from glial cell cultures

on contractility of uterine in rats of different ages . Reproductive Endocrinology. 2022; 1-2 (63-64):85–90. <https://doi.org/10.18370/2309-4117.2022.63.85-90>

Наукові праці які засвідчують апробацію матеріалів дисертації

13. Нестерук А. В., Устиченко В. Д., Алабедацькарим Н. М., Легач Е. И., Бондаренко Т. П. Морфофункціональні характеристики матки крыс позднего репродуктивного возраста при введении криоэкстракта спинальных ганглиев // Dynamics of the development of world science. Abstracts of the 9th International scientific and practical conference. Perfect Publishing. Vancouver, Canada. 2020. P. 756-761.
14. Нестерук Г.В, Колот Н.В., Проценко О.С., Падалко В.І., Шаповал О.В., Легач Є.І. Вплив кріоекстракту спінальних гангліїв на складові пулу жовтих тіл в яєчниках щурів різного віку. Матеріали Четвертої Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю «Теорія та практика сучасної морфології», Дніпро, 4-6 листопада 2020. – С. 79-81.
15. Нестерук Г.В., Устиченко В.Д., Алабедацькарім Н.М., Легач Є.І. Вплив кріоекстракту спінальних гангліїв на естральний цикл щурів різного віку // Науково-практична конференція «Фундаментальні науки – практичній медицині: морфо-функціональні методи дослідження онтогенетичних перетворень, фізіологічних та метаболічних процесів, змодельованих патологічних станів, при захворюваннях внутрішніх органів (присвяченої 80-річчю з Дня народження професора Шутки Б.В.)», Івано-Франківськ, Івано-Франківський національний медичний університет, 30 вересня - 2 жовтня 2020, С. 44-46.
16. Nesteruk H., Legach E. Impact of spinal ganglia cryoextract introduction on contractile activity of uterine myometrium of late reproductive age rats. Щорічна міжнародна конференція молодих вчених «Cold in Biology and Medicine: Current Problems in Cryobiology, Transplantology, and Biotechnology», Харків, 2020, Problems of Cryobiology and Cryomedicine, 2020; 30(3), 291. <https://doi.org/10.15407/cryo30.03.291>

17. Nesteruk H., Legach E. Uterine contractility in aged rats after administration of conditioned media from cryopreserved glial cell culture, Щорічна міжнародна конференція молодих вчених «Cold in Biology and Medicine: Current Problems in Cryobiology, Transplantology, and Biotechnology», Харків, 25 травня, 2022, Problems of Cryobiology and Cryomedicine, 2022; 32 (4), 300. <https://doi.org/10.15407/cryo32.04.300>
18. Нестерук Г.В., Устиченко В.Д., Алабедацькарім Н.М., Легач Є.І., Шевцова М.Ю. Вплив кріоекстракту спінальних гангліїв на KCl-індуковану скорочувальну активність матки щурів різного віку. Матеріали XI Міжнародної науково-практичної конференції «Actual trends of modern scientific research», 6-8 червня 2021, Мюнхен, Німеччина; 2021: 114-119.
19. Нестерук Г.В., Сидоренко О.С., Легач Є.І. Нейротрофін-подібна активність кондиціонованих середовищ від культур клітин зі спінальних гангліїв. Матеріали VI Міжнародної науково-практичної конференції «European scientific congress», 10-12 липня, 2023, Мадрид, Іспанія; 2023: 48-52.

ДОДАТОК Б

Відомості про апробацію результатів дисертації

Результати роботи були представлені на наступних наукових конференціях:

- на IV Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю «Теорія та практика сучасної морфології» (м. Дніпро, Україна, 2020);
- на Науково-практичній конференції «Фундаментальні науки – практичній медицині: морфо-функціональні методи дослідження онтогенетичних перетворень, фізіологічних та метаболічних процесів, змодельованих патологічних станів, при захворюваннях внутрішніх органів (присвяченої 80-річчю з Дня народження професора Шутки Б.В.)» (м. Івано-Франківськ, 2020);
- на IX науково-практичній міжнародній конференції «Dynamics of the development of world science» (м. Ванкувер, Канада, 2020);
- на конференції молодих вчених ІПКіК НАН України «Холод в біології і медицині: Актуальні питання кріобіології, трансплантології та біотехнології» (м. Харків, Україна, 2021);
- на XI Міжнародній науково-практичній конференції «Actual trendsof modern scientific research» (м. Мюнхен, Німеччина, 2021);
- на конференції молодих вчених ІПКіК НАН України «Холод в біології і медицині: Актуальні питання кріобіології, трансплантології та біотехнології» (м. Харків, Україна, 2022);
- на VI Міжнародній науково-практичній конференції «European scientific congress»(м. Мадрид, Іспанія, 2023).