

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

на правах рукопису

ПРОКОПЮК ОЛЬГА СТЕПАНІВНА

УДК:615.361.013.85.014.41:612.66

**КРІОКОНСЕРВУВАННЯ ПЛАЦЕНТИ ТА ВИЗНАЧЕННЯ
МЕХАНІЗМІВ ЇЇ ВПЛИВУ НА ОРГАНІЗМ РЕЦИПІЄНТІВ ПІЗНЬОГО
ОНТОГЕНЕЗУ
(експериментальне дослідження)**

14.01.35 – кріомедицина

Дисертація

на здобуття наукового ступеня доктора медичних наук

Науковий консультант:

Грищенко Валентин Іванович

академік НАН України,

доктор медичних наук, професор

Харків – 2014

ЗМІСТ

ЗМІСТ	2
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	6
ВСТУП.....	8
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	18
1.1. Сучасний стан проблеми кріоконсервування біологічних об'єктів (механізми кріоушкодження і можливості кріозахисту).....	18
1.2. Морфофункціональні характеристики плаценти як об'єкта кріоконсервування	35
1.3. Досягнення і перспективи клінічного застосування біоб'єктів плацентарного походження	46
1.4. Сучасні уявлення про механізми старіння та геропротектори	52
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	66
2.1. Обґрунтування обраного напрямку.....	66
2.2. Методи отримання субклітинних, клітинних та тканинних органоспецифічних біоб'єктів плацентарного походження.....	68
2.3. Методи кріоконсервування біоб'єктів плацентарного походження.....	74
2.4. Методи оцінки морфофункціонального стану кріоконсервованих біоб'єктів плацентарного походження...	77
2.5. Методологія досліджень властивостей кріоконсервованих біоб'єктів плацентарного походження в системі <i>in vitro</i>	80
2.6. Методологія досліджень динаміки біологічного впливу кріоконсервованих біоб'єктів плацентарного походження на організм в експерименті.....	81
2.7. Методологія верифікації біологічної безпеки біоб'єктів плацентарного походження	82

2.8.	Методологія досліджень впливу кріоконсервованих фрагментів плаценти на організм тварин пізнього онтогенезу.....	86
2.9.	Методи визначення науково-організаційних принципів створення і функціонування низькотемпературних банків біооб'єктів плацентарного походження.....	91
2.10.	Методи статистичної обробки отриманих даних.....	91
2.11	Біоетичні протоколи.....	91
РОЗДІЛ 3.	МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН КРІОКОНСЕРВОВАНИХ БІООБ'ЄКТІВ ПЛАЦЕНТАРНОГО ПОХОДЖЕННЯ РІЗНОГО СТУПЕНЯ ДЕЗІНТЕГРАЦІЇ.....	93
3.1.	Клініко-лабораторні критерії вихідного стану плаценти для її використання в кріобіологічних дослідженнях.....	93
3.2.	Динаміка складу і вмісту есенціальних сполук в кріоекстракті плаценти під дією різних кріопрограм.....	96
3.3.	Результати розробки програм кріоконсервування клітин і тканин плаценти.....	99
3.4.	Вплив кріоконсервування на властивості суспензії клітин плаценти.....	104
3.5.	Вплив низькотемпературного консервування на морфофункціональний стан фрагментів плаценти.....	107
РОЗДІЛ 4.	ВЕРИФІКАЦІЯ БІОЛОГІЧНОЇ ДІЇ ТА БІОБЕЗПЕЧНОСТІ КРІОКОНСЕРВОВАНИХ БІООБ'ЄКТІВ ПЛАЦЕНТАРНОГО ПОХОДЖЕННЯ	127
4.1.	Вплив кріоконсервованих біооб'єктів плацентарного походження на культури клітин	127
4.2.	Динаміка активності та тривалість функціонування кріоконсервованих біооб'єктів плацентарного походження в організмі експериментальних тварин.....	132

4.3.	Результати дослідження вірогідної аномальної токсичності, ембріотоксичності та тератогенності кріоконсервованих біооб'єктів плацентарного походження	140
РОЗДІЛ 5	ВПЛИВ КРІОКОНСЕРВОВАНИХ ФРАГМЕНТІВ ПЛАЦЕНТИ НА ОРГАНІЗМ ТВАРИН ПІЗЬНОГО ОНТОГЕНЕЗУ	173
5.1.	Вплив кріоконсервованих фрагментів плаценти на організм самців експериментальних тварин пізнього онтогенезу.....	174
5.1.1.	Загальна характеристика тварин.....	174
5.1.2.	Стан серцево-судинної системи експериментальних тварин у групах спостереження.....	174
5.1.3.	Морфофункціональний стан печінки самців експериментальних тварин.....	183
5.1.4.	Вплив імплантації кріоконсервованих фрагментів плаценти на статеву систему і репродуктивну функцію самців у період пізнього онтогенезу.....	191
5.2.	Вплив імплантації кріоконсервованих фрагментів плаценти на самиць пізнього онтогенезу.....	204
5.2.1.	Загальна характеристика тварин.....	204
5.2.2.	Стан серцево-судинної системи експериментальних самиць у групах спостереження.....	204
5.2.3.	Морфофункціональний стан печінки експериментальних тварин.....	214
5.2.4.	Вплив імплантації кріоконсервованих фрагментів плаценти на статеву систему і репродуктивну функцію самиць у період пізнього онтогенезу	222

5.3.	Вплив імплантації кріоконсервованих фрагментів плаценти на стан про- та антиоксидантної системи експериментальних тварин пізнього онтогенезу.....	234
РОЗДІЛ 6.	НАУКОВО-ОРГАНІЗАЦІЙНІ ПРИНЦИПИ СТВОРЕННЯ І ФУНКЦІОНУВАННЯ НИЗЬКОТЕМПЕРАТУРНИХ БАНКІВ БІОБ'ЄКТІВ ПЛАЦЕНТАРНОГО ПОХОДЖЕННЯ.....	243
	АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ.....	272
	ВИСНОВКИ.....	305
	ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ.....	309
	ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	311

ПЕПЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АКТГ – адренокортикотропний гормон

АОС – антиоксидантна система

АТФ – аденозинтрифосфорна кислота

АФП – альфафетопротейн

БАР – біологічно активні речовини

БПП – біооб'єкти плацентарного походження

ВРО – вільнорадикальне окислення

ГЕК – гідроксиетилкрохмаль

ГП – глутатіонпероксидаза

ДМСО – диметилсульфоксид

ДМФА – диметилформамід

ДНП – дезоксирибонуклеопротейди

ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота

ЕПР – ендоплазматичний ретикулум

ІФА – імуноферментний аналіз

ІЛ – інтерлейкін

КБПП – кріоконсервовані біооб'єкти плацентарного походження

КЕП – кріоконсервований екстракт плаценти

ККП – кріоконсервовані клітини плаценти

КУЗ – колонієутворююча здатність

КФП – кріоконсервовані фрагменти плаценти

МДА – малоновий диальдегід

МКА – моноклональні антитіла

МСК – мезенхімальні стовбурові клітини

НТБ – низькотемпературний банк

НТБ БО – низькотемпературний банк біологічних об'єктів

ПВП – полівінілпіролідон

1,2-ПД – 1,2-пропандіол

ПД – плацентарна дисфункція

ПЕГ – поліетиленгліколь

ПЕО – поліетиленоксид

ПЛ – пролактин

ПН – плацентарна недостатність

ПОЛ – перекисне окислення ліпідів

РНП – рибонуклеопротейди

СЗРП – синдром затримки розвитку плода

СКП – суспензія клітин плаценти

СПКЛ – сироватка плацентарної крові людини

УЗД – ультразвукове дослідження

УО – умовні одиниці

ЦП – церулоплазмін

ХГЛ – хоріонічний гонадотропін людини

ШО – Шифові основи

ЕКЗ – екстракорпоральне запліднення

ЯМР – ядерно-магнітний резонанс

CD – cluster differentiation (кластер диференціювання)

ЕАТБ – European Association for Tissue Banking (Європейська Асоціація
Тканинних Банків)

ЕСАСС – (Європейська колекція клітинних культур)

IFA – immune ferment analysis (імуноферментний аналіз)

PCR – polymerase chain reaction (полімеразна ланцюгова реакція)

ВСТУП

Актуальною та сучасною проблемою медико-біологічної науки є фундаментальні та експериментальні дослідження, метою яких є розробка біотехнологій кріоконсервування та довгострокового зберігання біоб'єктів плацентарного походження (БПП). Це зумовлено потенціальною здатністю БПП до біокорекції дистрофічних процесів і репарації морфофункціональних ушкоджень, що розвиваються в організмі з віком [20, 81, 91, 104, 136, 162, 274].

Сучасна демографічна ситуація характеризується суттєвим збільшенням частини населення похилого віку [9, 61, 122, 142]. Існуючі профілактично-терапевтичні програми корекції геріатричної патології є мультикомпонентними, їх фармакологічна складова представлена багатьма класами лікарських препаратів, застосування яких в багатьох випадках призводить до ускладнень від фармакологічної агресії [40, 41, 50, 51, 54, 183]. Водночас, недостатня ефективність існуючих геропротекторів обумовлює активний пошук природних комплексних біорегуляторів, дія яких спрямована на відновлення порушених з віком функцій організму. В цьому аспекті увагу вчених привертає плацента і БПП.

Плацента синтезує та містить велику кількість ростових факторів, вона є природним „депо” біологічно активних речовин (БАР) різних класів [45, 136, 158]. Доведена наявність в складі плаценти імунокомпетентних, гемопоетичних, стовбурових, прогеніторних клітин різної спеціалізації і ступеня диференціювання [42, 111, 127]. Плацента впливає на організм матері та плода в системі зворотних зв'язків за рахунок міжклітинних взаємодій, паракринної, ендокринної та імунної регуляції. Плацента забезпечує органогенез, а також компенсаторні можливості плода під час пологів. В основному, завдяки плацентарним факторам, плід має високий ступінь толерантності до гіпоксичних, компресійних, стресорних впливів, лабільності серцевої діяльності, кровообігу, мікроциркуляції та інше [136].

Враховуючи ці специфічні властивості плаценти, в результаті експериментальних та доклінічних досліджень отримано позитивні результати застосування біопрепаратів плаценти при корекції ряду патологічних станів [29, 30, 59, 94, 96, 160, 291]. Проте, на даний час не визначені механізми реалізації цих терапевтичних ефектів, не з'ясована роль складових плаценти в саногенезі при її застосуванні. Тобто, невідомо, завдяки чому БПП здійснюють терапевтичний вплив: біологічно активним сполукам, клітинам, або тканині плаценти, що зберегла вітальність. Не з'ясовано особливості біологічної дії БПП різного ступеня дезінтеграції – фрагментів, клітин, екстрактів, що містять есенціальні сполуки плаценти.

Питанням вивчення дії препаратів фетоплацентарного комплексу в геронтології присвячено поодинокі роботи, в яких не повністю розкрита дана проблема та наводяться суперечливі дані [50, 82, 95, 261].

При включенні БПП до терапевтичних програм лікування пацієнтів старшого віку можна очікувати, що вищезазначені ефекти трансформуються в процеси ремоделювання органів і відновлення функцій. На нашу думку, це дозволить більш ефективно лікувати інволютивно-сенільні, ендокринні захворювання; коригувати дегенеративні процеси, імунологічні, метаболічні порушення, потенціювати репарацію; регулювати проліферацію, підвищувати толерантність до несприятливих чинників та адаптаційні властивості організму пацієнтів старшого віку.

Терапія з використанням клітин, тканин чи есенціальних сполук плаценти в геріатричній практиці є доцільною з патогенетичної точки зору, але потребує збереження їх природного складу і активності, що наразі можуть забезпечити тільки кріологічні біотехнології. Морфологія, фізіологія та молекулярна біологія плаценти суттєво змінюються протягом гестаційного періоду, це зумовлює специфічність методів її отримання, кріоконсервування і використання в клінічній і експериментальній медицині. Таким чином, актуальною є проблема створення ефективних програм отримання та

кріоконсервування складових плаценти, визначення оптимальних швидкостей заморожування-відтаювання та кріозахисних розчинів для зберігання плацентарних структур при ультранизких температурах. Це пов'язано з тим, що на теперішній час остаточно не визначено механізми кріоушкоджень, які відбуваються в плаценті на етапах кріоконсервування. Проблема ускладнюється тим, що кріочутливість і механізми біологічної дії БПП різного ступеня дезінтеграції (фрагментів, клітин, есенціальних сполук) є неоднаковими.

Кріоконсервування може змінити морфофункціональний стан і склад БПП, що поряд з потужним потенціалом їх впливу зумовлює необхідність проведення досліджень відносно можливих негативних реакцій і ускладнень при проведенні терапії з використанням кріоконсервованих біооб'єктів плацентарного походження (КБПП).

Забезпечення біобезпеки пацієнта і його нащадків, широкі експериментальні і клінічні дослідження ефективності БПП в ало-, ксено- і аутосистемах неможливе без створення низькотемпературного банку (НТБ) кріоконсервованих біооб'єктів плацентарного походження.

У зв'язку з вищезазначеним дослідження, спрямовані на розробку новітніх біотехнологій, ефективних програм кріоконсервування плаценти та її похідних, створення НТБ КБПП, визначення механізмів і біобезпеки плацентарної терапії в геріатричній практиці, є актуальними з наукової і практичної точки зору.

Зв'язок з науковими програмами, планами, темами. Дисертація виконана у відділі „Низькотемпературний банк біологічних об'єктів” Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України в рамках науково-дослідних робіт, науковим керівником і відповідальним виконавцем яких була автор дисертації: «Проведення наукових досліджень, розробка та втілення інформаційних, організаційних та технічних заходів, необхідних для збереження і використання наукового об'єкта – низькотемпературного банку

біологічних об'єктів» (№ ДР 0104U006441), «Вивчення механізмів кріостійкості тканин та екстрактів плаценти до дії низьких температур» (№ ДР 0109U00277), договорів №№ 2Н/11–02–12 з Національною академією наук України на виконання заходів для забезпечення належного функціонування та збереження наукового об'єкта, що становить національне надбання держави – НТБ біологічних об'єктів Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України.

Мета і задачі дослідження. Метою роботи є визначення процесів, що відбуваються на етапах кріоконсервування в біооб'єктах, що отримані з плаценти 36-38 тижнів гестації, розробка оптимальних для медичного застосування методів їх кріоконсервування та встановлення основних механізмів їх впливу на організм при віковій патології.

Відповідно до поставленої мети передбачалося вирішити наступні задачі:

1. Встановити клінічні, морфологічні і біохімічні показники плаценти, що є критеріями доцільності її використання в якості джерела для отримання фрагментів, клітин та кріоекстракту плаценти.
2. Отримати біологічні структури плаценти 36-38 тижнів гестації різного ступеня дезінтеграції (фрагменти, клітини, комплекс біологічно активних речовин (БАР) плаценти) та визначити їх морфофункціональні характеристики.
3. Оцінити структурно-функціональні зміни, що відбуваються в БПП під впливом низьких температур, та ефективність протоколів кріоконсервування.
4. Створити ефективні програми кріоконсервування фрагментів, клітин та кріоекстракту плаценти 36-38 тижнів гестації, отримати КБПП, дослідити збереженість їх аутентичних властивостей.
5. Встановити особливості функціонування кріоконсервованих фрагментів, клітин та кріоекстракту плаценти 36-38 тижнів гестації в системі *in vitro*:

дослідити вплив КБПП на клітинну тест-культуру *BHK-21 clone 13/04*, на її проліферативну активність, мітотичний режим, цитогенетичну стабільність.

6. Виявити особливості впливу КБПП на організм в динаміці, встановити початок, пік і тривалість безпосередньої їх дії *in vivo*, обґрунтувати диференційовані показання/протипоказання для призначення в похилому віці КБПП різного ступеня дезінтеграції.
7. Провести дослідження вірогідної побічної дії отриманих КБПП: аномальної токсичності, ембріолетальної, тератогенної дії з метою забезпечення біобезпеки при їх використанні для корекції інволютивних процесів.
8. З'ясувати вплив КБПП на організм лабораторних тварин пізнього онтогенезу з метою патогенетичного обґрунтування застосування КБПП в геронтології.
9. На основі системного аналізу отриманих даних встановити основні механізми дії КБПП на організм в період пізнього онтогенезу.
10. Сформулювати науково-організаційні принципи створення і функціонування НТБ КБПП.

Об'єкт дослідження: вплив факторів кріоконсервування на морфофункціональний стан біооб'єктів плацентарного походження та механізми їх дії при патологічних вікових змінах.

Предмет дослідження: кріоконсервовані біооб'єкти плацентарного походження низькотемпературного банку, пізній онтогенез.

Методи дослідження. У роботі використані сучасні методи експериментальної медицини, кріомедицини та кріобіології: клітинні та тканинні біотехнології; клініко-лабораторні, клініко-інструментальні, імуноферментні, спектрофотометричні, імуногістохімічні, біохімічні, гістологічні дослідження; культивування *in vitro*; проточна цитофлуориметрія, електронна мікроскопія; морфометричний аналіз, тести на аномальну

токсичність, тератогенність, ембріолетальність, методи статистичного аналізу отриманих даних.

Наукова новизна отриманих результатів. Дисертаційна робота є вирішенням на сучасному рівні наукової медико-біологічної проблеми кріоконсервування БПП різного ступеня дезінтеграції з теоретичним обґрунтуванням і експериментальною розробкою корекції сенільно-інволютивних змін методом імплантації кріоконсервованих плацентарних біооб'єктів.

Вперше запропоновано клінічні, біохімічні і морфологічні критерії вихідного стану плаценти щодо можливості її використання в якості джерела для отримання БПП з метою їх подальшого кріоконсервування. В результаті комплексного морфофункціонального дослідження плацентарних біооб'єктів різного ступеня дезінтеграції (фрагментів, клітин, комплексу есенціальних сполук плаценти) вперше науково обґрунтовано і застосовано моделювання програм їх кріоконсервування, досліджено вплив на них низьких температур, в присутності екзо– і ендоцелюлярних кріопротекторів, а також при визначених режимах заморожування-відтаювання.

Вперше визначено специфіку отримання та кріоконсервування плацентарних біооб'єктів різного ступеня дезінтеграції, а також відмінності їх функціонування в системах *in vitro*, *in vivo* та біологічної дії.

Отримано нові дані щодо дії плацентарних біооб'єктів *in vitro*, а саме – вперше доведено стимулюючий вплив кріоконсервованих фрагментів плаценти (КФП) і клітин плаценти на проліферативну активність клітинних культур. Відсутність цитотоксичної, мутагенної дії, ембріотоксичного та тератогеного впливу вперше дозволили верифікувати біобезпечність імплантації КФП.

Вперше патогенетично обґрунтовано застосування імплантації КФП при віковій патології та визначено, що механізм їх впливу на організм впродовж пізнього онтогенезу реалізується через активацію білоксинтезуючої

функції, судинного компонента, репаративних процесів, купірування прооксидантних, ініціацію антиоксидантних реакцій та інгібування процесів апоптозу.

Вперше доведено особливості саногенезу під впливом плацентарної терапії в репродуктивній системі в залежності від статі. Встановлено, що у осіб чоловічої статі відновлюється як сексуальна, так і генеративна функції. В жіночому організмі сенільні прояви в органах репродукції підлягають зворотньому позитивному розвитку: виявлено ремоделювання та циклічні зміни яєчників і матки, проте генеративна функція не відновлюється. Показана ефективність та встановлено регенеруючий характер впливу КФП на організм в пізньому онтогенезі, що розширює можливості геріатрії і геронтології у вирішенні проблеми подовження активного довголіття, покращення якості життя в похилому віці. Вперше сформульовано науково-організаційні принципи створення і функціонування низькотемпературного банку кріоконсервованих біооб'єктів плацентарного походження для експериментального і клінічного використання.

Практичне значення отриманих результатів. Оптимізовано біотехнології отримання і кріоконсервування фрагментів, клітин та екстрактів плаценти, що дозволяє створювати колекції КБПП для ало-, ауто- та ксеногенного використання в експерименті та в медичній практиці.

На основі системного аналізу експериментальних даних проведено патогенетичне обґрунтування використання КБПП в геронтологічній практиці, що відкриває можливості для більш ефективної корекції геріатричних змін.

Реалізація визначених науково-організаційних принципів діяльності НТБ КБПП дозволить створювати кріобанки, які мають загальнодержавне значення.

Теоретичні положення і практичні рекомендації дисертаційної роботи впроваджені в навчальний процес кафедр Харківського національного

медичного університету, Харківського національного університету ім. В.Н. Каразіна, Харківської медичної академії післядипломної освіти, Івано-Франківського національного медичного університету, в науково-дослідницьку роботу кафедри клінічної фармакології Інституту підвищення кваліфікації спеціалістів фармації Національного фармацевтичного університету м. Харкова, в роботу НТБ біологічних об'єктів ІПКіК НАН України, ДП «Міжвідомчий науковий центр кріобіології і кріомедицини НАН, МОЗ, АМН України».

Особистий внесок здобувача. Дисертантом самостійно обрана тема дисертації, проведено інформаційно-патентний пошук, проаналізована наукова література за темою дисертації, сформульовані мета, задачі дослідження та способи їх вирішення, розроблено методологічні підходи до експериментальної програми. Самостійно виконано експерименти щодо розробки біотехнологій отримання та кріоконсервування БПП, проведено дослідження їх стану, складу і біологічної дії. Автором розроблено та запроваджено науково-організаційні принципи роботи НТБ КБПП, проведено статистичну обробку отриманих даних, аналіз результатів дослідження, обґрунтовано основні положення дисертаційної роботи, написано усі розділи дисертації, сформульовано висновки та практичні рекомендації.

Автор висловлює щире подяку науковому консультанту академіку НАН України В.І.Грищенко, колективу відділу НТБ біологічних об'єктів ІПКіК НАН України, а також всім співавторам наукових публікацій за допомогу в проведенні експериментів, за участь в обговоренні результатів та за наукові дискусії, що дозволило краще спланувати і виконати дисертаційне дослідження.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертації доповідались і обговорювались на наукових семінарах і засіданнях секцій вченої ради Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, І-му з'їзді Українського товариства кріобіологів і кріомедиків (Харків, 1995);

VI Міжнародному симпозиумі Placenta Group (Бельгія, 1995); Міжнародних конференціях Society for Cryobiology «CRYO» (Barcelona, 1997; Pittsburgh, 1998; Marseille, 1999; Hamburg, 2006; Vancouver, 2007; Bristol, 2010); 2-му Міжнародному конгресі тканинних банків (Warsaw, 1999); Національних з'їздах трансплантологів України (Київ, 2000; Донецьк, 2004; Харків, 2011); III-му Національному конгресі геронтологів і геріатрів України (Київ, 2000); симпозиумі по проблемам тканинних банків з міжнародною участю «Биоимплантология на пороге XXI века» (Москва, 2001); Всеукраїнській науковій конференції «Успіхи та перспективи розвитку кріобіології і кріомедицини» (Харків, 2001); II науково-практичній конференції з міжнародною участю «Прискорене старіння та шляхи його профілактики» (Одеса, 2001); Міжнародній конференції «Cryopreservation and Safe Keeping of Cells and Tissues» (Hradec Kralove, 2002); Міжнародній науково-практичній конференції «Проблеми клітинної і тканинної трансплантації» (Івано-Франківськ, 2003); з'їзді Українського товариства клітинної біології (Львів, 2004); 27-й науково-практичній конференції з міжнародною участю «Ліки – людині. Сучасні проблеми старіння, вивчення та апробації лікарських засобів» (Харків, 2010); Всеросійській науковій школі-конференції «Стволовые клетки и регенеративная медицина» (Москва, 2010); 4-му і 5-му конгресах з біоетики (Київ, 2010, 2013), Всеросійських симпозиумах з міжнародною участю «Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии» (Москва, 2007; Санкт-Петербург, 2010; Уфа, 2012), науково-практичній конференції з міжнародною участю «Інноваційні аспекти технологій в урології» (Київ, 2012), науковій конференції з міжнародною участю «Актуальные проблемы криобиологии и криомедицины» (Харків, 2012), науковій конференції з міжнародною участю «Актуальні питання геронтології та геріатрії» (Київ, 2013), Міжнародній науково-практичній конференції „Практико-ориентированные биотехнологические исследования в растениеводстве, животноводстве, медицине” (Брест, 2013).

Публікації. Результати дисертації опубліковано в 70 наукових публікаціях, з них 29 статей– у фахових виданнях, 4 – в іноземних публікаціях, окремі глави в 3-х монографіях (одна закордонна), 3 методичних рекомендаціях; в матеріалах конгресів, конференцій, симпозіумів. Отримано 11 патентів України.

Об’єм і структура роботи. Дисертаційна робота викладена на 310 сторінках друкарського тексту, складається зі вступу, огляду літератури, 5 розділів власних досліджень, заключної частини – обговорення результатів дослідження, висновків, практичних рекомендацій, списку використаних літературних джерел (139 країн СНД і 154 зарубіжних на 33 сторінках). Робота містить 88 рисунків (з них 11 графіків) та 57 таблиць, 8 додатків.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Сучасний стан проблеми кріоконсервування біологічних об'єктів (механізми кріоушкодження і можливості кріозахисту)

На теперішній час низькотемпературне консервування біологічних об'єктів набуває особливого значення і є актуальною, наукоємною і стратегічно важливою біотехнологією. Методи консервування біоматеріалу з використанням глибокого холоду дозволяють зберігати практично весь сучасний генетичний матеріал (субклітинні структури, клітини і тканини) протягом необмеженого часу. Банкування повноцінного кріоконсервованого біоматеріалу має важливе значення в сучасній несприятливій екологічній ситуації, оскільки необхідне для поновлення, або використання біооб'єктів в майбутньому, для визначення фундаментальних і прикладних (аплікаційних) напрямків наукових досліджень, в медичних технологіях та інших галузях [1, 44, 293].

Визначення механізмів та закономірностей фізико-хімічних, структурних і функціональних процесів, що відбуваються в біологічних системах при охолодженні, заморожуванні і відігріванні, надасть можливість розробки ефективних програм кріоконсервування біологічного матеріалу зі збереженням або програмуванням його морфофункціонального стану.

Зміни, які виникають у біологічних об'єктах при заморожуванні, властиві всім клітинам і тканинам, але в значній мірі ці зміни визначаються структурою біологічного об'єкта. Визначенню механізмів кріоушкодження біологічних об'єктів присвячений цілий ряд концепцій і гіпотез.

Найбільш ранньою науковою концепцією кріопшкодження вважається створена у 1950 – 1955 роках кристалізаційно-дегідратаційна теорія Б. Люїє. Автор доводить, що причиною руйнування біооб'єктів є процес утворення кристалів льоду (внутрішньо- та позаклітинних) та його наслідки. Кардинальні пошкодження в біосистемі відбуваються в температурному інтервалі від 0 до -30°C , в якому рідка фаза біологічної системи починає кристалізуватися. Пусковим моментом руйнування клітин при цьому є виморожування шляхом кристалізації вільної води. Найбільш ушкоджуючу дію мають гексагональні кристали льоду, а при формуванні дрібнозернистих, аморфних або сферичних форм ушкодження клітинних структур значно менші [6].

Результати сучасних дослідження свідчать, що суттєве значення для ініціації внутрішньоклітинних кристалів льоду мають процеси, пов'язані з формуванням гідрофільних каналів у мембрані. Внутрішньоклітинне льодоутворення значно активується при довготривалому перебуванні клітин в переохолодженому стані. Ушкодження клітин відбувається за рахунок механічного тиску кристалу на органели, денатурації цитоплазматичних макромолекул, їх дизкомплектацією з наступним колоїдно-осмотичним лізисом. Клітини, що опиняються в замкнутому просторі кристалу, відчувають гіпербаричний вплив та внаслідок певного критичного ступеню – руйнуються [22, 72, 140].

При охолодженні біологічної системи змінюється стан її компонентів. На початковому етапі охолодження до початку кристалізації виникають структурно-фазові переходи білків і ліпідів. Внаслідок цих процесів знижується еластичність клітинних мембран, в них виникають трансмембранні дефекти з порушеннями проникності бішару і бар'єрних властивостей біомембран, що призводить до втрати цитоплазмою іонів і біомолекул. Теорія „мембранного пошкодження” клітин при охолодженні базується на термотропних фазових переходах сполук мембран. Такий

розвиток молекулярних реакцій відбувається завдяки природі мембрани як двомірного матриксу, що складається з компонентів різної хімічної природи [6, 196, 197].

Відповідно до концепції Мерімана [225] зневоднення клітин супроводжується зменшенням їх об'єму і розвитком механічної напруги на мембранах. На мембрані виникає градієнт гідростатичного тиску, що може призвести до її розриву. Автор запропонував теорію “мінімального клітинного об'єму”, відповідно до якої в основі механізму руйнування клітин при зневодненні лежить здатність плазматичної мембрани клітин стискуватися лише до певного рівня, після якого вона починає відчувати опір внутрішньоклітинного вмісту. Але, як відомо на цей час, пошкодження плазматичної мембрани при кріоконсервуванні має більш складний характер, тому теорія “мінімального клітинного об'єму” більше спроможна визначати межу стиснення клітини, нижче якої клітинна мембрана руйнується, але не визначає цілком дегідратаційний механізм кріоушкодження. Так, в останні роки доведено [1], що дегідратація супроводжується ліотопним мезоморфізмом ліпідних молекул та зсувом фазових переходів в область більш високих температур. Холестерин кластеризується в окрему фазу, що призводить до більш руйнівної дії кристалів льоду на фосфоліпідний прошарок, що втратив холестерин. Аналогічні процеси розвиваються у внутрішньоклітинних органелах, що мають мембранну будову (лізосоми, мітохондрії, саркоплазматичний ретикулум). Дегідратація супроводжується порушенням співвідношення фракцій води: вільної, метаболічно активної, клатратгідратної, яка локалізована в гідрофобних карманах мембран, і фракція води, що щільно фіксована безпосередньо на поверхні біомолекул за рахунок сил зчеплення з зарядженими групами білка. Це призводить до розбалансування гідрофобно-гідрофільного балансу, порушення дифузії гідратованих груп ліпідів і білків, а також проникливості мембран. Втрата зв'язаної води може викликати анфолдінг білків, внаслідок чого вони

втрачають специфічні сайти для взаємодії, що призводить до їх дисоціації. Порушення білок-білкових взаємодій супроводжується дисбалансом фракцій білків внаслідок фіксації, яка обумовлена аномальними зв'язками, зокрема ковалентними зшивками, що формуються при окисленні SH-груп цистеїна сусідніх макромолекул, які експонуються поряд. Ці дані узгоджуються з сульфгідрильною теорією кріоушкоджень біоб'єктів, відповідно до якої при заморожуванні починається зближення макромолекул та відбувається взаємодія реакційноспроможних груп, формуються дисульфідні зв'язки в білках, ферментах і таким чином порушуються біологічні властивості білків мембран і цитозоля [6].

Концепцію сольового пошкодження біоструктур запропонував Дж. Лавлокк [217]. Автор доводить, що основним механізмом руйнування біосистеми при заморожуванні є вплив на біоструктури гіперконцентрованих розчинів електролітів, які утворюються при виморожуванні води. В результаті збільшення іонної сили середовища відбувається вихід фосфоліпідів та холестерину з клітинної мембрани, що призводить до руйнування мембрани та лізису клітин. Руйнівна дія сольових розчинів пояснюється їх ліотропним ефектом на фосфоліпідні компоненти мембран. Ця теорія здебільшого справедлива практично для всіх видів клітин, оскільки властивості мембран в основному визначаються ліпопротеїдними комплексами, які вони містять. Сучасні дослідження дозволили відкрити більш тонкі механізми цього явища. Так, доведено, що під впливом низьких температур і відповідно при підвищенні концентрації електролітів у рідких мікрофазах льодяних каналців біосистеми зменшується поверхневий потенціал, рН на поверхні ліпідних молекул, що призводить до іонізації фосфатних груп і збільшення міжмолекулярного електростатичного відштовхування, в результаті виникає структурна напруга, і система стає вкрай нестабільною. Водночас порушується функція іонтранспортуючих макромолекулярних комплексів,

що, в свою чергу, призводить до аномального перерозподілу структурно-функціональної інтеграції білків цитоскелета і цитозолі [220, 223].

Подальший розвиток фундаментальних кріобіологічних досліджень сприяв виникненню нових концепцій щодо механізмів пошкодження біоб'єктів при заморожуванні. Основні сучасні теорії кріопошкодження базуються на наслідках утворення кристалів льоду і в значній мірі визначаються швидкістю охолодження [107]. Визначають надповільне заморожування при швидкості зниження температури менш ніж 1град/хв, повільне – 1-10град/хв, швидке – 10-5000град/хв та надшвидке – 5000-10000град/хв і більше. Так, П. Мейзуром була обґрунтована і математично змодельована двофакторна концепція кріопошкодження клітин, що розглядає зміни, які відбуваються у позаклітинному середовищі при різних швидкостях охолодження [223, 234].

Перший фактор виникає, коли при повільному заморожуванні спостерігається позаклітинне льодоутворення, клітини витримуються занадто довго у несприятливих умовах і руйнуються під дією „ефектів розчину”. При зниженні температури і утворенні кристалів льоду має місце підвищення концентрації електролітів і осмолярності. Змінюється в'язкість і склад середовища, рН та іонна сила. Коливання рН в рідких мікрофазах активує процеси агрегації цитоплазматичних і цитоскелетних білків, а також кластеризацію мембранних ліпідів, що змінює деформабельність клітин.

Другий фактор виникає при високих швидкостях охолодження, коли часу для виходу води з клітини не вистачає. При цьому виникає переохолодження, розвивається критична внутрішньоклітинна кристалізація.

Існує і інша двофакторна теорія, яка на цей час визнається багатьма кріобіологами. Вважається, що швидкість охолодження, що є меншою за оптимальну, викликає надмірну дегідратацію клітин, а надто висока швидкість – пошкодження клітинних мембран, через пори яких відбувається зростання кристалів льоду з позаклітинного оточення в середину клітини,

тобто внутрішньоклітинний лід розглядають не як причину, а як наслідок пошкодження мембрани [23, 72, 290]. На погляд Muldrew K. і McGann L.E. [229] пошкодження клітин, які виникають при швидкості охолодження, вищій за оптимальну, зумовлені не внутрішньоклітинним утворенням льоду, а швидким потоком води з клітини, який викликає надмір гідравлічного тиску на мембранах, що і призводить до їх руйнування. У цьому випадку внутрішньоклітинний лід також швидше є наслідком, а не чинником пошкодження клітин.

Водночас доведено [72, 282], що при повільних швидкостях заморожування утворюються гексагональні форми льоду, при більш високих – у вигляді сферулітів. Але з підвищенням швидкості заморожування сформовані кристали є лабільними, мають тенденцію до зміни форми і збільшуються на етапі відігріву.

Метаболічна теорія кріоушкодження акцентує увагу на роль виморожування води як універсального розчинника, що призводить до порушень окислювально-відновних, ферментативних процесів, активізації ПОЛ, процесів апоптозу, а також до накопичення продуктів метаболізму. Гіпоксія в біосистемі, що охолоджується, викликає активацію гідролітичних процесів [6].

З огляду на результати сучасних досліджень істотну роль у механізмі кріоушкодження відіграють електростатичні ефекти. В процесі кристалізації на поверхні кристалів льоду адсорбуються іони, добудовуючи кристалічну решітку, внаслідок чого поверхня кристалу заряджається. Безпосередньо біля поверхні кристалу розташовуються іони протилежного знаку таким чином, що між ними формується подвійний електричний ряд, це обумовлює виникнення потенціалу на межфазовому кордоні, де проходить аніонний і катіонний обмін і при контакті з клітинами чинить електричний пробій в мембранах [22, 23].

Визначено, що основна частина ушкоджень біологічних об'єктів відбувається під час розморожування, коли починають розвиватися процеси рекристалізації, збільшуються розміри кристалів льоду до критичних щодо руйнування органел, мембран і клітин в цілому [140, 229, 272].

Наведені гіпотези кріоушкодження біосистем теоретично обґрунтовані і експериментально доведені. Водночас, кожний окремо взятий фактор діє руйнівні на біооб'єкт, що заморожується, і в циклі кріоконсервування вони накладаються один на одного, утворюючи картину кріоушкоджень складових клітинних компонентів. При цьому однакові види холодних аплікацій можуть призвести в одних біосистемах зворотні зміни, а в інших – незворотні. Цей ефект обумовлює специфічність клітин, ступінь гідратності біооб'єкта та вихідний стан біоматеріалу до охолодження (ступінь зрілості, наявність ушкоджень) [124].

На теперішній час визначено основні механізми кріоушкодження, що відбуваються в репродуктивних клітинах, в клітинах крові, кісткового мозку, шкіри, гепатоцитах, нейроклітинах, в тканинах щитовидної, паращитовидної, підшлункової, статевих залоз та в інших біооб'єктах [4, 7, 11, 152, 169, 199, 286].

Процеси, що відбуваються в плаценті під впливом низьких температур, тільки починають досліджуватися [10, 84, 187]. При цьому, її потужний біологічний потенціал вимагає визначення цих процесів для обґрунтування і розробки ефективних кріозахисних підходів, що дозволять отримувати КБПІ для вирішення медико-біологічних проблем.

При розробці програм кріоконсервування в першу чергу орієнтуються на дисперсність діапазону температур, що обумовлюють інтенсивність протікання фізіологічних процесів в біосистемі. Так, інтервал 25...40°C – зона високої активності фізіологічних і обмінних процесів; 0...25°C – зона переходу біооб'єкта до стану гіпобіозу; при температурах від 0 до –80°C відбувається кристалізація внутрішньо- і позаклітинної води, біооб'єкт

переходить до неповного анабіозу; інтервал $-80..... -150^{\circ}\text{C}$ – зона кристалізації зв'язаної води і рекристалізаційних процесів; при температурі нижче -150°C припиняються всі метаболічні, фізіологічні, фізико-хімічні процеси і біоб'єкт знаходиться в стані глибокого анабіозу [6, 212]. Принципове значення для кріобіологічних процесів має евтектична температурна зона, тобто інтервал температур, при якому тверді компоненти в системі, що заморожується, знаходяться в рівновазі з рідкою фазою, та евтектична температура – при якій відбувається утворення тотальної твердої маси, що складається з суміші твердих сполук і структур. Відповідно до цих температурних інтервалів визначають методи кріозахисту біосистеми шляхом модифікацій швидкостей зміни температур і складу кріопротекторних розчинів. Швидкість охолодження дозволяє регулювати ступінь дегідратації клітини, впливає на характер внутрішньоклітинної кристалізації. Оптимальна швидкість охолодження визначається типом біологічного об'єкта [124, 217].

В останній час доведено кріозахисний ефект двохетапного заморожування. На першому етапі швидкість заморожування є повільною, вода за цей час встигає залишити клітину, що призводить до її дегідратації, і при подальшому заморожуванні не відбувається зростання внутрішньоклітинних кристалів. При цьому розміри внутрішньоклітинних кристалів та кількість льоду не пошкоджують клітину, але є для неї потенційно небезпечними [211, 276, 289].

Більш швидке охолодження на першому етапі може призвести до подальшого збільшення розмірів внутрішньоклітинних кристалів і, як наслідок, до загибелі клітин. Ефективним прийомом кріозахисту є температурна зупинка, що призводить до якісної зміни процесу дифузійного обміну води між клітинами та оточуючим середовищем, який здійснюється за рахунок переміщення розчинника, у зв'язку з чим клітини виявляються більш стійкими до постгіпертонічного лізису при відігріві [22, 130].

На другому етапі біооб'єкти підлягають швидкому заморожуванню, як правило, безпосередньому зануренню в рідкий азот.

Альтернативним підходом кріозахисту є вітрифікація – затвердіння рідини при заморожуванні з утворенням аморфного чи склоподібного стану льоду [157, 215, 220], внаслідок чого ступінь пошкодження біооб'єктів мінімізується. Вітрифікацію розчину можна досягнути надшвидким охолодженням тонкого прошарку біооб'єкту у рідкому азоті, або при використанні шуги азоту (суміш твердої і рідкої фаз), а також при меншій швидкості заморожування з використанням високого тиску та високої концентрації кріопротектора. Перспективним є застосування з цією метою розчинів речовин, що при заморожуванні моделюють склоподібне льодоутворення, так званих вітрифікуючих розчинів [290].

Існують і конструкторські пропозиції щодо оптимізації програм кріоконсервування. Так, О.Н. Новіковим, М.Й. Шраго було запропоновано для заморожування біооб'єктів кріоконтейнер з вмонтованим теплопровідним стержнем. Завдяки локалізації переохолодження на ньому і формуванням центра кристалізації виключається руйнівне для біологічних об'єктів переохолодження водної компоненти основної маси позаклітинного середовища при фазовому переході води в лід у процесі заморожування [78].

Для підвищення рівня збереженості клітин за рахунок зменшення осмотичної ламкості при переносі еритроцитів у ізоосмотичне середовище, Л.О. Бабійчук та співавтори запропонували спосіб «холодової адаптації». Було доведено, що інкубація еритроцитів з ПЕО-1500 при 0°C сприяє зменшенню кількості кріопротектора, який з'єднується з клітинами, що дозволяє в значній мірі підвищити збереженість еритроцитів при кріоконсервуванні [6].

Значну роль для збереженості кріоконсервованих біооб'єктів відводять швидкості їх відігріву. Визначено, що швидкий відігрів знижує можливість

рекристалізації, оскільки недостатньо часу для збільшення розмірів кристалів льоду до тих, що є небезпечними для клітин [22, 223].

Останніми роками в різноманітних галузях науки бурхливого розвитку набуває напрямок досліджень щодо перспектив біотехнологій з використанням наночастинок. Розміри наночастинок ($\leq 100\text{nm}$) відповідають розмірам багатьох біологічних структур, співвідношення площі поверхні наночастинок до їх об'єму забезпечує їх високу контагіозність. О.М. Сукачем зі співавторами (2008) проведено аналіз можливостей використання наночастинок феромагнетиту для кріоконсервування клітинних суспензій. Визначено, що присутність частинок феромагнетиту в сольовому та сахаровмісному середовищах призводить до збільшення температури кристалізації розчинів, вони приймають участь в процесі кристалізації (є центрами нуклеації), в результаті чого знижується ступінь переохолодження розчинів. Наночастини ініціюють та збільшують швидкість внутрішньоклітинного кристалоутворення в вигляді дрібних сферулітів. Внаслідок спроможності наночастинок феромагнетиту нагріватися під впливом електромагнітного випромінювання присутність їх в клітинних суспензіях відкриває перспективу розробки методів контрольованого швидкого розморожування [116].

Кардинальне значення для захисту біологічних структур при заморожуванні – відігріві мають кріопротектори – сполуки, які здатні запобігати ушкодженню біоб'єктів. Вони входять до складу кріоконсервантів – багатокомпонентних систем, складові яких підсилюють колігативну дію кріопротекторів [7, 52].

З'ясування механізму кріозахисної дії кріопротекторів залишається актуальною проблемою кріобіології. Дія кріопротектора повинна бути спрямована на зменшення впливу на біоб'єкти негативних факторів, що мають місце при зниженні температури. Додавання кріопротектора у середовище викликає зміну стану води. При позитивних температурах ця дія проявляється в збільшенні в'язкості розчинів і їх осмотичної потужності,

зменшенні діелектричної сили середовища. Кріопротектори знижують температуру замерзання розчинів, зменшують розміри виникаючих кристалів льоду, знижують температуру рекристалізації та інгібують рекристалізаційне укрупнення кристалів льоду при відігріві [76, 145].

Результати досліджень з використанням методів ЯМР підтвердили, що кріопротектори зв'язують молекули води, внаслідок чого при заморожуванні-відігріві модифікується льодоутворення в вигляді склоподібної структури, в той час як розчини некріопротекторів утворюють гексагональний лід. Зміна структури льоду знижує ступінь електричної, гіпербаричної та механічної кріоушкоджуючої дії на цитоплазматичні структури і мембрани. В присутності кріопротекторів виморожування фракцій води відбувається в широкому температурному інтервалі з одночасним зв'язуванням електролітів, що запобігає їх критичному концентруванню і сприяє вітальності біосистеми. Кріопротектори пластифікують ліпідний матрикс мембран, індують дегідратацію цитозолу, структурування цитоскелетних білків, стабілізують просторову організацію біомакромолекул, уповільнюють ферментативну активність білків [1, 288].

Кріопротектори належать до різних класів хімічних речовин – спиртів, амідів, оксидів, вуглеводів, білків, полімерних сполук та ін. Відповідно до сучасних даних кріопротекторну активність проявляють сполуки, що здатні утворювати стабільні водневі зв'язки завдяки гідроксильній, амідній чи сульфоксидній групам. Поряд з цим метильна група $-CH_3$ збільшує здатність кріопротектора до формування водневих зв'язків навколо біомолекул, запобігаючи тим самим їх кріоденатурації [7, 52].

Для кріопротекторів різної хімічної будови не існує чіткої залежності від молекулярної маси. Кріопротекторна активність спостерігається як у низькомолекулярних речовинах – диметилсульфоксид (ДМСО), гліцерин, так й у високомолекулярних – поліетиленоксид (ПЕО), полівінілпіролідон (ПВП), гідроксиетилкрохмаль (ГЕК). Полімерні сполуки мають оптимальні (щодо

кріозахистних, реологічних властивостей, токсичності та інш.) межі значень молекулярної маси: для ПЕО – 100–1500; ПВП – 12500–25000; ГЕК – 250–500000. Кріопротектори за функціонально-топічними властивостями розподіляються на екзоцелюлярні (які не проникають в клітину), ендоцелюлярні (які проникають в клітину) та кріопротектори змішаного типу [269, 283].

Поряд із загальними для всіх кріопротекторів властивостями ендоцелюлярні кріопротектори досить швидко проникають у клітину в складі кріозахисних середовищ, стабілізують структуру білків і ліпідів мембрани та цитоплазматичних компонентів за рахунок модифікації мембранозв'язаної води і кристалів внутрішньоклітинного льоду, запобігають виникненню на мембрані руйнівних градієнтів концентрацій зовнішньо–внутрішньоклітинних розчинів. Під впливом ендоцелюлярних кріопротекторів знижується точка евтектики і зменшується пошкоджуюча дія розчинів солей і метаболітів, які виникають у процесі заморожування. Прикладами проникаючих у клітину кріопротекторів є ДМСО і гліцерин. Зв'язуючись з іонами і молекулами води, вони можуть створювати комплекси різної природи, які змінюють дію зростаючої концентрації іонів та інших сполук у середовищі на структури клітин при охолодженні. ДМСО сприяє дрібноячеїстій, близькій до аморфної, кристалізації льоду біоб'єктів і тим самим сприяє збереженню життєздатності клітин при заморожуванні–відігріві [216, 271]. Сучасними дослідженнями визначено ряд механізмів модифікуючої дії ДМСО на структурний стан мембранних білків. Зв'язування ДМСО з білками зворотно зменшує долю іммобілізованої водної компоненти. Водночас при дії ДМСО на мембрани саркоплазматичного ретикулума відбувається значне збільшення загальмованих SH-груп білка. ДМСО чинить тимчасовий псевдотоксичний ефект на активність мембранозв'язаних ферментів, трансмембранний рух іонів та метаболітів [6, 230,]. Суттєвою негативною властивістю ДМСО є потенційна можливість його мутагенної дії. Відповідно

до цього при розробці біотехнологій створення кріоконсервованих біологічних об'єктів за допомогою ДМСО необхідним є дослідження можливої ембріотоксичної і тератогенної дії отриманих біоструктур.

Класичним ендоцелюлярним кріопротектором є гліцерин, який і сьогодні використовують у складі кріоконсервантів при заморожуванні еритроцитів і клітин кісткового мозку, культури тканин та інш. Механізм захисної дії гліцерину зумовлений тим, що він запобігає виникненню високої концентрації електролітів та перепаду концентрації осмотично активних речовин, тобто діє в якості антисольового буферу, знижує швидкість поширення фронту кристалізації, переміщує евтектичну концентрацію в зону низьких температур і зумовлює дрібнокристалічне замерзання розчину. На думку С.Ф. Doebller гліцерин, створюючи водневі зв'язки з водою, стабілізує гідратну структуру навколо білків і тим самим попереджає денатурацію білків при заморожуванні. Вода при виморожуванні видаляється з білка, і гліцерин, створюючи водневі зв'язки з гідрофільними ділянками білків, заміщує воду і за рахунок захисної оболонки навколо білкової молекули запобігає її кріоденатурації [52, 176, 272].

При використанні ендоцелюлярних кріопротекторів необхідне їх видалення із розморожених клітин шляхом таких методик, як діаліз, відмивання гіпертонічними розчинами з каскадним зменшенням концентрацій, центрифугування, розведення і осадження декстранами, агрегація з неелектролітами чи дезагрегація в сольових розчинах. У процесі видалення ендоцелюлярних кріопротекторів виникають додаткові ушкодження біосистеми, що потребують реабілітаційних заходів та призводять до втрати певного відсотку клітин [6, 175].

На теперішній час визначено такі складові механізму кріозахисної дії ендоцелюлярних кріопротекторів: по-перше, вони позитивно впливають на температурно-структурні фазові переходи в системі, зміщують їх в низькотемпературну область, сприяють утворенню дрібнозернистих форм

льоду, більшість яких знаходиться у міжклітинній рідині. Молекули кріопротектора зв'язують іони і солі, тим самим знижуючи їх концентрацію і пошкоджуючу дію. При змішуванні непроникаючих кріопротекторів з водою формується неперервна сітка водневих зв'язків, це призводить до утворення сольватної оболонки, яка запобігає ушкоджуючій ліпотропній дії гіперконцентрованих розчинів солей на структуру біомолекул. Утворення суміші кріопротектор–вода перешкоджає критичному зближенню клітин і макромолекул в системі і запобігає їх незворотній кріоденатурації при заморожуванні [7, 145]. Суттєве значення в механізмі кріозахисту екзоцелюлярних кріопротекторів має їх здатність модифікувати морфофункціональні характеристики мембран. Методом ЕПР-спінових зондів, що локалізувалися в гідрофобних ділянках мембранних білків і ліпідів, визначено заміщення кріопротектором зондів з гідрофобних порожнин мембранних білків в ліпідний матрикс. При взаємодії з клітинами екзоцелюлярні кріопротектори сорбуються на молекулах білків мембрани, зменшуючи токсичну дію гіперконцентрованих солей, стабілізують структуру біополімерів клітини. Найбільш ефективними екзоцелюлярними кріопротекторами, які не потребують відмивання, підвищують резистентність біоб'єктів до дії низьких температур, мають виражену дегідратаційну активність і низьку токсичність як на клітинному рівні, так і на рівні організму, вважаються ПЕО і ГЕК [1, 6, 52, 137].

Представником класу кріопротекторів змішаної (екзо- і ендоклітинної) дії є полівінілпіролідон (ПВП), який має значні адсорбційні властивості, його молекули являють собою діфільні сполучення, тобто мають гідрофобно-гідрофільні властивості. В водних розчинах молекули ПВП приймають хаотичну спіральну конфігурацію, що дозволяє їм гідратувати значну кількість молекул води, завдяки чому відбуваються позитивні, відносно кріозахисту, структурні переходи. ПВП реалізує кріозахисний ефект на колігативній основі, оскільки є комплексоутворювачем, здатен запобігати

ушкоджуючій дії гіперконцентрованих розчинів солей в мікроканальцях льоду в процесі виморожування води в лід. Молекули ПВП проникають в ретикулоендотеліальну систему клітини шляхом піноцитозу, де концентрується вздовж мембран, і впливає на активність клітинних процесів [7, 137].

Незважаючи на значні досягнення у вивченні властивостей кріопротекторів, пошук ідеального кріопротектора та визначення механізму кріозахисної дії залишаються актуальними і потребують подальших досліджень.

Принциповим вирішенням цієї проблеми є визначення і застосування кріоконсервантів – складних розчинів, що містять кріопротектори та речовини, що підсилюють захисну і зменшують їх побічну токсичну дію. До складу кріоконсервантів пропонується включати мембранні стабілізатори, антиоксиданти, модулятори метаболізму і сполуки, що активують процеси відновлення деконсервованих біоб'єктів. Кріоконсерванти і регенеруючі середовища є гетерогенними сумішами на збалансованих середовищах (Рингера, Дюльбекко, Ігла, Хенкса та інш.) і можуть складатися із розчину кріопротектора, вуглеводів (глюкоза, лактоза, фруктоза, сахароза, мальтоза), попередників нуклеїнових кислот (інозит, аденін, піруват, глутатіон), АТФ, вітамінів, солей (NaCl , KCl , MgSO_4 , CaCl_2 , фосфати, цитрати), антибіотиків, сироваткового альбуміну, амінокислот [145, 148, 176].

Таким чином, відповідно до сучасного уявлення про механізм структурно-функціональних змін в біосистемах при охолодженні – заморожуванні – відігріві практично кожен вид клітин і тканин потребує оригінальної програми кріозахисту.

Завдяки численним дослідженням кріочутливості клітин крові і кісткового мозку досягнуто суттєві успіхи при їх кріоконсервуванні [1, 4, 118, 155, 199, 242]. Існує декілька програм низькотемпературного консервування еритроцитів. Для цього в системі банків крові використовують

кріоконсерванти на основі розчинів гліцерину, ПВП, 1,2-пропандіолу, ПЕО-1500. До складу суміші в різних варіантах входять NaCl, ЕДТА-Na, сахароза, глюкоза, лактоза, цитрат, натрію бромід, маніт, антибіотики. Клітинну суспензію заморожують до -196 , -150 , -80 , -50 , -35 та -20°C за двохетапною програмою з використанням холодової адаптації і сидінгу із зберіганням при температурі, яка відповідає найнижчому значенню в програмі. Розморожування відбувається на високих швидкостях, відмивання (при потребі) – методом прискореної седиментації, що базується на принципі зворотної агломерації при розведенні суспензії розчинами вуглеводів у безсольовому середовищі. Реставруючі розчини уповільнюють гемоліз і розпад макроергів; містять інгібітори ПОЛ, дезамінування та протеолізу (піруват, інозит, глюкоза, фосфати та інш.).

Кріоконсервування лейкоцитів є досить складним, оскільки лейкоцити чутливі до фізико-хімічних змін середовища, що призводить до незворотніх змін в їх функціонуванні. Наблизитися до вирішення цієї проблеми (отримання кріоконсервованої суспензії клітинної популяції лейкоцитів із структурною збереженістю до 84%, функціональною – 30%) дозволив апаратний лейкоцитозферез із наступним програмним заморожуванням клітин під захистом кріоконсервантів на основі ендоцелюлярних кріопротекторів [1, 252].

Існуючі на даний час методи кріоконсервування тромбоцитів із використанням невисоких концентрацій кріопротекторів (у складі багатокomпонентних консервантів) дозволяють отримувати до 70% життєздатних клітин з 60%-ю приживлюваністю. Водночас це потребує високотехнологічного устаткування та реставруючих середовищ з обов'язковою наявністю в них кислих антикоагулянтів, плазми і вуглеводів [47, 70].

Кріоконсервування суспензії клітин кісткового мозку є досить складною кріобіологічною проблемою, тому що вона є гетерогенною

популяцією різного ступеня диференціювання імунокомпетентних, гемопоетичних, прогеніторних і стовбурових клітин. Дослідження А.М. Гольцева зі співавторами довели можливість програмувати склад і властивості деконсервованого кісткового мозку модифікуванням програм кріоконсервування. З цією метою автори застосовували різні швидкості охолодження, температурних зупинок і індукції кристалоутворення [1].

Для поширення використання кріоконсервованих ізольованих гепатоцитів у експериментальних дослідженнях і клінічній медицині важлива оптимізація кріотехнологій їх отримання. З цією метою пропонується двохетапна еквілібрація суспензії гепатоцитів з кріоконсервантом, індукція кристалізації з наступними двома ступенями заморожування [6, 211, 269, 279].

На теперішній час особливого значення набуває кріоконсервування репродуктивних матеріалів – яйцеклітин, сперматозоїдів, ембріонів. Ефективність їх низькотемпературного консервування залежить від онтогенетичної стадії розвитку. Додержання цього принципу забезпечує успішну реалізацію сучасних репродуктивних технологій, які мають важливе соціальне значення – покращення демографічної ситуації [157, 21, 238, 286].

Значне поширення захворювань, пов'язаних з ураженням ендокринної системи, і недостатня ефективність їх терапії визначає сучасний запит на розширення терапевтичних протоколів ендокринопатій за рахунок введення кріоконсервованих тканин і органних культур залоз внутрішньої секреції. Результати досліджень останніх років [11, 56,] доводять можливість принципової оптимізації програм кріоконсервування таких біооб'єктів методами сокультивування біоструктур, пов'язаних в організмі прямими і зворотними зв'язками, культивування до кріоконсервування, а також рекультивування після деконсервування. Завдяки таким прийомам можливе відтворення в системі *in vitro* ініціюючорегуляторного впливу на тканину, яка кріоконсервується, підвищується її секреторна активність та зникають

антигенпрезентуючі клітини. У результаті досягнуто значної ефективності кріоконсервування структур гіпофіза, підшлункової, щитоподібної, паращитоподібних залоз, тестикулярної та оваріальної тканин.

Кріоконсервуванню біоструктур плаценти присвячено досить мало робіт. Закордонні автори використовують цей метод для збереження експериментальних зразків клітинних ліній, виділених із плаценти, екстрактів, або експлантів плаценти [151, 158, 160, 162, 167, 168, 234]. В Україні роботи в цьому напрямку присвячені, в основному, експериментально-клінічному використанню КБПП, отриманих з плаценти (хоріону) 9–12 та 40–41 тижні гестації шляхом двохетапного заморожування тканини з 10%-м розчином ДМСО [81, 84, 86, 100, 139]. Але ступінь вітальності та збереженості аутентичних характеристик тканини плаценти за такою методикою недостатня. Невирішеність проблеми ефективності кріоконсервування обумовлена відсутністю комплексної оцінки вихідного і кріоконсервованого плацентарного матеріалу з урахуванням одночасно його онтогенетичних, морфологічних, функціональних властивостей і тих змін, що відбуваються на етапах кріоконсервування. Таким чином, проблема всебічного визначення механізмів кріовпливу на БПП та розробка методів кріоконсервування є актуальною задачею сучасної біології та медицини.

1.2. Морфофункціональні характеристики плаценти як об'єкта кріоконсервування

Сучасний розвиток кріобіології, орієнтований на проведення фундаментальних досліджень впливу низьких температур на біоб'єкти раннього онтогенезу, дозволяє створювати надійні, науково обґрунтовані методи їх кріоконсервування. Перспективність використання кріоконсервованих структур плаценти обумовлена її трійним генетично детермінованим потенціалом. Плацента, по-перше, забезпечує розвиток,

структурування і функціонування всіх органів і систем людини, по-друге, – перинатальні механізми захисту від негативних впливів, і по-третє, – репаративну здатність у відновленні гомеостазу і структур організму після дії ушкоджуючих факторів [127, 136, 188]. Визначення специфічності морфофункціональних характеристик плаценти є однією з провідних дослідницьких задач при розробці програм кріоконсервування плацентарних структур.

Плацента людини – провізорний орган, що забезпечує анатомо-функціональний зв'язок та гомеостаз системи мати-плацента-плід. Плацента людини відноситься до гемохоріального типу – без змішування плодової та материнської крові. Розрізняють материнську поверхню (базальна чи децидуальна пластинка), яка кріпиться до стінки матки, та плодову (хоріальна пластинка), від якої відходить пуповина. З плодової поверхні плаценти вкрита амніотичною оболонкою, що бере участь в обміні навколоплідних вод. Амніон, що вкриває плаценту, відрізняється від позаплацентарного більшими розмірами клітин епітелію з переважно синтетичною функцією. Під амніотичним епітелієм знаходиться амніотична сполучна тканина, в якій деякі дослідники розрізняють до шести шарів, та строма плаценти [114, 127, 200].

У стромі плаценти виділяють сполучну тканину з гістіоцитами, рихлою міжклітинною речовиною, макрофагальними елементами, більшість з яких це клітини Кащенко-Гофбауера та судини. Сполучна тканина обмежена базальною мембраною, на якій розташований цитотрофобласт (клітини Лангханса). З клітин цитотрофобласта формується наступний шар – синцитіотрофобласт (плазмодіотрофобласт, синцитій), який представлений багатоядерним симпластом, пов'язаним десмосомами з цитотрофобластом, а в ділянках де він відсутній, – з базальною мембраною. Частини плацентарного синцитію постійно відшнуровуються від поверхні та формують вільні симпласти, які можуть знаходитися в судинах ендометрію, легень та інших внутрішніх органах. Існує припущення, що вільні симпласти

впливають на імунологічну толерантність, ендокринну регуляцію та на формування зворотного зв'язку в системі мати-плацента-плід. З материнської поверхні плацента формує ворсини, занурені в лакуни з кров'ю матері. Розрізняють первинні ворсини, що складаються лише з трофобласта, вторинні, до яких входить сполучна тканина та тритинні, де, крім цих компонентів, знаходяться судини. Якорні ворсини кріпляться до стінки матки та фіксують плаценту.

Лакуни відокремлені одна від одної септами, які в кількості 15–20 відходять від децидуальної оболонки та складаються з децидуальної тканини. Поверхня лакун вкрита клітинами трофобласта, під якими знаходиться зона коагуляційного фібриноїдного некрозу. На поверхні цитотрофобласта лакун може відкладатися фібриноїд. Трофобласт вростає в стінки спіральних артерій, змінює їх властивості та чутливість до вазопресорних факторів.

З міометрієм контактує децидуальна оболонка плаценти, що має в своєму складі клітини, які розташовані в 6–8 шарів. Виділяють великі децидуальні клітини, що мають здатність синтезувати пролактин та деякі плацентарні протеїни, малі децидуальні клітини, які синтезують міжклітинну речовину та гранулярні клітини ендометрію, з імунорегуляторною функцією.

Структурно-функціональною одиницею плаценти є котиледон – стволова ворсина з її розгалудженнями, що занурена в лакуну. В сформованій до 140 доби гестації плаценті нараховується 10–12 великих, 40–50 дрібних та 140–150 рудиментарних котиледонів [64].

Окреме місце в структурі плаценти займають стовбурові і прогеніторні клітини, вважається, що вони можуть бути попередниками плацентарних структур. Їх існування забезпечується великою кількістю біологічно активних речовин, що продукуються клітинами трофобласта [45, 111].

Формування плаценти людини починається з ранніх етапів ембріогенезу, вже на стадії морули відокремлюються два типи клітин – ембріобласт, що формує структури плода, та трофобласт, що формує хоріон,

а потім плаценту. До моменту імплантації трофобласт виконує трофічну функцію, потім із зародкового трофобласта починає формуватися хоріальний епітелій та ворсинчастий хоріон.

На 6-7 добу гестації починається процес імплантації, при якому трофобласт починає виділяти протеолітичні ферменти, занурюючись в слизову оболонку матки. При цьому руйнується не тільки ендометрій, а й судини, таким чином ембріон оточується кров'ю матері. З 9–10-ї доби клітини трофобласта трансформуються в активні клітини цитотрофобласта, які формують синцитіальний шар – багатоядерний симпласт. На 2-му тижні вагітності хоріон формує вторинні ворсини: починає розвиватися сполучна тканина, що набуває вигляду сітки ніжних колагенових волокон; з клітинних компонентів з'являються фіброцити, гістіоцити, клітини Кащенко-Гофбауера. З 3-го тижня з трофобласта відокремлюються ангіобласти та починається структуроутворення судин. Васкуляризація ворсин починається з формування капілярів з плюрипотентних мезенхімальних стовбурових клітин (МСК) строми ворсин. У другому триместрі вагітності продовжується ріст та диференціювання плодового русла кровообігу – „феталізація плаценти”. Розгалуджується ворсинчастий хоріон, формуються котиледони. Витончується синцитій, зменшуються його ядра, які розташовуються нерівномірно, з'являються синцитіальні вузлики із скупченням ядер. Частки ворсин без цитотрофобласта, зі стоншеним шаром синцитію, де судини наближені до базальної мембрани та йде найбільш ефективний транспорт, утворюють синцитіокапілярні мембрани. Шар Лангханса представлено поодинокими клітинами. Зменшуються діаметр ворсин, товща синцитіокапілярних мембран, судини розташовуються ближче до базальної пластинки, збільшується обмін через плаценту. При цьому загальна обмінна площа котиледону за період вагітності збільшується в 550 разів.

У третьому триместрі вагітності розвиток плаценти сповільнюється, але не зупиняється. Продовжуються розгалуження ворсинок, витончення

синцитіокапілярних мембран, обмінна площа плаценти дорівнює 13–14 м². Піку розвитку плацента сягає в терміні гестації 36–38 тижнів, з високим ступенем проліферації, секреторної активності і здатності індукції компенсаторних реакцій на всіх рівнях організації [45]. Головна роль в цих процесах серед плацентарних структур відводиться трофобласту. Серед клітин трофобласта визначається два типи: „інвазивний трофобласт” – екстравільозний цитотрофобласт і „транспортний трофобласт” – цитотрофобласт ворсин і синцитіотрофобласт. Екстравільозний цитотрофобласт складається з цитотрофобласта колон, островців базальної пластини, септ, гладкого хоріона, а також полігональних Х-клітин. У цей гестаційний термін в екстравільозному цитотрофобласті досить часто спостерігаються камбіальні цитотрофобластичні елементи, які є джерелом відтворення цитотрофобласта. До 20% плацентарних ворсин містять синцитіальні вузлики, що обумовлюють формування *de novo* синцитіокапілярних мембран – сайтів секреції і обміну в системі мати-плацента-плід. Дослідженнями останніх років визначено значний вміст в плаценті стовбурових, прогеніторних клітин [257]. Цитотрофобластичні клітини характеризуються більш великими розмірами, ніж на ранніх строках розвитку. Характерною особливістю ядер клітин периферичного цитотрофобласта є безмембранні тільця – локуси нуклеоплазми розміром до 1мк, що складаються з гранулярного і фібрилярного компонентів з високим вмістом РНК. Стан і склад цих тілец відзеркалює інтенсивність секреції плацентарних сполук, в першу чергу репродуктивного імуномодулятора – ХГЛ. Активність плацентарних структур у цей період підтверджує наявність в них цитотрофобластичних клітин з великим ядром [42, 127]. Таким чином, плаценті в терміні гестації 36 – 38 тижнів притаманні біологічні механізми, які забезпечують високий рівень анаболічних процесів, що обумовлює специфічність програм її кріоконсервування і водночас перспективність використання таких КБПП в терапії сеньільно-інволютивних станів.

Структурно-функціональною особливістю синцитію плаценти в терміні гестації 36–38 тижнів є зовнішні числені мікроросинки з термінальними розширеннями. На поверхні трофобласта відсутні класичні молекули MNC I і MNC II, проте некласична молекула HLA G експресується. Передбачається, що вони виступають в якості ліганда інгібіторних рецепторів макрофагів і NK-клітин, чим вносять вклад в феномен імунної толерантності [136]. На нашу думку, такий біологічний механізм, при його збереженості в процесі кріоконсервування буде гальмувати відторгнення імплантованих КБПП. Базальна мембрана трофобласта, яка відокремлює епітелій від стромы, формує субінстиціальний простір з численними трофобластичними виростами, що також забезпечують процеси обміну речовин, газів, макроергів та інш.

У стромі плацентарних ворсин одна частина клітин з відростками, які переплітаючись, формують своєрідну мережу, інша частина клітин – округлі з різним ступенем вакуолізації і зернистості, які здатні до переміщення [42]. Доведено наявність у стромі ворсин осередків екстравазкулярного гемопоезу, клітин на різному ступені еритропоезу [257]. Електронно-мікроскопічні дослідження стромы дозволили визначити різницю клітинних елементів сполучної тканини, що обумовлює специфіку гістофізіології провізорних органів в залежності від терміну вагітності. Так, в пізньофетальному періоді (36–38 тижнів) строма ворсин містить опорні, підтримуючі клітини, фібробласти, фіброцити, перицити, ендотеліоцити, прогеніторні ембріональні клітини, подібні плазматичним, МСК, які є попередниками всіх клітинних форм сполучної тканини, стромы, гістіоцитів. До 45% клітин стромы ворсин складають макрофаги, що вільно розташовані в колагеновому матриксі або в резидуальних стромальних каналах (первинні компартменти) [111]. Імуногістохімічні дослідження виявили морфологічну гетерогенність популяції клітин, які експресують маркерні антигени клітин моноцитарно-макрофагального ряду, що пояснюється їх різним походженням та/або

ступенем диференціювання. На відміну від клітин трофобласта плацентарні макрофаги експресують класичні антигени головного комплексу гістосумісності I(HLA) і II (MNC) класів. На поверхні плацентарних макрофагів виявлено рецептори Fc-фрагмента IgG. Особливої актуальності ця проблема набуває при отриманні і кріоконсервуванні БПП, що мають високий ступінь васкуляризації і містять клітини крові. У плаценті містяться ангіогенні стовбурові клітини-попередники васкулогенезу. Визначено дві сигнальні системи, що регулюють цей процес. Ці системи представлено класом плацентарного васкулоендотеліального ростового фактора (VEG в тому числі P1GF), класом ангіопоетинів з відповідними рецепторами [263].

Відносно перспективи клінічного використання плацентарних структур важливою є їх доведена участь в морфогенезі і ремоделюванні тканин. Плацентарні клітини і есенціальні сполуки плаценти забезпечують розвиток структур *de novo* і адекватну перебудову існуючих тканин декількома інструментами: плацентарними факторами росту різних класів, високим рівнем анаболічних процесів, а також регуляцією процесів апоптозу. Плацентарні клітини активно продукують проапоптичні сигнали: TNF, LT, FasL, TRAIL, TWEAK, LIGHT. Водночас основною властивістю плацентарних макрофагів є визначення (завдяки набору поверхневих молекул) і поглинання апоптичних клітин, які пригнічують медіатори запалення і індукції секреції протизапальних цитокінів [45, 111].

Плацента здійснює регуляцію функцій біологічно активними нейроімуноендокринними медіаторами, що продукуються саме в плаценті. За даними різних авторів найбільші синтетичні властивості мають клітини трофобласта – цитотрофобласт та синцитій [42, 64, 177].

Трофобласт починає секрецію гормонів та інших БАР на стадії бластоцисти, коли починається його диференціювання. Існує тісний зв'язок між організмом матері та плацентою в продукції гормонів та біологічно активних молекул. Частина з них повністю секретується у плаценті, частина –

з попередників, що надходять з організму матері чи плода. В процесі розвитку секреторна функція плаценти посилюється. Речовини, що секретуються плацентою поділяють на гормони, фетальні білки та цитокіни [127].

Фетальні білки вперше були виявлені в крові вагітних жінок Торенсом в 1958 році, в 1959 році Сміт визначив, що вони входять в зону $\alpha 2$ глобулінів та назвав їх „білками зони вагітності”. До цієї групи відносять тромбастспецифічний $\beta 1$ -глікопротеїн, $\alpha 2$ -глікопротеїн, $\alpha 2$ -макроглобулін, плацентарний протеїн 2, плацентарний протеїн 5, $\alpha 1$ -мікроглобулін, плацентарний $\alpha 2$ -мікроглобулін, фактор ранньої вагітності, раковий ембріональний антиген, α -фетопропротеїн. Фетальні протеїни відіграють важливу роль у процесах росту та розвитку плода, взаємодії в системі мати-плацента-плід, імунологічних реакціях [136, 177].

Альфа-фетопропротеїн (АФП) плацентарного походження є одним із маркерів функції плаценти, регулює білковий синтез, розвиток плода, підтримує онкотичного тиск, імунологічні відношення. Білок бере участь у формуванні ауто толерантності, пригнічує синтез аутоантитіл, трансформацію Т-бластів.

Фактор ранньої вагітності та раковий ембріональний антиген приймають участь в імплантації, інвазії трофобласта та формуванні імунологічної толерантності.

До гормонів плацентарного походження відносять хоріонічний гонадотропін, плацентарний лактоген, пролактин, тиреотропний гормон, хоріонічний адренкортикотропний гормон, меланоцит-стимулюючий гормон, опіодні пептиди, прогестерон, естрогени, плацентарний лептин, релізінг-гормон кортикотропіну, кортизол, урокортин [91, 127].

Хоріонічний гонадотропін людини (ХГЛ) синтезується клітинами цитотрофобласта та синцитієм, при чому перехід цитотрофобласта в синцитій пов'язаний з підвищенням рівня ХГЛ. Його концентрація відображає

проліферативну функцію та активність трофобласта. Цей гормон стимулює стероїдогенез у гонадах, плаценті та наднирниках, пригнічує скоротливу функцію міометрію, має здатність пригнічувати реакцію бласттрансформації лімфоцитів, фагоцитоз, реакцію відторгнення трансплантата, синтез антитіл.

Плацентарний лактоген синтезується трофобластом і децидуальною оболонкою та секретується в кров матері, але не плода. Його концентрація сягає максимуму до 35–36 тижня вагітності, її зниження корелює з інволютивними змінами в плаценті. Цей білок наближений за структурою та властивостями до гормону росту та пролактину з молекулярною масою 21000–23000 кДа. Його біологічна роль – регуляція обміну вуглеводів, ліпідів; посилення синтезу білка; затримка азоту; збільшення вмісту жирних кислот; посилення толерантності до гіпоглікемічної дії інсуліну; підвищення застосування глюкози тканинами. Гормон посилює синтез ДНК, його концентрація корелює з масою та розмірами плаценти та плода. Крім того, він розглядається як імуномодулятор, рецептори до якого знайдено на Т- та В-клітинах. Гормон відіграє роль підготовки молочних залоз до лактації; контролює деякі функції мозку матері, її поведінку; секрецію окситоцину, адренкортикотропного гормону; реакції на стрес; регулює гомеостаз, осмотичний баланс, ангиогенез, співвідношення в нейроендокринній системі.

Плацентарний лептин бере участь в регуляції енергетичного гомеостазу організму, нейроендокринної та репродуктивної систем. Його експресія контролюється прогестероном, кортизолом, естрадіолом та ХГЛ. Концентрація лептину корелює з розмірами та масою плаценти, регулює дозрівання та диференціювання імунної системи плода.

Плацентарний релізінг-гормон кортикотропіну стимулює гіпофізарну та адреналові системи материнського організму, продукцію адренкортикотропного гормону, ендорфінів, простагландинів. Є дані про його пара- та аутокринну дію. Релізінг-фактор кортикотропіну, кортизол та урокортин синтезуються плацентою. Хоріонічний тиреотропін, хоріонічний

адренокортикотропін, меланоцит-стимулюючий гормони за своїми функціями та структурою подібні до гормонів гіпофізу

Прогестерон синтезується синцитієм із холестерину, сприяє імплантації, має імуносупресивну дію, впливає на обмін ліпідів, обумовлює релаксацію міометрія. Естрогени (естрадіол, естріол, естрон) синтезуються в плаценті зі стероїдних попередників. Вміст цих гормонів збільшується до кінця вагітності, вони стимулюють ріст, проліферацію тканин, підвищують активність деяких ферментів, накопичення глікогену та АТФ, посилюють тонус м'язових волокон матки [45].

Плацентарні опіюїдні пептиди (ендорфіни, мета- та лейкенкефаліни) найбільш неоднозначна група речовин, які регулюють співвідношення в нейроендокринній та імунній системі [136].

В останні роки дослідники приділяють велике значення в регуляції фетоплацентарної системи цитокінам (монокінам та лімфокінам). Цитотрофобласт та деякі клітини стромы мають здатність до синтезу цитокінів. Описані структури плаценти продукують фактор некрозу пухлини, ІЛ1, ІЛ6, ІЛ2, ІЛ8, трансформуючий фактор росту β , колонієстимулюючі фактори, інтерферони. Цитокіни при вагітності виконують ряд специфічних функцій: по-перше – це регуляція процесів імплантації, росту, інвазії, розвитку трофобласта та ембріону; по-друге – регуляція нейроендокринних взаємодій; по-третє – регуляція процесів міграції, диференціювання та проліферації імунокомпетентних клітин [136, 263].

Плацентарні структури на момент завершення гестації практично завершують свою роль. Функції плаценти щодо розвитку і життєзабезпечення плода, в основному переорієнтовані і забезпечуються фетальними системами [114]. Наприкінці вагітності в плаценті відбуваються еволюційно обумовлені інволютивно-дистрофічні зміни, що потрібні для її фізіологічного відокремлення і відходження. Розвивається редукція судинного русла ворсин. У клітинах зменшується кількість глікогену, зникають ліпіди, відбувається

декомпозиція глікопротеїнових комплексів. На поверхні пошкоджених ворсин відкладаються фібриноїди, деякі з них повністю замуrowані в ньому. Морфологічно в післяпологовій плаценті відбувається заміщення функціонуючих структур на дистрофічні у вигляді тромбів, пертифікатів, білих інфарктів. Аналогічні ознаки можуть спостерігатися і в більш ранні терміни як прояви патології вагітності [64]. Враховуючи те, що вихідний стан біоб'єктів принципово обумовлює ефективність їх кріоконсервування, нагальною є задача визначення антенатальних критеріїв відбору плацент для кріотехнологій.

Таким чином, представлені сучасні дані щодо морфофункціональної специфічності і закономірностей розвитку плаценти, на нашу думку, дозволяють визначити гестаційний термін 36–38 тижнів пріоритетним для кріобіологічного дослідження плацент з метою одержання КБПП в якості експериментального і клінічного матеріалу для низькотемпературних банків. Враховуючи те, що низькі температури, кріозахисні речовини та інші біотехнологічні заходи в певній мірі змінюють структуру, функцію а значить і біологічну дію кріоконсервованих плацентарних структур, нагальним є наукове завдання – визначення біологічної дії і біобезпеки клінічного використання КБПП.

1.3 Досягнення і перспективи клінічного застосування біоб'єктів плацентарного походження

У сучасній клітинно-тканинній терапії основними біопрепаратами визначено біоб'єкти раннього онтогенезу, серед яких максимально поліфункціональну і ефективну біологічну дію мають біоб'єкти плацентарного походження. Це обумовлено генетичною програмою і властивостями плаценти як структури, що забезпечує розвиток організму, його біозахист від ушкоджуючих факторів, а також відновлення клітин, тканин і організму в цілому [42, 45, 64, 114, 136].

Перші результати систематизованих досліджень застосування плацентарної терапії були опубліковані в вітчизняній літературі академіком В.П.Філатовим у 30-х роках двадцятого сторіччя, вони лягли в основу його теорії про біогенні стимулятори. Вже через 20 років метод тканинної терапії здобув широкого визнання [121].

Суть методу полягає в тому, що плацента, відділена від організму та витримана в умовах, які детермінують її парабіотичний стан, проходить біохімічну трансформацію та накопичує сполуки, які автор назвав „біогенними стимуляторами”. Була доведена їх властивість стимулювати процеси регенерації в організмі хворого. За методом В.П. Філатова післяпологову плаценту зберігали в стерильній склянці на льоду впродовж 6–7 діб, після чого її витримували 1 годину при температурі 60–80°C. З такого матеріалу отримували гомогенат і екстракт. Препарати перед застосуванням автоклавували 1 годину при температурі 120°C та тиску 1,5 атмосфери. В якості діючих речовин визначено деякі амінокислоти (аланін, тирозин), ферменти (каталаза), гормони (естрадіол, 17-кетостероїди, ацетилхолін), нуклеїнові кислоти, гіалуронова кислота, хондроєтинсульфат. Препарати вводили під шкіру чи кон'юнктиву від одного до 5-6 разів в залежності від методу терапії.

В експериментах доведено безпечність, антитоксичні властивості препаратів. При дослідженні їх дії на експериментальний гепатит смертність дослідних тварин знизилася вдвічі, відновлювалися рівні глутатіону і глікогену, процеси перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) у печінці. При дослідженні експериментального ендокардиту з застосуванням біостимуляторів з плаценти знижувалися показники смертності тварин, поліпшувалася гістологічна структура міокарда. Ведення плацентарних препаратів за методом Філатова лабораторним тваринам з експериментальною моделлю атеросклерозу приводило до зменшення рівня

холестерину в крові піддослідних тварин, нормалізації гістологічної структури та біохімічного складу судин.

У клініці застосування препаратів плаценти було почато з лікування офтальмологічних хворих. При патологіях рогівки, травмах ока терапія поліпшувала відновлення та регенерацію тканин. Препарати з успіхом застосовувалися в лікуванні постінфарктних змін як в експерименті, так і в клініці. При лікуванні гіпертонічної хвороби вдалося зменшити кількість таких ускладнень як ураження серця, судин, сітківки, досягнути зниження і стабілізації артеріального тиску. При виразковій хворобі шлунка зменшення симптомів спостерігали через тиждень після підсадки плацентарної тканини, але для досягнення довготривалої ремісії необхідно було повторювати процедуру декілька разів. При ураженнях печінки плацентарну терапію використовували як допоміжний засіб в лікуванні інфекційних, алкогольних гепатитів, жирових гепатозів, цирозів. У клініці ендокринних хвороб тканинна терапія застосовувалася при гіпофізарних дисфункціях, тиреотоксикозах. Крім того біостимулятори плацентарного походження застосовуються для лікування патології нервової системи, в педіатрії, хірургії, гінекології. Покращення стану на тлі такої терапії спостерігали у 50-70% хворих.

Вивчення можливості застосування плаценти в геріатрії проводилося в рамках науково-практичного співробітництва Інституту офтальмології і тканинної терапії ім. академіка В.П.Філатова та Інституту геронтології АМН СРСР. Показанням до застосування тканинної терапії вважали вікові зміни центрального та периферичного кровообігу, судинного тону, вікові нейро-ендокринні дисфункції, енцефалопатії, захворювання, пов'язані з ураженням трофіки кінцівок, зниження потенції. В результаті узагальнення великого клініко-експериментального досвіду та вираженої терапевтичної дії було доведено геропротекторні властивості препаратів плаценти [50].

При високій ефективності плацентарних біостимуляторів, слід відзначити, що біотехнологічний процес створення препаратів цього класу спричиняє руйнацію клітин і, відповідно, тканини, інактивує біологічно активні сполуки і структури білкової природи та інші термолабільні утворення. Це призводить до втрати морфофункціональних властивостей структур плаценти, а отже, не можна розраховувати на їхню гістоспецифічну біологічну дію.

Подальший розвиток плацентарної терапії зумовив появу біопрепаратів ще двох класів. Перший клас – це абіотичні матеріали типу амніоцену, плацентину, біоглобіну, екстракту плаценти, які отримували за допомогою обробки тканин агресивними середовищами і високими температурами для їхньої стерилізації та використовували в якості біопокриттів і в меншій мірі – біостимуляторів [53, 90, 181, 191, 198]. Другий клас плацентарних препаратів розроблявся дослідниками і клініцистами, які прагнули максимально зберегти біологічний потенціал плаценти. Прикладом цього є запропонований метод детоксикації та імунокорекції шляхом перфузії крові пацієнта через судинне русло плаценти. Проте, зростання інфікованості населення збудниками, що передаються гематогеним шляхом або з біоматеріалом, практично призупинило таку терапію. Виникла небезпека інфікування пацієнта при використанні нативних плацентарних біооб'єктів або навантаження організму хворого детритом мікроорганізмів та продуктами їхньої життєдіяльності у випадках застосування девіталізованих препаратів, якщо мала місце контамінація вихідного матеріалу (плаценти) збудниками інфекції.

Вирішення даної проблеми пов'язане з розвитком кріобіології: визначенням кріочутливості БПП, розробкою програм їхнього кріоконсервування і довгострокового низькотемпературного зберігання. Кріотехнології дозволяють створювати кріоконсервовані біооб'єкти з високим ступенем збереженості вітальності, довгостроково їх зберігати і всебічно тестувати, в першу чергу відносно біобезпеки застосування [20, 21, 28, 31,

106]. Біоб'єкти з плаценти, які відповідають програмованим параметрам, відносяться до таких, що можуть використовуватися в якості експериментального або клінічного матеріалу НТБ [27, 86, 92, 98, 102, 159]. Відомі результати дослідження кріочутливості плаценти (хоріона) 6–12 тижнів [81, 86] і післяпологової плаценти 40–41 тижнів гестації [39, 139, 187]. Створені кріоконсервовані фрагменти хоріона та післяпологової плаценти в певній мірі зберігали свої морфофункціональні властивості. Ці біоб'єкти були застосовані в модельних експериментах і клініці. Імплантація кріоконсервованих фрагментів хоріона вагітним, що страждали на внутрішньоутробне інфікування плода, призводила до ініціювання синтезу протизапальних цитокінів, активизації імунологічного захисту репродуктивними гормонами, купірування проявів плацентарної дисфункції, у результаті чого спостерігалася стабілізація гомеостазу в системі мати–плацента–плід, зі значним покращенням прогнозу для матері та дитини [97, 251]. У модельному експерименті при навантаженні на серцево-судинну систему в лабораторних тварин пізнього онтогенезу показано протекторну дію імплантованих кріоконсервованих фрагментів хоріона з відновленням білків міокардіоцитів і електорофізіологічних корелятивів діяльності серця [79, 95].

Попередніми власними дослідженнями та в результаті наукової співпраці з клініцистами показано, що комплекс біологічно активних плацентарних сполук, обумовлюють клінічну ефективність кріоконсервованих біоб'єктів з післяпологової плаценти при ряді захворювань і патологічних станів [31, 33, 129, 134, 185]. У хворих з кардіальною патологією виявлено оптимізацію коронарного кровотока, оксигенації і трофіки міокарда, зниження гіперліпідемії за рахунок рівней загального холестерину і ліпідів низької щільності. Ефективність імплантації кріоконсервованих фрагментів плаценти в комплексному лікуванні хворих з постінфарктним кардіосклерозом, стенокардією, ішемічною хворобою серця

пояснюється посиленням кровообігу, збільшенням парціального тиску кисню в крові, регуляцією обміну ліпідів під дією плацентарних гормонів [48, 135, 138]. Патологія ендокринного генезу, в першу чергу цукровий діабет та його ускладнення, розглядається в якості сайта плацентарної терапії з позицій функції репродуктивних гормонів плаценти – аналогів гіпофізарних релізінг-факторів, що регулюють гормональні взаємовідносини і структуроутворення тканин в організмі. Так, експериментальними дослідженнями і клінічними спостереженнями доведено позитивний вплив імплантації кріоконсервованої тканини плаценти на діабетичні мікро- і макроангіопатії, в тому числі – ретинопатії, нейропатії, виявлено тенденцію до нормалізації обмінних процесів у організмі хворого протягом 3–12 місяців [85, 94, 138, 186]. Еволюційно детермінована висока активність плацентарних факторів росту обумовила ефективність КБПП в клініці відновлювальної хірургії. При їх використанні в якості біопластичного матеріалу при хірургічному лікуванні хибних суглобів, діабетичної стопи, черевних гриж, травмах рогівки і склери, тимпанопластиці, пролежнів, стриктур стравохода, при нейрохірургічних втручаннях, в естетичній і пластичній медицині спостерігалась ефективна репарація [31, 85, 91, 94, 110,]. Гістіоспецифічну дію плацентарної терапії реалізовано в клініці акушерсько-гінекологічної патології. Введення КБПП в програми репродуктивних технологій сприяло корекції порушень генеративної функції шляхом стимуляції овуляції, відновленню сперматогенезу у пацієнтів із гіпофункцією статевих залоз, елімінації ряду імунологічних чинників безпліддя, в тому числі у жінок, які страждали на антифосфоліпідний синдром, що в результаті призводило до покращення репродуктивних прогнозів і показників [26, 34, 80, 117, 120, 174]. Наші попередні дослідження свідчать, що гетеротопічна (підшкірна) імплантація кріоконсервованих фрагментів плаценти пацієнткам, вагітність у яких була ускладнена плацентарною дисфункцією, є науково обгрунтованим і патогенетично спрямованим лікувальним заходом. Ми спостерігали його

ефективність при таких наслідках плацентарної дисфункції, як гіпоксія і гіпотрофія внутрішньоутробного плода, невиношування, слабкість і дискоординація пологової діяльності [29, 59, 67]. Біохімічний склад плацентарних речовин, що відповідає періоду раннього онтогенезу, обумовлює клінічну ефективність плацентарної терапії при патології, яка розвивається внаслідок недостатності або відсутності цих біологічно активних сполук. Така ситуація спостерігається у пацієнтів у похилому віці. Вивчення дії КБПП на сенільно-інволютивні процеси, перебіг раннього або патологічного клімаксу виявило їх позитивний вплив на психосоматичні та уrogenітальні розлади, це пояснюється вмістом в препаратах плацентарних гормонів, нейромедіаторів, ендорфінів, опіоїдів, факторів, що регулюють проліферацію та репарацію [30, 79, 82, 83, 88]. Водночас не з'ясовано механізми реалізації цих ефектів, принципи призначення КБПП пацієнтам різних вікових груп, в тому числі похилого віку. Визначення особливостей біологічної дії в залежності від ступеня дезінтеграції плацентарних структур, на нашу думку, обумовить вирішення цієї актуальної науково-медичної задачі. Специфічність морфофункціонального стану плаценти 36–38 тижнів гестації та відсутність на теперішній час кріобіологічних і кріомедичних досліджень даного біооб'єкта зумовлює науковців до визначення ефективності і механізмів дії кріоконсервованих плацентарних структур цього періоду розвитку на старіючий організм.

1.4 Сучасні уявлення про механізми старіння та геропротектори

Впродовж останніх років тривалість життя в розвинутих країнах світу збільшується з середньою швидкістю 3 місяці за рік. На початку першого тисячоліття вона дорівнювала 22 роки, наприкінці XIX сторіччя – 40–50 років, а за останні 100 років вона збільшилася ще на 20–30 років. Поясненням

цеї тенденції, безумовно, є впровадження досягнень медичної науки в систему охорони здоров'я населення.

Серед причин смертності на початку ХХ сторіччя домінували інфекційні хвороби, успішна боротьба з якими дозволила їх контролювати, однак широкого розповсюдження набули серцево-судинні хвороби, рак та судинні захворювання мозку. Доведено, що повна ліквідація інфекцій може підвищити очікувану тривалість життя на 0,2 роки, а боротьба з серцево-судинними захворюваннями – не менш, як на 10 років, боротьба з онкопатологією – на 8–10 років та досягти максимальної видової тривалості життя, яка для людини складає 100–110 років [60, 61, 122].

Сучасна демографічна ситуація характеризується суттєвим збільшенням частини населення старшого віку. Бажанням людей похилого віку подовжити життя, зберегти працездатність, фізичну, творчу і сексуальну активність, репродуктивну функцію та зменшити важкість перебігу хвороб, пов'язаних зі старінням зумовлено розвиток нових медичних технологій в геріатрії. Створення геропротекторів, лікувально-профілактичних засобів, здатних підвищувати біологічні можливості організму, що старіє, запобігати патологічному, прискореному старінню, може бути здійснено лише при визначенні механізмів та етіопатогенезу старіння.

Старіння – це складний процес перебудови та пристосування організму до умов довкілля при специфічних функціональних та адаптивних можливостях, а також прогресивного ушкодження та зниження якості життя. Старіння характеризується зниженням надійності регуляції функціонування систем організму, зниженням діапазону пристосування до різних навантажень, які з'являються протягом життя. При цьому спостерігається зміна функціональних станів організму, які проходять чотири етапи: 1) оптимальний базальний рівень функцій, високі потенційні можливості; 2) збереження оптимального та потенційного рівня завдяки включенню адаптаційних механізмів; 3) збереження базального та зниження

потенційного рівня, зниження адаптаційних можливостей завдяки настанню вікових порушень; 4) падіння базального рівня, прогресуюче зниження адаптаційних можливостей. Для старіння характерними є гетерохронність, гетеротопність, гетерокінетичність та гетерокатефтенність проявів, пов'язаних зі зниженням функцій організму [3, 43, 60, 132].

На теперішній час найбільш доведеними теоріями старіння є адаптаційно-регуляторна теорія вікового розвитку В.В. Фролькіса, наукові положення А.А. Богомольця щодо провідної ролі в патогенезі старіння ушкоджень сполучної тканини, вільнорадикальна теорія Д.Харфмана, теорія клітинного старіння Л. Хейфліка, теломерна теорія А.М. Оловнікова та елеваційна теорія В.М. Дільмана [60, 74, 122, 142].

Усі теорії поділяють на вірогідносні (стохастичні) та теорії програмованого старіння. До перших відносять теорію соматичних мутацій, катастрофічних помилок, ушкодження ДНК, білків, теорію зшивок макромолекул та зносу клітин. До теорії програмованого старіння відносять генетичні теорії, теорії запрограмованої гибелі, укорочення теломер, порушення диференціювання та накопичення „помилки”. Процеси старіння генетично детерміновані. Кожен вид має свою визначену тривалість життя від декількох діб до десятиріч. У багатьох лабораторних тварин виявлені окремі гени, відповідальні за тривалість життя. У людини з довголіттям асоційовані гени АРОЕ, АРОВ, АРОСІІІ, мітохондріальна ДНК. Багато спадкових хвороб пов'язані з передчасним старінням, існують генетично детерміновані форми прогерій [9, 12, 14]. Прихильники еволюційних теорій старіння стверджують, що старіння є запрограмованим процесом, а не необхідною властивістю організму. Відповідно, старіння розвивається в результаті еволюції у зв'язку з низкою переваг для популяції в цілому. На відміну від них, теорії „ушкодження” пояснюють старіння результатом природного процесу накопичення ушкоджень з часом, з якими організм намагається

боротися, а термін життя в значній мірі обумовлено результатом ефективності цієї боротьби [123, 142, 193].

Сучасна геронтологія визначає ряд молекулярних механізмів старіння. Основні механізми ушкодження макромолекул діють паралельно або залежать один від одного. По-перше, це метилювання ДНК. Вважається, що з віком збільшується кількість гіперметилюваної ДНК тому метилювання деяких генів асоціюється з прискореним старінням. По-друге, це гліколізування білків та ДНК, яке асоціюється не тільки зі старінням, а й з віковою патологією. По-третє, при старінні підвищується частота спонтанних мутацій, знижуються репараційні процеси, змінюється структура генів [12, 14].

В основу еволюційно-генетичного підходу лягла теорія накопичення мутацій Пітера Медавара. Відповідно до його ідеї, алелі, що виникли в результаті мутацій зародкових клітин і проявляються в похилому віці, підлягають досить слабкому еволюційному тиску, навіть, якщо в результаті їх дії зменшуються виживання і розмножування. Таким чином, ці мутації можуть накопичуватися в геномі протягом багатьох поколінь. У подальшому Д.Вільямс припустив існування плейотропних генів, що мають різний ефект для виживання в різні періоди онтогенезу. Дія цих генів корисна в молодому віці, коли ефект природного відбору потужний, але шкідлива пізніше, коли цей ефект значно слабше. Сьогодні ця ідея відома як антогоністична плейотропія. Разом ці теорії складають основу сучасних уявлень щодо генетики старіння [14, 60]. Проте ідентифікація відповідальних генів має обмежений успіх, відомості про накопичення мутацій залишаються суперечливими, а дані, щодо наявності плейотропних генів більш переконливі. Прикладом таких генів є теломераза. В багатьох клітинах людини втрата здатності до поділу, яка призводить до старіння клітинної популяції, пов'язана з відсутністю теломер на кінцях хромосом внаслідок певної кількості поділів. Це відбувається через відсутність ферменту

теломерази, що експресується у зародкових і стовбурових клітинах. Збільшення з віком кількості клітин з дефіцитом цитохром-с-оксидази, яке асоційоване з мутаціями в мітохондріальній ДНК, а також порушення в цих клітинах продукції АТФ і енергетичному балансі є основою мітохондріальної теорії старіння. Суть теорії полягає в тому, що уповільнення розмноження мітохондрій у високодиференційованих клітинах внаслідок дефіциту мітохондріальних білків, які кодуються в ядрі, створює умови для неефективної селективної елімінації дефектних мітохондріальних ДНК, збільшення частки яких поступово знижує енергетичне забезпечення клітин [142].

У більшості цих процесів важливу роль відіграють активні форми кисню, вільні радикали. Численні наукові дані щодо їх негативного впливу у вигляді окислювального стресу при старінні поєднані у вільнорадикальну теорію старіння [35, 74, 141, 146, 266]. Окислені білки є типовим результатом впливу активних форм кисню, що утворюються внаслідок метаболічних процесів у клітині похилої людини. Механізми репарації не завжди можуть ідентифікувати такі білки, оскільки стають менш ефективними з віком – за рахунок зниження активності протеасом. У випадках, коли змінені білки стають частиною таких структур, як клітинні мембрани, виникає загроза для цілісності клітини і її органел. Залежність обміну білків від білків-шаперонів, які допомагають їм отримувати необхідну конформацію, пояснює зниження репаративної активності з віком за рахунок перевантаження шаперонів і протеасом ушкодженими білками. Ушкоджені білки накопичуються з віком і є складовою патогенезу катаракти, хвороб Альцгеймера, Паркінсона та інш. У теорії соматичних мутацій доводиться, що відновлення цілісності ДНК після дії таких факторів, як активні форми кисню, жорстка радіація та інше, може відбуватися за рахунок механізмів репарації. Дійсно, виявлено залежність між довголіттям і репарацією ДНК, як це було продемонстровано на прикладі ферменту АДФ-рибозо-полімерази-1 (PARP-1) – важливого „гравця” в

клітинній відповіді на ушкодження ДНК. Так, більш високі рівні PARP-1 асоціюються з більшою тривалістю життя [165, 171, 194].

Епігенетична теорія старіння базується на таких положеннях: клітини з часом втрачають маркери репресованого хроматину, що призводить до дерепресії дрімаючих транспозонів, відповідно до збільшення кількості ініційованих ними ушкоджень ДНК, з наступною активацією системи її репарації, що, окрім участі у відновленні ДНК, може викликати несанкціоновані рекомбінації в теломерах. Не виключається, що рекомбінази транспозонів можуть безпосередньо ініціювати подібні рекомбінації. В результаті даний процес прискорює втрату теломерної ДНК у десятки разів, а наступний апоптоз більшості клітин зумовлює старіння як біологічне явище [12, 43].

Відповідно до стохастичної природи ушкоджень окремі клітини старіють, наприклад, у зв'язку з досягненням границі Хейфлика швидше ніж решта, такі клітини потенційно загрожують здоров'ю тканини і організму в цілому, оскільки мають більший потенціал при створенні мутантних, можливо, ракових клітин. Саме такі клітини відповідають на ушкоджуючий вплив ініціацією програми апоптозу. Водночас, в похилому віці апоптоз буває неефективним, а явища масового апоптозу в тканинах є ознакою збільшення кількості ушкоджених клітин. Таким чином, p53 і скорочення теломер – важливі фактори розвитку апоптозу клітин – можуть розглядатися як приклад антигоністичної плейотропії [14, 60, 126].

Плідним є аналіз механізмів старіння з позицій загальнобіологічних категорій регулювання і пристосування. Відповідно до адаптаційно-регуляторної теорії вікового розвитку, яка була розроблена провідним вітчизняним геронтологом В.В.Фролькісом, поряд із руйнівним процесом старіння розвиваються процеси антистаріння (вітаукт). Первинні зміни відбуваються в регуляторних генах, потім в структурних, порушення в

алостеричному регулюванні, що є причиною порушень обміну і функцій клітин при старінні [9].

У процесі старіння велику роль відіграє зниження адаптивно-приспосувальних реакцій та можливостей організму, чутливості до стресу та змінених факторів довкілля, за що відповідають регуляторні системи: нервова, імунна та ендокринна [132].

Нервова система людини відіграє ключову роль в старінні та з віком набуває прогресуючих змін на всіх рівнях організації – структурному, біохімічному та функціональному [142]. Зменшується маса мозку, об'єм білої та сірої речовини. Найбільш вираженою є втрата нейронів спинним мозком, мозжечком, базальними гангліями. При значних втратах можуть розвиватися такі нейродегенеративні захворювання, як хвороба Альцгеймера, Паркінсона. Крім того відбувається зменшення кількості дендритів і синапсів, утворення бляшок з накопиченням амілоїду, клітин глії, порушується структура нервових клітин. При цьому кількість глії практично не змінюється. Зміни в периферичній та вегетативній нервових системах характеризуються втратою нейронів, нервових закінчень, демієлінізацією [132], біохімічні процеси в нервовій системі – порушенням обміну нейромедіаторів, функціональні зміни в нервовій системі – загальмованістю поведінки, ускладненням процесів засвоєння інформації, порушенням короткотермінової пам'яті. Порушуються співвідношення циклів сну, біоелектрична активність мозку, локомоторна функція, терморегуляція. Ці зміни характеризуються гетерохронністю: перші прояви зниження функцій спостерігаються в 40–50 років, а після 75 років настає різке їх зниження.

З віком знижуються чутливість до стресу та адаптивні можливості. Ключову роль у реалізації адаптаційних процесів відіграє система гіпоталамус-гіпофіз-наднирники за рахунок кортикотропін-релізінг гормону, адренкортикотропного гормону (АКТГ) та глюкокортикоїдів. Доведено, що з віком здатність дексаметазону впливати на рівень кортикотропін-релізінг

гормону та АКТГ зменшується, як і здатність глюкокортикоїдів впливати на рівень цукру в крові. Іншими словами, в похилому віці організм знаходиться в умовах постійного хронічного стресу, в стані гіперадаптозу, тому є беззахисним в умовах реального стресу. В механізмі гіперадаптозу відіграє роль зниження рівнів біогенних амінів в гіпоталамусі, зниження кількості рецепторів до глюкокортикоїдів, рівень апоптозу та експресії антионкогену bcl-2 [14, 43].

Вікова патологія імунної системи характеризується підвищеною чутливістю до інфекційних агентів, імунодефіцитними станами, зниженням протипухлинного захисту, збільшенням аутоімунних хвороб, що дає привід визначити суттєву роль вікових змін імунітету в геріатричній патології [3, 13].

По-перше, змінюються проліферативні характеристики клітин, здатність відповідати на стимуляцію (антигенами, мітогенами). По-друге, пригнічується відповідь на інтерлейкіни, міжклітинні взаємодії. По-третє, порушується здатність В-клітин до диференціювання в плазмоцити, зменшується синтез антитіл [60].

Відповідно до елеваційної теорії старіння [9, 43], відбувається підвищення порогу чутливості гіпоталамусу до ряду факторів та гомеостатичних сигналів. Вікові зміни та хвороби старіння трактуються як генетично запрограмовані порушення в трьох основних „супергомеостатах” (репродуктивному, адаптаційному та метаболічному), які можна сповільнити, якщо стабілізувати їх на досягнутому в зрілому віці рівні. Підтверджено, що у щурів похилого віку знижується чутливість гіпоталамо-гіпофізарної системи на введення ряду гормонів (естрогени, інсулін, кортизол та інші), що призводить до хвороб старіння (діабет, атеросклероз, серцева та онкопатологія).

Відомо, що гормон росту стимулює синтез ДНК, білка, контролює поділ клітин, гіпертрофію. Активація рецепторів гормону росту в тканинах призводить до синтезу інсуліноподібного фактора росту з подібними

функціями. З віком секреція гормону росту та інсуліноподібного фактору росту знижуються, порушується зворотній зв'язок в системі регуляції. Підвищення концентрації рецепторів до цих речовин, часто двократне, не компенсує зміни. Оскільки гормон росту є стимулятором ангіогенезу, судинну недостатність також пов'язують з його дефіцитом. Знижуються процеси репарації в нервовій та м'язовій тканинах, порушення регуляції вживання глюкози призводить до розладу пам'яті, ожиріння. Введення пацієнтам гормону росту короткими курсами призводить до функціонального відновлення, але підвищує ризик онкопатології, скорочує тривалість життя [258]. Це свідчить про те, що існуюча медикаментозна терапія геріатричних змін має багато вад і потребує нових підходів.

Результати експериментально-клінічних досліджень функції епіфіза підтверджують його роль у механізмах старіння і вітаукта [51, 123, 247]. Доведено, що видалення епіфіза у тварин, скорочує тривалість життя, а його трансплантація старим тваринам чи ін'єкції епіталаміну призводить до його подовження. Продемонстровано, що епіталамін підвищує поріг чутливості гіпоталамуса до глюкокортикоїдів, покращує чутливість тканин до інсуліну [54].

Розробка методів боротьби зі старінням та хворобами похилого віку є важливою задачею сучасної медицини. На теперішній час геріатрія визначає 3 типи зв'язку між старінням та хворобами: 1) хвороби, що мають тяжкий перебіг у похилому віці, 2) хвороби, які частіше спостерігаються в похилому віці, 3) хвороби, які є наслідком старіння [54, 61, 122].

Загально прийнятим в сучасній геронтології є постулат про здоровий спосіб життя, що є важливим для людей похилого віку і складається з необхідності досить високого рівня рухової, інтелектуальної і духовної активності, геродієтики (обмеження споживання калорійних продуктів при достатньому вмісті в них біоактивних субстанцій), позитивної психоемоційної домінанти, соціальної адаптації. Доведено, що фізіологічне навантаження

органів і систем організму, запобігає передчасному старінню, сприяє їх функціональному і структурному удосконаленню. Активна діяльність є джерелом потужних стимулюючих впливів на обмін речовин, чинить мобілізуючий вплив на рефлекторні і гуморальні механізми забезпечення гомеостазу організму. Водночас, детренування функцій в похилому віці призводить до атрофії пов'язаних з нею систем [142, 193]. Хоч у підтримці гомеостазу старіючого організму важливим є спосіб життя людини, сучасні дані доводять позитивно-коригуючий вплив біологічно активних сполук на процеси старіння. Речовини, що застосовуються в геріатрії, поділяють на дві групи. По перше, це геропротектори, які можуть пролонгувати життя, що було продемонстровано в досліджах на тваринах. По друге, це геріатричні засоби, які можуть поліпшувати якість життя та важливі для профілактики хвороб старіння. При розробці геріатричних препаратів повинні враховуватися необхідні вимоги до них: низька токсичність, широкий спектр терапевтичної дії, вплив на неспецифічні процеси геронтогенезу, відсутність залежності [40, 41]. При цьому дослідники зазвичай базуються на тій чи іншій теорії старіння та звертають увагу на можливу побічну дію препаратів, специфічність біореагування організму в період пізнього онтогенезу. Застосування антиоксидантів в якості геропротекторів ґрунтується на теорії вільнорадикального окислення, яка розкриває не тільки механізми старіння, а й пов'язані з ним патологічні процеси. В експериментах встановлено, що вживання антиоксидантів (аскорбінова кислота, α -токоферол, β -каротін) сприяло зменшенню кількості хвороб, пов'язаних зі старінням [41, 141, 204, 249].

При вивченні інгібіторів перехресного зв'язування макромолекул (комплексони, хелатні агенти – унітіол, пеніциламін) продемонстровано подовження тривалості життя лабораторних тварин, але питання про їх вплив на розвиток хвороб залишається дискутабельним [123].

У велику групу геропротекторів об'єднані адаптогени [41]. До них відносять препарати на основі женьшеню, гінкго білоба, елеутерококу, зеленого чаю, червоного вина. Адаптогени і полівітамінні комплекси використовуються в медицині впродовж багатьох сторіч, їх властивості впливати на метаболізм, їх здатність знижувати важкість хвороб старіння доведено емпірично та експериментально. Дія янтарної кислоти та препаратів, які її містять експериментально вивчена В.В. Фролькісом, В.Н. Анісімовим. Доведено, що її вміст з віком зменшується, додавання препарату до раціону піддослідних тварин не підвищувало середню тривалість їх життя, але збільшувало максимальну та знижувало ризик спонтанного виникнення пухлин [13, 123].

При вивченні геропротекторної дії кортикостероїдів показано, що вони можуть пролонгувати життя маложивучих ліній, це пов'язують з можливим пригніченням аутоімунних процесів. Дегідроепіандростерон має здатність пригнічувати синтез ДНК, супероксидів, знижувати масу тіла, має антиатерогенну, антидіабетичну та антиаутоімунну активність. Додавання його до раціону щурів зменшувало виникнення вікової патології, спонтанних аденокарцином, збільшувало тривалість життя [3]. Зміна з віком обміну біологічно активних речовин у нервовій системі дала поштовх до використання нейротропних препаратів в якості геропротекторів. Додавання до корму лабораторних тварин попередників катехоламінів призводило до подовження репродуктивного періоду. Механізмом цього процесу вважають інгібування срес-викликаної активації перикисного окислення ліпідів.

Досить вивченим є вплив естрогенів та комбінованих оральних контрацептивів на тривалість життя, розвиток спонтанних пухлин та вікових хвороб. Хвороби старіння хвилеподібно з'являються у жінок у постклімактеричному періоді. У жінок, які в менопаузі застосовували замісну гормональну терапію, або препарати, що містили статеві гормони виявлено

зниження ризику виникнення остеопорозу, атеросклерозу, інфарктів, інсультів та злоякісних пухлин [105, 120, 208, 209].

При дослідженні в клініці продемонстровано, що введення чоловікам похилого віку гормону росту підвищує синтез білка, збільшення м'язової маси, знижує відкладення жиру та пригнічує процеси перикисного окислення ліпідів. Але недоліком цього методу є труднощі у встановленні оптимальної дози та ризик неопластичних процесів [183, 258].

Антидіабетичні бігуаніди, які мають властивості поліпшувати утилізацію глюкози, пригнічувати гліюконеогенез, застосовувати жирні кислоти у якості енергетичного субстрату, знижувати концентрацію холестерину в крові, також у свій час були запропоновані в якості геропротекторів [41].

Вивчені геропротективні властивості мелатоніну, пептидів епіфіза, які пролонгують життя лабораторних тварин при умові застосування в нічні часи. Механізм цієї дії пов'язують з антиоксидантними, антиапоптичними та імуномодуючими ефектами, впливом на трансляцію окремих генів [50].

Крім вищезазначених груп препаратів, в якості геропротекторів застосовувалися імуномодулятори, дія яких пов'язана зі зниженням кількості аутоімунних захворювань та підвищенням здатності організму протидіяти інфекції та ентеросорбенти, їх ефект пов'язаний з властивістю виводити токсичні продукти з організму [41].

Аналіз В.Н. Анісімовим експериментальних даних різних дослідників виявив, що антиоксиданти подовжують тривалість життя лабораторних тварин на 13 – 44%, інтермедіати – на 6 – 31%, нейротропні препарати – на 6 – 34%, гормони – на 4 – 25%, антидіабетичні препарати – на 7 – 21%, пептиди та імуномодулятори – на 7 – 42%, ентеросорбенти – на 7 – 19%, адаптогени – на 17 – 21%. При цьому результати досліджень, які були проведені в Інституті геронтології АМН України, довели геропротекторну активність геровіталу,

суспензії плаценти, екстракту плаценти, тималіну, епіталаміну, спленину, деяких вітамінних комплексів [3, 51].

З вищенаведеного стає зрозуміло, що більшість речовин, які застосовувалися в геріатрії, містяться в тканинних препаратах [41]. Цю закономірність дослідники помітили наприкінці XIX сторіччя, коли в 1889 році Броун-Секар провів перші досліді з застосуванням екстрактів сім'яних залоз для омолодження. Через 20 років подібні експерименти описав Штейнах. У цей же час С.А. Воронов проводив досліді з застосуванням імплантації статевих залоз. У 1901 році академік І.І. Мечніков сформулював теорію клітинних ядів, низькі дози яких можуть призводити до стимуляції життєвих процесів. Цей науковий напрямок отримав розвиток завдяки роботам М.П. Тушнова, А.А. Богомольця, В.П. Філатова. М.П. Тушнов обґрунтував теорію, згідно з якою продукти тканинного розпаду (гемолізати) стимулюють обмін речовин, зокрема він описував дію альбумоз та пептонів на гомологічні тканини. А.А. Богомолец в 1924 році висунув гіпотезу, в основі котрої лежать зміни в сполучній тканині, в якій з'являються зшивки між білками. Автор вважав, що білки, введені в організм, мають стимулюючу дію на мезенхіму, він впровадив у клінічну практику лікування антиретикулярною антитоксичною сироваткою, яка застосовувалася, як геріатричний препарат до середини XX сторіччя.

В.П. Філатов обґрунтував теорію біостимуляторів, впровадив в клінічну практику плацентарну терапію [121]. Препарати цього класу (екстракт, суспензія або сублімовані тканини плаценти) виявили найбільший поліфармакологічний терапевтично-профілактичний ефект, але при повторних курсах лікування досить часто виникали небажані для людей похилого віку ефекти, пояснювалися надмірною стимуляцією органів і систем з подальшим виснаженням їх резервного потенціалу. До того ж технологія отримання плацентарних біостимуляторів з інактивацією термолабільних

сполук і структур практично нівелює їх тканинспецифічність і поліфункціональність.

В.Г. Морозов та В.Х. Хавінсон обґрунтували концепцію біорегуляторної терапії на основі застосування пептидних сполук при старінні. Препарати, які одержали назву «цитаміни» отримували з тканин тварин за допомогою оцтової екстракції. Отримані пептидні біорегулятори призводили до відновлення функцій тих органів, з яких були виділені. До клінічного застосування були дозволені декілька препаратів: епіталамін, тималін, простатилін, кортексин, ретиналамін, церебрамін, корамін, епіфамін. Доведено вплив цитамінів на процеси диференціювання, проліферації, зміни функціональної активності геному та процесів синтезу білка. Препарати застосовували у якості геропротекторів для лікування вікової патології: дисциркуляторної енцефалопатії, ішемічної хвороби серця, клімактеричних розладів [51].

Проте ксенопоходження цього класу препаратів детермінує досить жорсткі режими стерилізації матеріалу, що в значній мірі знижує активність діючих речовин з практично повною інактивацією органоспецифічних сполук білкової природи. Видова невідповідність, наявність у препаратах продуктів розпаду мікроорганізмів (що утворилися в процесі стерилізації матеріалу) обумовлює високу вірогідність алергізації організму при застосуванні. Враховуючи знижені можливості імунної системи в похилому віці, слід враховувати ризик виникнення ускладнень у пацієнтів при лікуванні ксенопрепаратами.

Таким чином, можна зробити висновок, що програми корекції геріатричних змін представлені різними класами лікарських препаратів, застосування яких часто призводить до ускладнень від фармакологічної агресії [40, 41]. Водночас, недостатня ефективність існуючих геропротекторів зумовлює активний пошук природних комплексних біорегуляторів, спрямованих на відновлення порушених з віком функцій організму. Сучасні

уявлення про механізми старіння обумовлюють принципову можливість регулювання функцій і обмінних процесів старіючого організму, їх нормалізації в межах, що відповідають певним віковим періодам. В широкому діапазоні геронтологічних досліджень особливого значення набуває пошук засобів, які б комплексно і фізіологічно впливали на процеси обміну на молекулярному, клітинному, органному і системному рівнях організму похилих людей. Таким критерієм, на нашу думку, відповідає терапія з використанням плацентарних структур, в яких максимально збережені вітальність і потенціал біологічної дії (що можливо при ефективному їх кріоконсервуванні). Передбачається, що при цьому будуть реалізовуватися геропротективні механізми, а саме: корекція порушень клітинного метаболізму; нейроендокринної регуляції, імунітету; структуроутворення сполучної тканини, підвищення компенсаторних механізмів; відновлення реактивності організму на внутрішні та зовнішні біосигнали.

Водночас застосування КБПП з потужною і багатовекторною біологічною дією, які онтогенетично відповідають моменту народження пацієнтам у період пізнього онтогенезу, коли діапазон функціональних можливостей є обмеженим, а чутливість до біологічних агентів змінена, потребує ретельного наукового обґрунтування, обережності при використанні, забезпечення біобезпеки і визначення механізмів їх дії.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Обґрунтування обраного напрямку

Дослідження кріочутливості біологічних об'єктів раннього онтогенезу є актуальним напрямком сучасної кріобіології і кріомедицини [21, 27, 71]. Особливу увагу дослідників привертає плацента, яка є унікальним поліфункціональним провізорним органом. Плацента забезпечує розвиток, життєдіяльність внутрішньоутробного плода; регулює материнсько-плодові гемостазіологічні, імунологічні, метаболічні відношення; здійснює системний захист організму матері і дитини від ушкоджуючих чинників під час вагітності. Клітинний склад плаценти характеризується значним відсотком стовбурових, прогеніторних кліти, клітин-попередників екзо-, мезо- та ендодермальних структур. У плаценті визначаються гемопоетичні, ендокринні, імунокомпетентні клітини і сполуки. Біохімічний потенціал плаценти забезпечує формування всіх органів і систем організму, а також їх репаративне відновлення [42, 64, 114]. При застосуванні БПП в якості геропротекторів можна очікувати, що завдяки їх аутентичним властивостям, вони будуть ефективно корегувати сенільно-інволютивні зміни у пацієнтів похилого віку. Проблема збереження морфофункціональних характеристик плаценти вирішується її ефективним кріоконсервуванням, низькотемпературним збереженням в відповідному кріобанку [32]. Водночас морфологія, фізіологія, біохімія та молекулярна біологія плаценти суттєво змінюються в процесі гістогенезу [64, 127], що потребує визначення гестаційного періоду для її отримання, методів кріоконсервування, дослідження виділених КБПП відносно їх біологічної дії. Відповідно до

цього, основними напрямками дослідження нами обрано визначення процесів, що відбуваються в плаценті 36–38 тижнів гестації, на етапах кріоконсервування з наступним системним аналізом отриманих даних, на основі якого будуть створені ефективні програми кріоконсервування плаценти, а також визначення впливу КБПП на клітини, тканини та організм реципієнтів пізнього онтогенезу.

Дослідження проводилося в період 1998–2012 років на базах Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, ДП «Міжвідомчий науковий центр кріобіології і кріомедицини НАН, АМН, МОЗ України», спеціалізованого клінічного пологового будинку №5 м. Харкова.

Основними принципами при виконанні дослідження, виборі моделей та методів експериментальних досліджень є їх відповідність до поставленої мети та завдань, відтворюваність, достатня інформативність.

Відповідно до концепції дисертаційної роботи вона складалася з 4-х послідовних етапів.

На першому етапі проводилися наукове обґрунтування і розробка біотехнологій створення БПП різного ступеня дезінтеграції біоструктур, визначення їх морфофункціональних характеристик і збереженості на етапах програм кріоконсервування, що розроблялися.

На другому етапі вивчали біологічну активність і біобезпеку КБПП в системах *in vitro* та *in vivo* з наступним визначенням біопрепарату вибора для лікування осіб похилого віку.

На третьому етапі виявляли ефективність і механізми біологічного впливу КФП на організм реципієнтів в періоді пізнього онтогенезу.

Враховуючи перспективність запровадження КБПП в медико-біологічні галузі, на четвертому етапі досліджень визначали науково-організаційні принципи створення і функціонування низькотемпературних банків КБПП.

У роботі було застосовано сучасні методи експериментальної медицини, кріомедицини та кріобіології: клітинні та тканинні біотехнології;

клініко-лабораторні, клініко-інструментальні, імуноферментні, спектрофотометричні, імуногістохімічні, біохімічні, гістологічні дослідження; культивування *in vitro*; проточна цитофлуориметрія, електронна мікроскопія; морфометричний аналіз, тести на аномальну токсичність, тератогенність, ембріолетальність, методи статистичного аналізу отриманих даних.

Враховуючи мету, задачі дослідження та етапи проведення роботи, використовували різні способи отримання плацентарних біооб'єктів різного ступеня дезінтеграції та їх кріоконсервування, досліджували стан плацентарних структур на етапах кріоконсервування, їх властивостей на клітинні лінії, проводили дослідження ембріотоксичності, тератогенності, аномальної токсичності препаратів плаценти, досліджували вплив препаратів плаценти на організм тварин пізнього онтогенезу, проводили контент-аналіз даних щодо діяльності низькотемпературних банків.

2.2. Методи отримання субклітинних, клітинних та тканинних органоспецифічних біооб'єктів плацентарного походження

Отримання біологічного матеріалу з метою подальшого кріоконсервування та застосування при різних патологіях є найважливішим етапом дослідження, оскільки як кріочутливість, так і подальше функціонування препаратів залежать від вихідного морфофункціонального стану матеріалу.

При одержанні БПП важливо антенатально встановити прогностичні показники структурної повноцінності і функціональної активності плаценти. Обумовлено це тим, що час від отримання плаценти після пологів до її кріоконсервування повинен бути мінімальним, тобто його недостатньо для встановлення її якості.

Для визначення антенатальних критеріїв вихідного стану плаценти щодо доцільності її використання в якості джерела для подальших

кріобіологічних технологій і досліджень обстежували вагітних.

Відповідно до тематичної картки було обстежено 197 вагітних жінок і проаналізовано 170 історій і пологів у терміні гестації 36–41 тиждень. Визначали термін вагітності, анамнез, наявність ускладнень гестаційного процесу. Звертали увагу на вік і стан пацієнток, наявність скарг, анамнестичні дані щодо хронічних, рецидивуючих, інфекційних, спадкових, аутоімунних захворювань. Аналізували репродуктивну функцію – кількість попередніх вагітностей та пологів, їх особливості та результати, характер пербігу наявних вагітності і пологів (акушерська, гінекологічна, екстрагенітальна патологія). Методами імуноферментного аналізу (ІФА), за допомогою ДНК діагностики, мікробіологічними і бактеріологічними дослідженнями визначали можливу материнсько-плодову інфікованість. Проводили ультразвукове дослідження (в тому числі доплерометрію) фетоплацентарного комплексу. Визначали рівні сполук, що секретуються переважно плацентою і можуть свідчити про її активність: пролактин (ПЛ), ХГЛ, АФП в сироватці крові пацієнток методами ІФА.

Отримані дані співвідносили з морфофункціональними характеристиками післяпологової плаценти. Матеріалом для цих досліджень і біотехнологічних розробок були 330 фрагменти з 197 післяпологових плацент, що отримували за інформованою згодою породіллі.

Після завершення пологів, народження дитини, відокремлення плаценти і виділення посліду оцінювали стан новонародженого за шкалою Апгар та посліду (проводили плацентометрію, визначали вагу плаценти, плодово-плацентарний індекс, наявність патологічних ознак). З центральної і крайової ділянок плаценти відокремлювали фрагменти плаценти від децидуальної до амніотичної оболонки вагою до 5 грамів для дослідження. Життєздатність і активність обмінних процесів у тканині плаценти оцінювали за наявністю та характером гранулоутворення в цитоплазмі клітин ворсин плаценти за методом Александрова [16, 18]. З цією метою часточки плаценти

вагою до 0,2 г витримували в 0,05% розчині нейтрального червоного протягом 5 хвилин, після чого досліджували за допомогою світлового інвертованого мікроскопа Delta Optical NIB 100 (Польща) з окуляром 10 і об'єктивом 40. Мікрофотозйомку в реальному часі проводили за допомогою мікроскопа XSP-139TP (Китай, Японія). Проникнення барвника в клітини, залучення його в обмінні процеси, накопичення у вигляді гранул розцінювалося як активність метаболізму в тканині.

Частину зразків для гістологічного досліджування фіксували в 10% розчині нейтрального формаліну, за стандартною методикою заливали парафіном. Зрізи (5–7 мкм) отримували на мікротомі, забарвлювали гематоксиліном та еозином [62], досліджували за допомогою світлового мікроскопа XSP-139TP (Китай, Японія) з окуляром 40 і об'єктивом 10. Мікрофотозйомку проводили за допомогою мікроскопа XSP-139TP (Китай, Японія) та програмного забезпечення TourView v.3.7.

Визначали відповідність даних пренатального обстеження морфофункціональним характеристикам отриманого післяпологового плацентарного матеріалу.

У подальших дослідженнях використовували плаценти із морфологічними показниками, що відповідали високому ступеню функціональної активності.

Для забезпечення стерильності плацентарного матеріалу всі етапи роботи з ним проводили з дотриманням вимог асептики і антисептики. Дослідження виконували в умовах лабораторного боксу з ламінарним забезпеченням. В якості антисептичного засобу при підозрі на можливу інфекційну контамінацію в розчини (живильні, ферментативно-дезагрегуючі, відмивочні, ресуспендуючі середовища) додавали 200 од/мл ампіоксу. Даний вибір ґрунтувався на поєднанні в одному препараті двох антибіотиків з широкими спектрами дії на патогенну флору і низькими показниками токсичності.

З ділянок материнської поверхні плаценти, отриманої і доставленої відразу після пологів, гострим шляхом відокремлювали фрагменти вагою до 100 г, розташовували у флаконах з середовищем 199 у співвідношенні 1:1. Після цього матеріал поділяли на 3 частини для отримання БПП різного ступеня дезінтеграції: кріоекстракту, клітин, фрагментів плаценти.

Методи отримання БПП реалізовували базуючись на власних дослідженнях і біотехнологічних розробках [39, 84, 86, 91, 104, 139, 187].

Для одержання кріоекстракту плаценти (КЕП) одну частину тканини плаценти переносили в іншу посудину, видаляли живильне середовище, додавали 0,9% розчин NaCl у співвідношенні 1:2 і заморожували відповідно до розроблених програм (табл. 2.1.). Метою цих програм є максимальне екстрагування есенціальних сполук з клітин і позаклітинної речовини плаценти зі збереженням структури, біологічної активності плацентарних біомолекул, їх фізіологічних співвідношень та максимальним видаленням клітинно-тканинного детриту. Проводили порівняння 4-х програм кріоекстрагування, що відрізнялися кількістю циклів заморожування–відтаювання (від 1-го до 4-х). При отриманні КЕП кріоконсерванти не використовували.

Заморожування біоматеріалу та реєстрацію температури проводили на з використанням програмного заморозувача ЗП–10 (Україна).

Біооб'єктами порівняння були також сироватка плацентарної крові людини (СПКЛ) (для оцінки збереженості фізіологічних співвідношень БАР) і медичний імунобіологічний препарат (МІБП) кріоцелл-кріоекстракт плаценти (з доведеною клінічною ефективністю).

СПКЛ отримували з інформованої згоди жінки. Після народження і відокремлення дитини і до відокремлення плаценти з пуповинної вени (плацентарної частини пуповини) з використанням системи для взяття крові в стерильні сухі завальцовані флакони об'ємом 50 мл набирали плацентарну кров. Для утворення згустку флакони з кров'ю витримували за кімнатної

температури 4 години, з наступним витримуванням в умовах холодильника за температури 4°C протягом 10 годин. Відокремлення сироватки від згустку проводили дворазовим центрифугуванням при 3000 об/хв протягом 10 хвилин, з наступним зняттям надосада – СПКЛ, котру розливали по 1,5 мл в пластикові ампули об'ємом 1,8 мл (NUNC, США) та заморожували в рідкому азоті при температурі -196°C. Препарат кріоцелл-кріоекстракт плаценти отримували з післяпологової плаценти 39–41 тижнів гестації відповідно методичних рекомендацій [95, 96] і стандартних операційних процедур технологічного регламенту МІБП кріоцелл-кріоекстракт плаценти (сертифікат № 604/06-300200000 від 04.07.2006).

З метою отримання фрагментів плаценти другу частину плацентарного матеріалу (n=41) переносили в чашку Петрі, тричі промивали 0,9% розчином NaCl у співвідношенні 1:1, звільняли від поверхневих згустків крові та інших фізіологічних домішок. Після чого гострим шляхом відокремлювали фрагменти розміром 1,0×0,5×0,5 см. Отримані фрагменти плаценти розташовували в флаконах з живильним середовищем (розчин Хенкса) і зберігали при температурі 4 °C до кріоконсервування не більше години.

Суспензію плацентарних клітин отримували за методом Клімана [38]. Третю частину плацентарного матеріалу (n=41) промивали розчином Хенкса у співвідношенні 1:1, подрібнювали, промивали двічі розчином Хенкса з використанням магнітної мішалки. Інкубували 30 хв на водяній бані з застосуванням магнітної мішалки (200 об/хв.), з 150 мл ферментного середовища, яке містить 150 мл розчину Хенкса, 25мМ HEPES (ПанЕко, Росія), 0,125% трипсину (ПанЕко, Росія), 0,2 мг/мл ДНКаз (Sigma, тип I 1500 Kunits/mg), pH 7,4. Після відстоювання протягом 1-ї хвилини отримували 6 супернатантів по 13,5 мл. Для дезактивації ферментів додавали 10% сироватки крупної рогатої худоби (РРА, Австрія). Суспензію центрифугували 5 хв при 1000 об/хв, ресуспендували в 6,0 мл середовища культивування, що містить середовище DMEM (РРА, Австрія), 25мМ HEPES (ПанЕко, Росія), 25 мМ глюкози (Дарниця, Україна). До залишку тканини додавали ферментне середовище та повторювали ферментацію 5 циклів. Після чого суспензію клітин кріоконсервували і застосовували в дослідках.

2.3. Методи кріоконсервування біоб'єктів плацентарного походження

При створенні методик кріоконсервування біологічних об'єктів увагу приділяли кріозахисним середовищам і режимам охолодження, заморожування та відтаювання. Оскільки тільки при комбінації цих факторів можливо досягти максимального збереження матеріалу.

Програмне заморожування проводили на заморожувачах ЗП–10 (СКТБ ІПКіК НАН України) та Cryoson (Німеччина). Кріоконсервування отриманих БПП проводили в пластикових кріопробірках об'ємом 1,8 мл (NUNC, США) під захистом кріоконсервантів (табл. 2.2) на основі середовища 199. Протоколи кріоконсервування отриманих БПП розробляли і здійснювали з використанням програмного заморожувача Cryoson (Німеччина) та ЗП–10 (Україна). Конструкція заморожувача і його теплообмінної камери дозволяли реалізувати режим сидінгу. Вимірювання температури здійснювали за допомогою термодатчика заморожувача. Реєстрацію та обробку результатів проводили, використовуючи програмне забезпечення Fgraph V 1.0 (Реєстратор процесу заморожування).

При розробці режимів заморожування ми враховували дані наукових досліджень щодо кріоконсервування клітинних суспензій і фрагментів залоз [29, 46, 371], які повинні забезпечувати наступні етапи:

- повільне охолодження біологічного матеріалу від початкової температури до температури кристалізації;
- стабілізацію температури в камері заморожувача під час кристалізації;
- швидке охолодження біологічного матеріалу до низьких температур та перенесення біозразків в рідкий азот.

Деякі дослідники [73, 187, 411] вказують на використання режиму сидінга для зменшення температурного стрибка при кріоконсервуванні клітинних суспензій і фрагментів тканин. Ми вважали за доцільне дослідити вплив ініціації кристалізації на системи, що заморожуються, з метою визначення передбаченого зменшення ступеня переохолодження, що позитивно позначається на збереженості клітин.

Для розробки і створення кріопрограм проводили попереднє температурне сканування, заморожуючи розчини кріоконсервантів із швидкістю 1 град/хв. В якості кріопротекторів використовували розчини ДМСО, 1,2-ПД, ДМФА, ПЕО-400 як ізольовано в розчинах, так і в комбінації з ГЕК, ПВП, декстраном,

сахарозою. Перелік кріопротекторів та склад кріоконсервантів, що досліджувалися наведено в таблиці 2.2.

Таблиця 2.2

Кріопротектори та кріоконсерванти, що досліджувалися

№	Кріопротектори та кріоконсерванти
1	5% ДМСО
2	10% 1,2-ПД
3	5% ДМФА
4	5% ДМСО, 5% 1,2-ПД
5	5% ДМСО, 5% ДМФА
6	5% 1,2-ПД, 5% ДМФА
7	5% 1,2-ПД, 5% ДМСО, 5% ДМФА
8	10% ПЕО-400
9	5% ДМСО, 5% ГЕК, 1% альбумін
10	5% ДМСО, 1% альбумін, 5% сахароза
11	5% ДМСО, 5% ПВП, 1% альбумін
12	5% ДМСО, 5% декстран, 1% альбумін
13	5% ДМСО, 5% ГЕК, 5% сахароза, 1% альбумін
14	5% ДМСО, 1% альбумін
15	5% ГЕК, 5 % сахароза, 1% альбумін

Після аналізу термограм кріосередовищ та їх обробки складали багатоетапні програми заморожування для отриманих плацентарних біооб'єктів, які базувалися на означених методичних підходах.

Спосіб зберігання КБПП у НТБ, що забезпечує максимальне збереження біоматеріалів, був визначений нами на підставі раніше проведених досліджень [24, 27]. Усі вищезазначені КБПП розташовувалися в низькотемпературному сховищі – посудині Дьюара – Х5 у рідкому азоті при температурі -196°C при постійному контролі температури і рівня азоту за допомогою комп'ютеризованої системи контролю кріосховищ. Для досліджень відбирали зразки з терміном зберігання від 10 днів до року.

Розморожували біооб'єкти безпосередньо перед дослідженням за класичною методикою – шляхом їх відігрівання на водяній бані при температурі $37\ldots-40^{\circ}\text{C}$ до утворення рідкої фази [29].

2.4. Методи оцінки морфофункціонального стану кріоконсервованих біоб'єктів плацентарного походження

Для дослідження якості кріоконсервування та низькотемпературного збереження важливо оцінити життєздатність, морфологічну збереженість, функціональну активність. Тестування КБПП проводили методами, які дозволяють оцінити їхні властивості після деконсервування. При цьому програми тестування біоматеріалу залежали від рівня їхні організації – ступеня дезінтеграції плацентарних структур. Так, для оцінки стану і складу безклітинних об'єктів застосовували, в першу чергу, біохімічні методики, для клітинних суспензій – культуральні та цитометричні, для фрагментів тканини плаценти, крім вищезгаданих додавали гістологічні та електронно-мікроскопічні методики.

У КЕП, СПКЛ і в МІБП кріоцелл-кріоекстракт плаценти визначали концентрації білків та їх фракцій турбодиметричним методом з застосуванням комерційного набору «ПрАТ Реагент» (Україна) та спектрофотометра «Solar PV1251C» (Білорусь), також досліджували вміст есенціальних БАР: АФП, ХГЛ, естрадіолу, прогестерону, ПЛ, тестостерону та тиреотропного гормону – методом ІФА, згідно інструкцій комерційних наборів. При цьому використовували пероксидазу хрому в якості індикаторного ферменту реактиви «Вектор-Бест» (Росія) і «Аббот» (Німеччина) та аналізатора «Rayto RT-2100C» (Китай).

ІФА проводили в кілька етапів: 1) внесення 100 мкл розчину сироватки кон'югата в лунки, призначені для побудови калібрувального графіка і для стандартного визначення досліджуваної речовини в зразках, 2) внесення 85 мкл розчину сироватки кон'югату в лунки, призначені для дослідження зразків з низькою концентрацією антигену, 3) внесення по 15 мкл на лунку калібрувальних проб, контрольного і зразків, досліджуваних за стандартним

варіантом (використовували лунки, що містять по 100 мкл розчину сироватки кон'югату), внесення по 30 мкл на лунку зразків з низькою концентрацією антигену (використовували лунки, містять 85 мкл розчину сироватки кон'югату), 4) інкубація 35 хв за температури $37\pm 1^{\circ}\text{C}$, 5) промивання, 6) внесення 100 мкл на лунку розчину кон'югату, 7) інкубація 35 хв за температури $37\pm 1^{\circ}\text{C}$, промивання, 8) внесення за 100 мкл розчину тетраметілбензідіна; 9) інкубація 10–15 хв при $22\pm 4^{\circ}\text{C}$; 10) внесення по 100 мкл на лунку стоп-реагенту, 11) реєстрація результатів реакції фотометричним методом при довжині хвилі 450 нм (референсна довжина хвилі 420–450 нм) [89].

Суспензію клітин плаценти (СКП) оцінювали безпосередньо після отримання і на етапах кріоконсервування – деконсервування за допомогою забарвлення за Романовським, трипановим синім і підрахунком у камері Горяєва; методом проточної цитометрії визначали кількість і відсоток живих клітин CD34^{+} та CD45^{+} з використанням антитіл до CD34 , CD45 та вітального барвника 7-AAD («BD» Biosciences, США) на проточному цитофлюорометрі FACS Calibur («BD» Biosciences, США) з використанням стандартного ISHAGE протоколу за допомогою програмного забезпечення CellQuestPro та WinMDI v 2.8.

Культитивування клітин плаценти здійснювали протягом 4-х діб у CO_2 інкубаторі («Thermo», USA) при 5% CO_2 та 37°C . Застосовували вищезазначене середовище культивування (DMEM («PPA», Австрія), NEPES («ПанЕко», Росія), глюкози («Дарниця», Україна), з додаванням 20% сироватки великої рогатої худоби («PPA», Австрія), 50 мкг/мл гентаміцину («Дарниця», Україна). Зміну середовища проводили кожну добу.

Функціональну збереженість клітин досліджували за їхніми культуральними характеристиками – визначали наявність адгезії клітин, формування моношару, синцитієподібних утворень, секреторну активність – за динамікою секреції клітинами плаценти ХГЛ та АФП методами твердофазного ІФА згідно інструкцій комерційних наборів.

Структуру фрагментів плаценти досліджували на етапах кріоконсервування експресс-методами – забарвленням трипановим синім [18] із визначенням забарвленої (девіталізованої) частини зразка і за методом Александрова [16] для визначення функціонального стану клітин за характерним гранулоутворенням в цитоплазмі; методом мікроскопії гістологічних зрізів при забарвленні гематоксиліном і еозином [62] за допомогою мікроскопа XSP-139TP (Китай, Японія) та програмного забезпечення TourView v.3.7., а також методом растрової електронної мікроскопії. Для електронної мікроскопії часточки тканини плаценти поетапно фіксували у 2,5% забуференому розчині глютаральдегіду, дофіксували та забарвлювали у 1%-му забуференому розчині чотирьохокису осмію, остаточну фіксацію здійснювали у суміші епоксидних смол (епон-аральдіт) за загальноприйнятими методиками. З отриманих блоків на ультрамікротомі УМТП-ЗМ (Росія) виготовляли ультратонкі зрізи, монтували їх на електролітичні сіточки та після контрастування цитратом свинцю й ультраніацетатом досліджували під електронним мікроскопом ЕМВ-100 БР (СРСР) при прискорюючому напруженні 75 кВ.

Короткочасне культивування фрагментів плаценти проводили аналогічно описаному вище з визначенням секреції АФП і ХГЛ методом ІФА.

Для інтегральної оцінки апоптозних змін проводили електрофорез ДНК в агарозному гелі [77]. Для цього ДНК виділяли з гомогенату зразка тканини плаценти з застосуванням набору реагентів ДНКсорб В (Росія) згідно з інструкцією. Електрофорез проводили в агарозному гелі з етидіум бромідом на трис-ацетатному буфері при напрузі 5 В/см. Електрофореграми аналізували з застосуванням денситометра Solar DM 2120 (Білорусія).

2.5. Методологія досліджень властивостей кріоконсервованих біооб'єктів плацентарного походження в системі *in vitro*

У програмі тестування КБПП проводилася дослідження їх біовпливу і біобезпеки для організму на клітинному і субклітинному рівнях. Досліджували вплив КБПП на клітинні культури. Об'єктами дослідження були КЕП, КФП і суспензія клітин плаценти (СКП). З цією метою в якості тест-об'єктів використовували паспортизовані клітинні культури з клітин нирки сирійського хом'ячка *BHK-21, clone 13/04* (Колекція клітинних культур ННЦ «Інституту клінічної і експериментальної ветеринарії», м. Харків). Клітини цієї культури в посівній концентрації 80-100 тис. клітин на 1 см² вносили в культуральне середовище і культивували за температури 37°C з концентрацією CO₂ 5%. Потім додавали досліджувані біооб'єкти в розрахунковій концентрації 0,2 і 0,4% до живильного середовища. Контролем служили інтактні клітини даної культури. В якості достовірніших та інформативніших показників стану клітин у системі *in vitro* визначали проліферативну активність (приріст клітин протягом певного часу), мітотичний режим (мітотичну активність – кількість клітин, що діляться, а також відсоток патологічних мітозів) та цитогенетичні параметри [38].

Для визначення проліферативної активності клітин до і після введення в культуральне середовище в КБПП підраховували приріст клітин на третю добу росту методом підрахунку в камері Горяєва. Для диференціювання живих і мертвих клітин проводили фарбування препаратів клітин трипановим синім [16].

Дослідження мітотичного режиму проводили у фіксованих препаратах клітин кожні 24 год їх зростання протягом 5 діб, використовували імерсійну систему. Мітотичну активність визначали за кількістю клітин, які діляться до 1000 клітин (%). Патологічні мітози підраховували у відсотках відносно клітин, що діляться [152].

Для вивчення цитогенетичних показників клітин у присутності БПП у ростове середовище додавали колхіцин у концентрації $0,5-2 \times 10^{-6}$ г/см³. Клітини піддавали гіпотонічній обробці водним розчином KCl (0,56%) і фіксували в спирт-оцтовому фіксаторі (3:1) 30 хв. Отримані препарати

досліджували під імерсійним мікроскопом XSP-139TP (Китай, Японія) та програмного забезпечення TourView v.3.7., підраховували число хромосом і досліджували їх будову [152].

2.6. Методологія досліджень динаміки біологічного впливу кріоконсервованих біооб'єктів плацентарного походження на організм в експерименті

Для обґрунтування диференційованих показань і протипоказань введення КБПП різного ступеня дезінтеграції досліджували такі фармакодинамічні параметри, як початок, пік і тривалість безпосередньої їхньої дії *in vivo*, що є підґрунтям для вибору конкретного КБПП для призначення в похилому віці.

Дослідження проводили на 6-місячних щурах лінії Вістар, масою 250 г (загальна кількість 70 тварин). Лабораторні тварини були розділені на 7 груп по 10 тварин у кожній. Тваринам групи 1 проводили імплантацію КФП 0,03 г підшкірно в зовнішню поверхню стегна під місцевою інфільтраційною анестезією 0,5мл 0,25% розчину новокаїну, 2 - внутрішньом'язово вводили 0,5 мл ККП загальною кількістю 0,25 млн клітин, 3 – внутрішньом'язово вводили 0,03 мл КЕП (розведеного в 0,5 мл 0,9% NaCl), 4 – внутрішньом'язово вводили 0,5 мл СПКЛ, тварини групи 5 слугували контролем і отримували 0,5 мл розчину 0,9% NaCl, хібнооперовані щури склали контрольну групу 6. Порівняння дії КБПП проводили з даними групи 7 (інтактні тварини). Розрахунок дози, яка вводилася піддослідним тваринам, проводили з урахуванням коефіцієнтів активності метаболізму за методами О.В. Стефанова (2001) [17] та Ю.Р. Риболовлева (1979) [108], за формулою:

$$\text{Кл/Дл} = \text{Кщ/Дщ},$$

де Кл – коефіцієнт людини (0,45),

Дл – доза для людини (г/кг),

Кщ – коефіцієнт щура (1,89),

Дщ – доза для щура (г/кг).

При цьому, згідно інструкції препарату „Платекс плацентарний” його доза для людини становить 1,8 г (Сертифікат про державну реєстрацію № 734 / 08 - 30200000 від 9 липня 2008 р.), „Кріоцелл-кріоекстракт плаценти” – 1,8 мл, а доза „Кріоцелл-гемоклітини” становить 20 млн клітин (Сертифікат про державну реєстрацію № 604 / 06 300200000 від 04.07. 2006), що були визначені аналогами КБПП, що досліджувалися.

Динаміку вмісту есенціальних сполук плаценти (АФП і ХГЛ) в організмі експериментальних тварин досліджували на 1–4, та 7, 14, 21, 28, 60-ту добу після введення КБПП (забір крові проводили з хвостової вени). АФП та ХГЛ було обрано як маркерні речовини, тому що вони природньо не містяться в організмі тварин і можуть спостерігатися тільки при введенні БПП. Означені сполуки визначили методом ІФА.

У ці ж терміни спостереження проводили гістологічне дослідження місця імплантації. Після виведення піддослідної тварини з експерименту шляхом зміщення шийних хребців, гострим шляхом відокремлювали місце імплантації в межах інтактних тканин і досліджували методом мікроскопії гістологічних зрізів при забарвленні гематоксиліном і еозином [62].

2.7. Методологія верифікації біологічної безпеки біооб’єктів плацентарного походження

Перспектива клінічного застосування КБПП, враховуючи їх багатовекторний потенціал, спонукає до проведення тесту на вірогідні аномальну токсичність, ембріотоксичність, та тератогенність з метою забезпечення біобезпеки при їх використанні для корекції інволютивних процесів. Водночас ці дослідження дозволяють визначити мехізми дії КБПП на моделях з високою чутливістю до екзогенних чинників.

Дослідження вірогідної аномальної токсичності КБПП проводили з метою виключення небезпеки підвищення токсичності лікарських засобів, так як у процесі їх отримання існує ймовірність непередбачених змін властивостей. Експериментальним тваринам (кролі, морські свинки та білі лабораторні миші) вводили повну разову дозу КБПП, розраховану для людини: КЕП – 1,8 мл (12 тварин експериментальної групи – 1а), КФП – 1,8 г (12 тварин експериментальної групи – 2а), ККП – 20 млн – (12 тварин експериментальної групи – 3а). Порівняння проводили з групами контролю. Контрольним тваринам цих груп ввели аналогічний об'єм фізіологічного розчину, або проводили розріз і ушивання рани по зовнішній поверхні правого стегна без імплантації біооб'єкта. Так, до групи 4а увійшли 6 тварин, які отримували 1,8 мл фізіологічного розчину; 6 тварин, які отримували 1,0 мл фізіологічного розчину, сформували контрольну групу 5а; хібнооперовані 6 тварин увійшли в групу 6а. Тваринам усіх експериментальних груп перед введенням біооб'єктів (або фізіологічного розчину) і після введення вимірювали ректальну температуру і масу тіла. Спостереження вели протягом 7 діб згідно з методикою О.В. Стефанова [17]. Вважається, що зразок витримує випробування і не має потенційної токсичності, якщо жодна тварина не гине протягом 24 годин, не втрачає вагу і не проявляє ознак інтоксикації у період спостереження.

Для більш глибокого вивчення впливу КБПП на організм, вважали за доцільне додатково провести гістологічне дослідження життєвоважливих внутрішніх органів: головного мозку, серця, печінки, нирок, селезінки лабораторних тварин (кролів) даної серії експерименту. Після закінчення терміну спостереження тварин виводили з експерименту і досліджували тканини означених органів за допомогою мікроскопії гістологічних зрізів, забарвлених гематоксиліном і еозином за класичною методикою [62].

У наступних експериментах визначали вірогідні ембріотоксичність, ембріолетальність та тератогенність КБПП. Дослідження впливу КБПП на внутрішньоутробний розвиток організму здійснено у зв'язку з тим, що механізми

впливу на організм є найбільш демонстративними при їх вивченні в біосистемах, які динамічно розвиваються. Безумовно, це відноситься до внутрішньоутробного плода, як найбільш чутливого біооб'єкта, в першу чергу, у випадку негативного біовпливу. Певною мірою отримані дані можна екстраполювати на інший період онтогенезу – похилий вік. Таке припущення дозволяє зробити також підвищена чутливість організму, що старіє до дії біовпливу, та обумовлена нестабільністю гомеостазу, неефективністю адаптації та іншими сенільно-інволютивними процесами.

Водночас, враховуючи те, що, на нашу думку, однією з основних медико-біологічних галузей використання КБПП є репродуктивні технології при згасанні генеративної функції і отриманні в таких дослідженнях позитивних результатів тестування КБПП на можливу ембріотоксичність є одним з основних методів профілактики ембріопатій і вроджених аномалій розвитку при визначенні показань чи протипоказань щодо призначення терапії з використанням КБПП.

Вік ембріона і плоду в момент дії пошкоджуючого фактора відіграє велику, часто вирішальну роль у формуванні та житті майбутньої дитини. Визначають так звані критичні періоди ембріогенезу [40, 41], коли найбільш небезпечним є вплив будь-якого несприятливого фактора на ембріон. Передімплантаційний період ембріогенезу – найбільш ранній період вагітності, коли відбувається запліднення та імплантація. У кінці цього періоду починається диференціація, підвищується обмін речовин ембріона, одночасно знижується його регенераторна здатність. Цей короткий період відрізняється підвищеною чутливістю до екзогенних факторів. Після завершення імплантації у розвитку ембріона починається період органогенезу і плацентації, який закінчується до 3–4-х місяців внутрішньоутробного життя. Саме в ці періоди найбільш часто проявляється тератогенний ефект препаратів, а при високих дозах – їхня ембріотоксичність і ембріолетальність [113].

Для дії пошкоджуючих факторів у період органогенезу та плацентації характерні аномалії розвитку плода і ембріональна смертність. Тератогенний ефект, який проявляється в анатомічних вадах розвитку, порушеннях гістогенезу з наступною функціональною неповноцінністю органів і систем, вважається найбільш специфічним доказом безпосереднього впливу патогенного фактора на плід. Це пояснюється тим, що загибель ембріона рідко буває пов'язана з аномаліями розвитку і, в основному, залежить від змін у материнському організмі або від масивного ураження всієї фетоплацентарної системи. На противагу цьому, аномалії розвитку ембріона майже завжди залежать від прямого впливу (безпосередньої дії) пошкоджуючого фактора на ембріональні органи і тканини. Тому виявленню аномалій розвитку внутрішньоутробного періоду надається особливе значення при визначенні можливої причини тератогенного ефекту.

У дослідях з визначення можливої ембріотоксичної і тератогенної дії КБПП вагітні самиці щурів були розділені на 4 групи по 12 у кожній. Тварини 1-ї групи отримували КЕП внутрішньом'язово на 1, 6, 8, 10, 12, 14-ту добу. Самиці контрольної групи (1к), отримували еквівалентну кількість фізіологічного розчину. Самицям 2-ї і 3-ї груп на 6-й день вагітності імплантували зразки КФП і відповідно – ККП. Розрахунок доз, що вводились проводили за методикою Ю.Р. Риболовлева [108]. Тваринам контрольної (2к) групи на 6-й день вагітності проводили операційне втручання аналогічно тваринам у дослідних групах, але без імплантації КФП чи ККП.

Виведення самиць з експерименту шляхом зміщення шийних хребців проводили на 20-й день гестаційного періоду. Реєстрували число жовтих тіл в яєчниках, число живих і мертвих ембріонів, визначали перед- і постімплантаційну летальність, загальну ембріональну смертність, вагу плацент і плодів, плодово-плацентарний індекс, краніокаудальний розмір плодів, проводили макроскопічне обстеження ембріонів для виявлення зовнішніх аномалій розвитку. Для визначення можливого тератогенного впливу

1/2 частину плодів з кожної групи фіксували в суміші Буена для дослідження внутрішніх органів, іншу частину в 95% етанолі для вивчення стану скелета. Стан внутрішніх органів оцінювали на серії розрізів за методом Вільсона в модифікації А.П. Дибана [17, 18]. Для оцінки скелетної системи готували тотальні препарати, які фарбували червоним аліزاریном [262]. Морфологічне (анатомічне) дослідження ембріонального матеріалу проводили під стереоскопічним мікроскопом МЕС-13 (Росія).

2.8. Методологія досліджень впливу кріоконсервованих фрагментів плаценти на організм тварин пізнього онтогенезу

На основі отриманих результатів попередніх досліджень біооб'єктом вибору серед КБПП для використання в період пізнього онтогенезу визначено КФП. Відповідно до цього в наступному розділі дисертаційної роботи з метою патогенетичного обґрунтування застосування в геронтології визначали їх вплив і механізми саногенезу в організмі тварин пізнього онтогенезу під дією імплантації КФП.

У даній серії експерименту використовували самців і самиць щурів лінії Вістар віком 18-ти і 5-ти місяців, яких розділили на такі групи: 1 – 18-місячні самиці з імплантацією КФП, 2 – 18-місячні самиці хибнооперовані, 3 – 18-місячні самці з імплантацією КФП, 4 – 18-місячні самці хибнооперовані, 5 – 5-місячні самці, 6 – 5-місячні самиці. У групах спостереження (1 і 3) було використано по 20 тварин, у групах порівняння (2, 4–6) – по 15 тварин. Імплантацію здійснювали під новокаїновою анестезією. Робили розріз на зовнішній ділянці правого стегна довжиною 1 см, формували кишеню, куди занурювали препарат, розріз ушивали кетгутом. Дози препаратів розраховували за методикою Ю.Р. Риболовлева [108].

При визначенні впливу КБПП на організм тварин пізнього онтогенезу звертали увагу на ті особливості організму, які перш за все змінюються в

процесі старіння, віддзеркалюють його динаміку та суттєво впливають на якість життя в похилому віці. Тому, для дослідження обрали серцево-судинну систему, печінку, статеву систему. Оцінювали стан про- та антиоксидантних систем у цих органах і сироватці крові, морфологічну будову, білоксинтетичну функцію за гістохімічними методами, судинні реакції за рахунок експресії рецепторів до ендотеліну 1, апоптотичні зміни визначали, розраховуючи апоптозний індекс після проведення імуногістохімічного дослідження за допомогою моноклональних антитіл (МКА) до CD95, зміни у сполучній тканині по кількості колагену IV типу.

У самців досліджували в динаміці вміст тестостерону (методом ІФА) згідно інструкції до комерційного набору. Після спарювання самців усіх груп з самицями репродуктивного віку і самиць всіх груп з молодими самцями спостерігали за їх поведінкою, активністю, визначали фертильність за репродуктивними показниками – підраховували кількість самиць, що завагітніли, кількість тварин з резорбцією плодів, з мертвими плодами, середні кількість і вагу плодів та плацент у піддослідних самиць, що завагітніли.

Методи морфологічного дослідження. Тварин виводили з експерименту на 30-ту добу спостереження. Шматочки міокарда, печінки, сім'яники (самців), яєчники і матки (самиць) фіксували в 10% нейтральному формаліні, заливали в целоїдин-парафін, після спиртової проводки виготовляли зрізи товщиною 5–6 мкм. Зрізи фарбували гістологічними методами: гематоксиліном і еозином, рибонуклеопротейди (РНП) визначали реакцією Браше, а дезоксирибонуклеопротейди (ДНП) – реакцією Фельгена-Россенбека [62].

Імуногістохімічне дослідження проводили на парафінових зрізах, товщиною 5–6 мкм непрямым і прямим методом Кунса за методикою Brosnan. Колаген IV типу визначали за допомогою МКА до колагену IV типу, ендотелін-1 – МКА до ендотеліну-1, апоптозно змінені клітини – МКА CD95 (Novocastra Laboratories Ltd.) В якості люмінесцентної мітки використовували Fab-2 –

фрагменти кролячих антитіл проти імуноглобулінів миші (Novocastra Laboratories Ltd.).

Комп'ютерно-морфометричні дослідження проводили за допомогою люмінесцентного мікроскопа «Axioskop 40» («Carl Zeiss», Німеччина).

Оптичну щільність імунофлюоресценції визначали за формулою Г.І. Губіної-Вакулик і співавторів [87]:

$$H = \log (D_{\text{оп}} / D_{\text{ф}}),$$

де H - кількісний вміст антигену в ум. од.,

$D_{\text{оп}}$ - яскравість флюоресценції структури,

$D_{\text{ф}}$ - яскравість флюоресценції фону.

Визначали кількість клітин, що експресують рецептори до CD95, і перераховуючи на 100 клітин, визначали апоптозний індекс.

Біохімічні методи дослідження. Вимірювання вмісту гідроперекисів ліпідів у мікросомах печінки проводили за методом Ohkawa [237], а у плазмі крові – за методом Asakawa [144]. Вміст гідроперекисей ліпідів в мітохондріях печінки визначали в екстрагованих за Фолчем загальних ліпідах, як описано в [237]. Спектр поглинання забарвленого продукту реєстрували на двупроменевому спектрофотометрі Specord UV VIS та вимірювали різницю екстинкцій при $\lambda=535$ і 520 нм. Вміст гідроперекисів ліпідів розраховували в еквівалентній кількості малонового діальдегіда (МДА), приймаючи коефіцієнт молярної екстинкції рівним $1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, на 1 мг білку мікросом, 1 мл плазми крові або 1 мг загальних ліпідів мітохондрій.

Вимірювання швидкості накопичення МДА при ПОЛ проводили у гомогенатах тканин, мітохондріях і мікросомах. Для вимірювання швидкості накопичення МДА при спонтанному ПОЛ до 1,8 мл інкубаційного середовища, що містить 100 мМ трис-HCl буфер, pH=7,4, додавали 0,2 мл гомогенату досліджуваної тканини. У разі аскорбат-індукованого ПОЛ середовище додатково містило 0,5 мМ аскорбат, а аскорбат-ADP-Fe²⁺-індукованого ПОЛ – 0,5 мМ аскорбат, 4 мМ ADP, 12 мкМ сіль Мора. При дослідженні інтенсивності

ПОЛ в ізольованих мітохондріях і мікросомах, крім описаних вище, використовували середовище, що містить 100 мМ трис-НСІ буфер, рН=7,4, 1 мМ NADPH, 4 мМ ADP, 12 мкМ сіль Мора. МДА визначали як описано в роботі [46, 95]. При цьому записували спектр поглинання ТБК-активних продуктів на двопробеновому спектрофотометрі Specord UV VIS, вимірювали різницю екстинкції при довжині хвиль 535 і 580 нм і розраховували кількість МДА, приймаючи коефіцієнт екстинкції рівним $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$.

Каталазну активність визначали в постмітохондріальній фракції гомогенату печінки та еритроцитах спектрофотометрично при $\lambda=240$ нм [55] у 10 мМ K^+ -фосфатному буфері, рН=7,4 з 0,1 мМ ЕДТА, 15 мМ H_2O_2 , (температура 37°C).

Глутатіон-S-трансферазну активність вимірювали в мітохондріях, мікросомах і постмітохондріальній фракції гомогенату печінки спектрофотометрично при $\lambda=340$ нм [55, 63] у середовищі, яке містило 0,1 М K^+ -фосфатний буфер, рН=6,5, 1мМ 1-хлор-2,4-динітробензол, 5 мМ GSH, 0,2% тритон X-100 (температура 37°C). Активність розраховували з використанням коефіцієнту молярної екстинкції $9,6 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$.

Глутатіонредуктазну активність у постмітохондріальній фракції печінки вимірювали спектрофотометрично по зменшенню рівня NADPH [55, 63] у середовищі, яке містило 50 мМ K^+ -фосфатний буфер, рН=7,4, 1мМ ЕДТА, 0,16 мМ NADPH, 1 мМ GSSG та 0,2% тритон X-100 за температури 37°C. Активність визначали в нмоль NADPH/хв·мг білку з використанням коефіцієнту молярної екстинкції $6,22 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Вміст церулоплазміну (ЦП) визначали у плазмі крові, як описано в роботі [104] в середовищі, що містило 0,1 М ацетатного буфера, рН=5,5 і 0,1% парафенілендіаміна. Плазму крові додавали в кількості 0,02 мл на 2 мл реакційного середовища. Тривалість інкубації склала 1 годину, за температури 37°C. Реакцію зупиняли додаванням 0,01% азиду натрію. Пофарбовані зразки

спектрофотометрували при $\lambda=530$ нм, вміст ЦП визначали в нмоль/мл плазми крові, використовуючи коефіцієнт перерахунку 5,83.

Вміст Шиффових основань (ШО) у гомогенатах тканин і мітохондріях печінки вимірювали флуориметрично після їх екстракції (хлороформом і метанолом в співвідношенні 1:2) з суспензії органел [237]. Результати визначали у відносних одиницях, приймаючи інтенсивність флуоресценції 1 мкг хінінсульфата в 1 мл 0,1 N H₂SO₄ за 1950 одиниць [254].

Глутатіонпероксидазну (ГП) активність визначали в гомогенатах, цитозолі, мітохондріях тканин, еритроцитах, плазмі та сироватці крові спектрофотометрично при $\lambda=340$ нм за методом Paglia D. E [312] з невеликими змінами [104] в 50 мМ K⁺, Na⁺-фосфатному буфері (рН=7,4), який містив 1 мМ ЕДТА, 0,15 мМ NADPH, 1 од. глутатіонредуктази дріжджів, 0,2 % тритон X-100 і 3 мМ азиду Na для інгібування КАТ. Гідроперекис кумолу додавали в концентрації 1,2 мМ, перекис водню – 0,4 мМ, за температури 37°C. Активність виражали в нмоль NADPH/хв на мг білка або мл сироватки з урахуванням коефіцієнта молярної екстинкції $6,22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$.

Вміст білка в зразках, що досліджувались, визначали за методом Лоурі у модифікації Міллера [104].

У роботі використовували такі реактиви: NADPH, GSH, GSSG, трис(оксиметил)амінометан, адреналін, людський сироваточний альбумін, манніт – виробництва фірми «Reanal» (Угорщина); тритон X-100 – виробництва фірми «Fegak» (Німеччина); гідроперекис кумола, KН₂PO₄, азид натрію «Merk» (Німеччина); глутатіонредуктаза, CaCl₂, Na₂HPO₄, NaHCO₃ «Sigma» (США); нітротетразолій синій «Chemapol» (Чехія), ксантинооксидаза «Serva», α -токоферол «ICN» (США) та реактиви вітчизняного виробництва кваліфікації ЧДА, ХЧ та ОСЧ.

2.9. Методи визначення науково-організаційних принципів створення і функціонування низькотемпературних банків біооб'єктів плацентарного походження

Для наукового обґрунтування і визначення організаційних принципів створення та функціонування низькотемпературних банків КБПП проводили історичний аналіз виникнення кріобанків біооб'єктів, напрямки їх діяльності, контент-аналіз звітів роботи, установчу документацію низькотемпературного банку біологічних об'єктів Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, документацію та публікації провідних низькотемпературних банків світу та міжнародних асоціацій тканинних банків. Проводили оцінку ролі НТБ у вирішенні науково-дослідницьких проблем сучасності, біотехнологічних програмах, збереженні генетичного різноманіття біосфери, у тому числі біоматеріалів людини для діагностики стану і відновлення здоров'я пацієнтів. Визначали значення і перспективність НТБ плацентарних біооб'єктів в загальних медико-біологічних дослідженнях і охороні здоров'я людини.

2.10. Методи статистичної обробки отриманих даних

Для отримання статистично значущих висновків застосовували критерії Стьюдента, Манна-Уїтні, метод Фішера. Альтернативну гіпотезу у всіх вищеназваних критеріях приймали при $p \leq 0,05$ [19, 65, 112, 115]. Для статистичних розрахунків та обробки даних використовували комп'ютерну програму Statgraphics 2.1.

2.11. Біоетичні протоколи

Дослідження проводилися на щурах лінії Вістар, білих нелінійних щурах

та кролях породи Шиншила, морських свинках та білих лабораторних мишах, які вирощувалися у розпліднику віварію Інституту проблем кріобіології та кріомедицини НАН України. Перед початком експерименту тварини проходили акліматизацію в умовах кімнати для проведення випробувань протягом 7 днів. Протягом експерименту тварини знаходились при природньому освітленні, отримували стандартне для цього виду тварин харчування при питному режимі *ad libitum*. Утримання тварин відповідало діючим правилам щодо пристроїв, обладнання та утримання віваріїв.

Експерименти на тваринах виконували відповідно до «Спільних принципів експериментів на тваринах», схвалених 3-м Національним конгресом з біоетики (Київ, Україна, 2007) та узгодженими з положеннями Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей (Страсбург, Франція, 1985). Всі експерименти були узгоджені з комітетом по біоетиці Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України.

РОЗДІЛ 3

МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН КРІОКОНСЕРВОВАНИХ БІООБ'ЄКТІВ ПЛАЦЕНТАРНОГО ПОХОДЖЕННЯ РІЗНОГО СТУПЕНЯ ДЕЗІНТЕГРАЦІЇ

3.1. Клініко-лабораторні критерії вихідного стану плаценти для її використання в кріобіологічних дослідженнях

Вихідний стан біологічного матеріалу, в тому числі плаценти, значною мірою детермінує ефективність кріогенних біотехнологій [7]. Консервування біоструктур плаценти є доцільним при їх вихідній морфофункціональній збереженості. Дистрофічні зміни в тканині плаценти ставлять під сумнів ефективність її подальшого застосування. Так, на нашу думку, інфекція, імбібування меконієм зашкодить клінічному застосуванню отриманих КБПП, викликаючи інфекційні чи алергічні ускладнення. Кальцифікати, інфаркти, гіпоплазія, фіброзні зміни значно обтяжують біотехнологічні процеси, зменшують кількість і знижують якість КБПП та при застосуванні можуть викликати явища асептичного запалення.

Допологова діагностика плацентарної дисфункції, дистрофії, інших патологічних змін у структурі або зниження функції плаценти дозволить вилучити такий біоматеріал з роботи. Водночас верифікація морфофункціональної активності плаценти забезпечує отримання повноцінного плацентарного матеріалу. Придатними для подальшого науково-практичного використання ми вважали плаценти без інфікування та морфологічних змін, які завадили б технологічному процесу отримання КБПП чи їх застосуванню.

Проведені багатофакторні обстеження вагітних з наступним аналоговим аналізом морфофункціональних характеристик післяпологових плацент дозволили отримати наступні результати.

Отримані антенатально і постнатально дані щодо вихідного стану плацент вказували на високий відсоток (67,1%) виявлених клініко-лабораторних ознак плацентарної дисфункції, серед яких були ознаки загрози переривання вагітності та передчасних пологів, еклампсії, материнсько-плодової інфекції, екстрагенітальної патології та інші, що супроводжувалися зниженням вмісту ХГЛ і ПЛ у сироватці крові вагітних. При дослідженні плацент, отриманих після пологів у цих пацієнток, виявлено значне коливання таких параметрів, як вага, розміри та форма, наявність інфікування та нестерильність (у 37% випадків), кальцифікатів (7%), гіпоплазії (5%), білих інфарктів (3%), імбібування меконієм (7%), набряку (в 5%), дистрофічних (26%) та фіброзних змін (13%) випадків (рис. 3.1, б, в). Спостерігалось зниження гранулоутворення при забарвленні ворсин нейтральним червоним. Ці негативні ознаки виявлені переважно в плацентах жінок віком 29–35 років, які народжували в термін гестації 39–41 тиждень *per vias naturalis*.

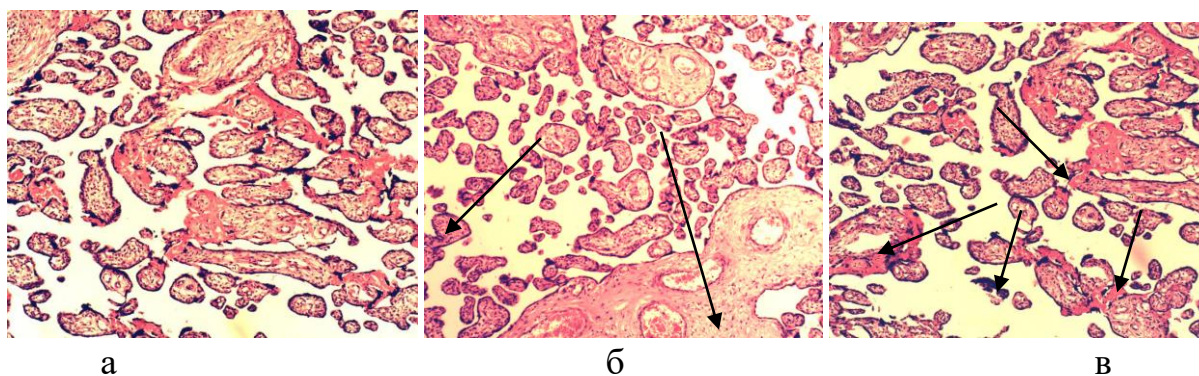


Рис. 3.1 Гістоструктура тканини плаценти: а – 37 тижнів гестації; б і в – 40–41 тиждень гестації. Стрілки вказують на ознаки дистрофічних процесів (пояснення в тексті). Забарвлення гематоксиліном та еозином, $\times 200$.

У тканині цих плацент при гістологічному дослідженні зустрічалися ознаки дистрофічних процесів у вигляді крововиливів, тромбів, пертифікатів,

білих інфарктів. Часто зустрічалися безсудинні ворсини зі стоншенням цитотрофобласта, мукоїдним набуханням строми, іноді зникненням клітинних шарів, деякі з них повністю були замуrowані в фібриноїд (рис. 3.1, б, в).

Проте, 32,9% плацент макроскопічно мали правильну дискоїдальну форму (діаметр $20,7 \pm 4,2$ см, товщину $2,5 \pm 0,6$ см, вагу $520 \pm 60,5$ г). Вони практично не мали дистрофічних та інволютивних змін, мікроскопічно в ворсинах спостерігались одно- та дворядові шари клітин (синцитій і трофобласт), розташовані на тонкому подовженому шарі пухкої сполучної тканини (рис. 3.1, а), в цитоплазмі клітин виявлялось інтенсивне гранулоутворення у реальному часі при забарвленні ворсин нейтральним червоним. Плодово-плацентарний індекс складав $1/5-1/7$ при задовільному стані новонародженого (відповідно до шкали Апгар – 8–10 балів). При аналізі перебігу вагітності та пологів виявлено, що ці жінки не мали клінічних проявів інфекцій та плацентарної дисфункції (за даними УЗД), рівень ПЛ у сироватці крові дорівнював 10470 ± 870 МОд/мл; ХГЛ – 23720 ± 1230 МОд/мл. Вони народжували у віці 18–25 років у терміні вагітності 37–38 тижнів шляхом операції кесаревого розтину. Показаннями для оперативного втручання було поєднання таких акушерських ситуацій, як крупний плід, вузький таз, слабкість пологової діяльності, тазове передлежання плода, пологи після проведення допоміжних репродуктивних технологій.

Вищезазначений комплекс маркерних даних дозволив верифікувати морфофункціональну активність плаценти, та забезпечити отримання повноцінних КБПП різного ступеня дезінтеграції: кріоекстракту, клітин та фрагментів на етапах відповідних біотехнологічних процесів. Виявлена відповідність даних пренатального обстеження вагітних морфофункціональним характеристикам післяпологових плацент дозволила планувати відбір біоматеріалу в антенатальному періоді.

Таким чином, скринінгові аналогові дослідження дозволили нам визначити параметри вихідного стану плаценти, які можуть бути критеріями для

її використання при подальших кріобіологічних дослідженнях в якості об'єкта низькотемпературного банку.

У подальших дослідженнях ці положення застосовували для отримання матеріалу.

3.2. Динаміка складу і вмісту есенціальних сполук в кріоекстракті плаценти під дією різних кріопрограм

Результати дослідження складу і вмісту есенціальних сполук у КЕП, які були отримані з використанням 1–4 циклів заморожування-відтаювання, демонструють, що при проведенні першого такого циклу КЕП містив залишки клітинно-тканинного детриту, значну кількість еритроцитів та інших клітин, що не забарвлювалися трипановим синім. Після другого циклу заморожування-відтаювання кількість еритроцитів та інших клітин значно зменшувалася, але вони остаточно зникали лише після третього циклу.

Рівні есенціальних сполук у КЕП коливалися в досить широких межах, що характерно для плацентарного матеріалу і залежить від індивідуальних особливостей. Вміст БАР плаценти збільшувався від першого до третього циклів заморожування-відтаювання і зменшувався після проведення четвертого. Водночас програма з 4-разовим циклом призводила до зниження концентрацій сполук білкової природи і порушення балансу співвідношення БАР у КЕП (табл.3.1). Практично всі досліджувані плацентарні сполуки у КЕП, отриманому з використанням трьох циклів заморожування-відтаювання (рис. 3.2) були в більш високих концентраціях, ніж у контролі (у МІБП кріоцел-кріоекстракт плаценти) (табл. 3.1), що пояснюється ефектом оптимізованої кріотехнології. Звертали на себе увагу вірогідно більш високий вміст прогестерону і знижена концентрація естрадіолу. Такі співвідношення даних гормонів є фізіологічними для антенатального періоду, оскільки прогестерон відіграє провідну роль у пролонгації вагітності, та його концентрація висока при прогресуючому

гестаційному процесі (36–38 тижнів). У пологах вміст прогестерону знижується, а естрогенів – зростає (саме естрогени визначають чутливість міометрія до окситоцину, в результаті чого і реалізується пологовий акт). Ці показники поряд з концентраціями інших кріоекстрагованих БАР також підтверджують досягнуте фізіологічне співвідношення есенціальних сполук плаценти (аналогічне такому в СПКЛ, тобто в крові новонародженого у перші хвилини життя).

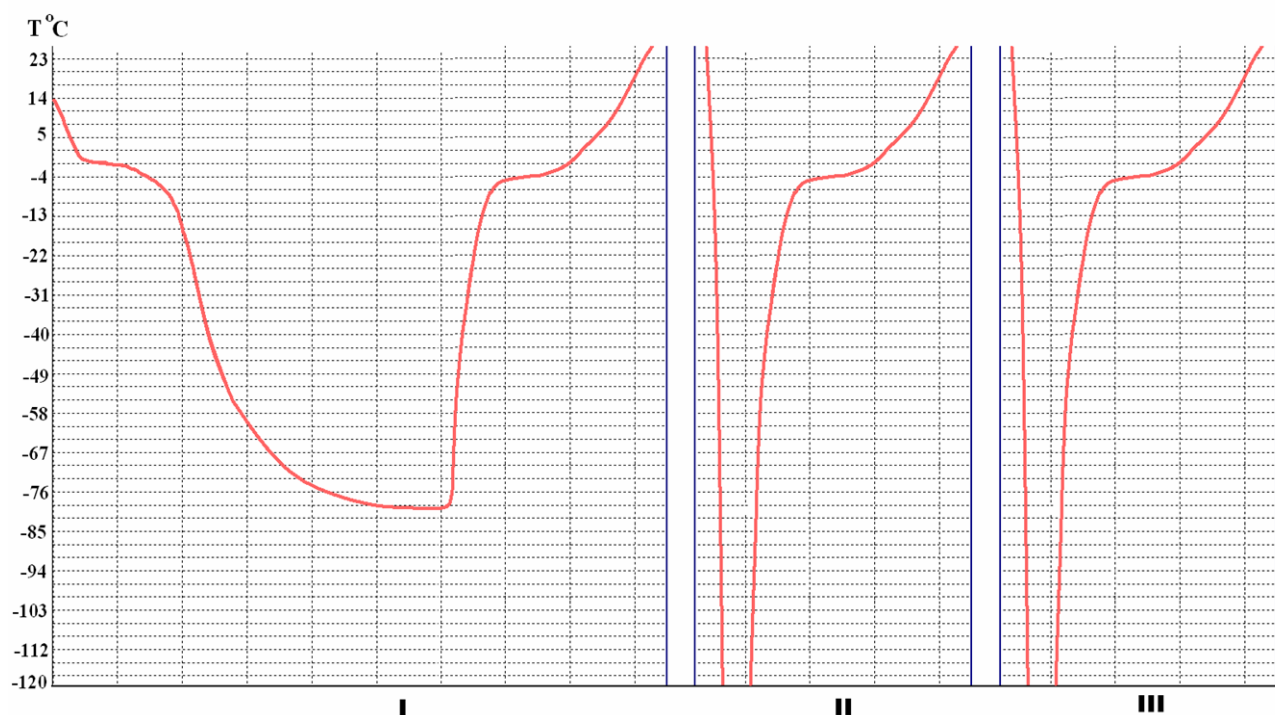


Рис. 3.2. Термограма трьох циклів кріоекстракції БАР плаценти.

Таким чином, проведення трьох циклів кріоекстракції за розробленим нами режимом дозволяє звільнити КЕП від клітинно-тканинного детриту, при цьому БАР екстрагуються в максимально високих концентраціях і досягається збереженість їхніх фізіологічних співвідношень. Такий КЕП ми використовували в наступних етапах досліджень.

Таблиця 3.1.

Вміст біологічно активних речовин у кріоекстрактах плаценти, отриманих з використанням різного числа циклів заморожування-відтаювання (1–4)

Біологічно активні речовини	КЕП (n=11) 1 цикл	КЕП (n=9) 2 цикли	КЕП (n=12) 3 цикли	КЕП (n=12) 4 цикли	Кріоцелл– кріоекстракт плаценти (n =18)	СПКЛ (n =19)
АФП, МО/мл	5714±112*	6451±203*	9617±105*	7367±153*	8023±474	1915±123*
ХГЛ, МО/мл	1976,8±98,4*	2534,2±98,6*	8231,8±92,3*	4156,2±45,7	3326,8±308,8	1850±63*
Естрадіол, пг/мл	1345±94,7*	1535±32,1	21959±161*	1479±165	16955±170	5970±122*
Прогестерон, нмоль/л	132,2±5,8*	643,1±11,3*	1046±20*	514,2±9,7*	226±1,41	118±9,9*
Пролактин, нг/мл	846±24*	1047±24	1856±49*	943±32	1105±129	231±14*
Тестостерон, нМоль/л	82,71±6,3*	103,2±12,5*	274,6*±10,1	173,5±12,3*	204,6±11,6	6,54±2,23*
Тиреотропний гормон, МО/л	46,2±12,1*	84,1±9,5	121,2±9,0*	78,4±9,6*	91,2±3,9	15,2±1,7*
Загальний білок, мг/мл	13,4±4,2*	15,2±1,9*	29,4±3,1	19,3±1,2*	25,5±2,7	61±1,8*
Білки >20 кДа, %	65,3±2,3	67,1±2,3	64,1±3,3	73,3±4,6	67,2±3,4	63,1±2,3
Білки < 20 кДа, %	34,7±4,5	32,9±2,1	35,9±2,9	26,7±2,9	32,8±3,4	36,9±3,5

Примітка * – вірогідність різниці з МІБП кріоцелл–кріоекстрактом плаценти при $p < 0,05$.

3.3. Результати розробки програм кріоконсервування клітин і тканин плаценти

Кріоконсервування отриманої СКП проводили, враховуючи її гетерогенність, тому використовували найбільш оптимальний алгоритм кріозахисту для досягнення збереженості різних типів клітин. Результатом розробки способу кріоконсервування клітин плаценти визначена наступна двохетапна програма: після 20-хвилинної експозиції в 10% розчині ДМСО в співвідношенні 1:1 (кінцева концентрація ДМСО–5%) клітини на першому етапі кріоконсервували повільно зі швидкістю 1град/хв до -70°C (рис. 3.3.), на другому – швидко, шляхом прямого занурення у рідкий азот.

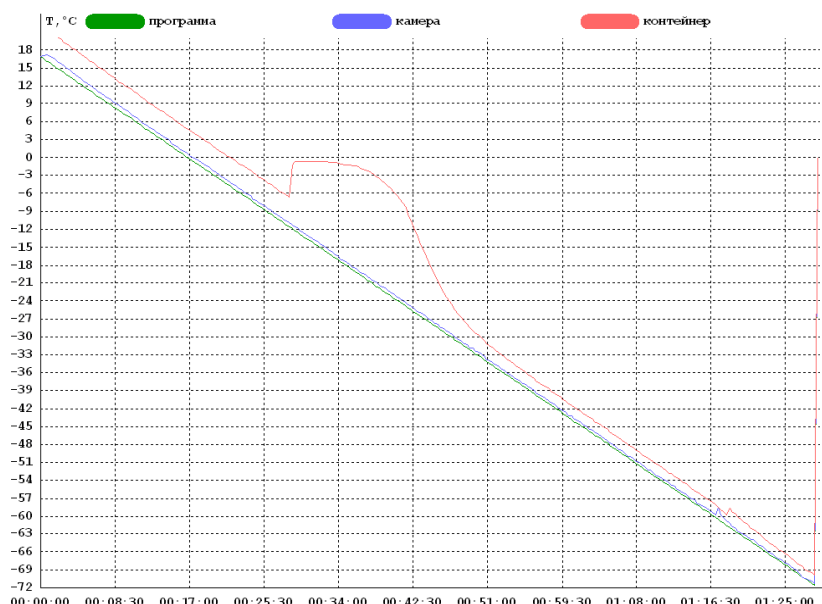


Рис. 3.3. Термограма першого етапу кріоконсервування суспензії клітин плаценти до -70°C (зелений колір – задана програма заморожування; синій – зміна температури в камері заморожування; червоний – зміна температури середовища).

Кріоконсервування фрагментів плаценти проводили з застосуванням кріоконсервантів і спеціальних програм заморожування, які в комплексі здатні мінімізувати переохолодження, модифікувати кристалоутворення і в результаті забезпечити максимальну збереженість плацентарного матеріалу.

Для зменшення кріоушкоджень у тканині плаценти використовували

багатоетапні програми кріоконсервування, що розроблялися після вивчення термограм, отриманих для розчинів кріоконсервантів.

Аналіз фазових діаграм розчинів кріопротекторів, зокрема діаграм їх плавлення, є суттєвим для визначення механізмів кріошкодження і кріозахисту біоб'єктів при дії низьких температур. З постійною швидкістю охолодження $1\text{град}\backslash\text{хвил}$ від 25°C до -20°C були проскановані різні розчини: ДМСО, 1,2-пропандіол (1,2-ПД), диметилформамід (ДМФА), поліетиленоксид з молекулярною масою 400 (ПЕО-400) як ізольовано в розчинах, так і в комбінації з гідроксиетилкрохмалем (ГЕК), полівінілпіролідом (ПВП), декстраном, сахарозою в стандартних концентраціях (табл. 2.2).

У результаті проведених експериментів було зареєстровано термограми, що відзеркалювали теплові ефекти, котрі мали місце при заморожуванні досліджуваних кріоконсервантів.

Слід зазначити, що отримані термограми мали схожий характер. Температура початку кристалізації досліджених розчинів коливалась в межах -2°C до -4°C ($\Delta T^{\circ}=2^{\circ}\text{C}$). На рис. 3.4 наведено типовий приклад зміни температури у кріопротекторному середовищі під час заморожування.

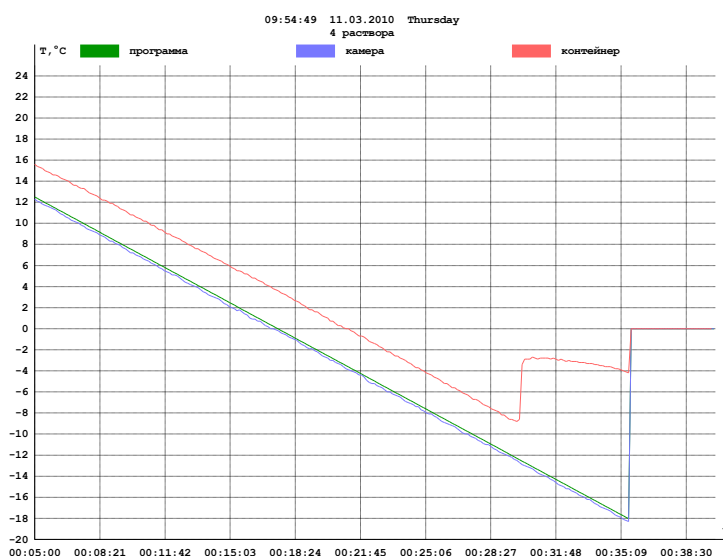


Рис. 3.4. Термограма заморожування кріосередовища: 5% ДМСО + 5% ГЕК + 1% альбумін (зелений колір – задана програма заморожування; синій – зміна температури в камері заморожування; червоний – зміна температури середовища).

Визначено температурні зміни у зоні переохолодження середовища та початок кристалізації системи ($T = -3,2^{\circ}\text{C}$), що є найбільш важливим для створення кріопрограми з використанням режиму сидінгу.

Після аналізу термограм заморожування кріосередовищ та їх обробки складено багатоетапну кріопрограму, що дозволила значно зменшити зону переохолодження за рахунок ініціювання початку кристалізації у системі біоб'єкт – кріопротектор, а саме використання режиму сидінгу. Режим сидінгу в наших дослідженнях реалізувався як короткочасне інтенсивне надходження холоду у вигляді випарів рідкого азоту в об'ємі камери заморожування заморозувача ЗП–10. На рис. 3.5 наведено термограму з використанням ініціації кристалоутворення для розчину, який містить 5% ДМСО + 5% ГЕК + 1% альбумін.



Рис. 3.5. Термограма заморожування кріосередовища: 5% ДМСО + 5% ГЕК + 1% альбумін з використанням режиму сидінгу (зелений колір – задана програма заморожування; синій – зміна температури в камері заморожування; червоний – зміна температури середовища).

Програма, що використовувалася для заморожування означеного кріосередовища, була реалізована таким чином (зелений колір):

I етап – охолодження від 24 до -6°C зі швидкістю $V=1$ град/хв;

II етап – сидінг 1,5 хв при $T = -90^{\circ}\text{C}$;

III етап – стабілізація температури в камері заморожування протягом 7 хв при $T = -20^{\circ}\text{C}$;

IV етап – швидкість охолодження $V=10$ град/хв до $T = -100^{\circ}\text{C}$;

V етап – занурення в рідкий азот $T = -196^{\circ}\text{C}$.

Динаміка зміни температури заморожування кріосередовища мала 3-етапний характер (червоний колір):

I етап – охолодження від 24 до -3°C зі швидкістю $V=1$ град/хв;

II етап – охолодження від -3°C до -20°C зміна швидкості має експоненціальний характер;

III етап – охолодження від -20°C до -100°C зі швидкістю $V=10$ град/хв.

За рахунок використання режиму сидінгу було нівельовано переохолодження кріосередовища.

Наведені вище результати дослідження теплофізичних особливостей розчинів кріопротекторів і кріоконсервантів використано для розробки режимів заморожування фрагментів плаценти. Відповідно до реалізації фізико-хімічних кріозахисних механізмів програма заморожування складалась з наступних етапів (рис. 3.6, б; зелений колір):

I етап – охолодження від 24 до -6°C зі швидкістю $V=1$ град/хв;

II етап – сидінг 1,5 хв при $T = -90^{\circ}\text{C}$;

III етап – стабілізація температури в камері заморожування протягом 7 хв при $T = -20^{\circ}\text{C}$;

IV етап – швидкість охолодження $V=10$ град/хв до $T = -100^{\circ}\text{C}$;

V етап – занурення в рідкий азот $T = -196^{\circ}\text{C}$.

Зміни температури заморожування фрагментів плаценти мали 3-етапний характер (червоний колір):

I етап – охолодження від $+24^{\circ}\text{C}$ до -3°C зі швидкістю $V=1$ град/хв;

II етап – охолодження від -3°C до -20°C зміна швидкості має складний характер;

III етап – охолодження від -20°C до -100°C зі швидкістю $V=10$ град/хв.

При порівняльному дослідженні термограм кріоконсервування фрагментів плаценти (Рис. 3.6) виявлено, що за рахунок використання режиму сидінгу відбувається ініціація початку кристалізації у системі біооб'єкт – кріоконсервант, зменшується температура переохолодження, що є кріозахисним процесом.

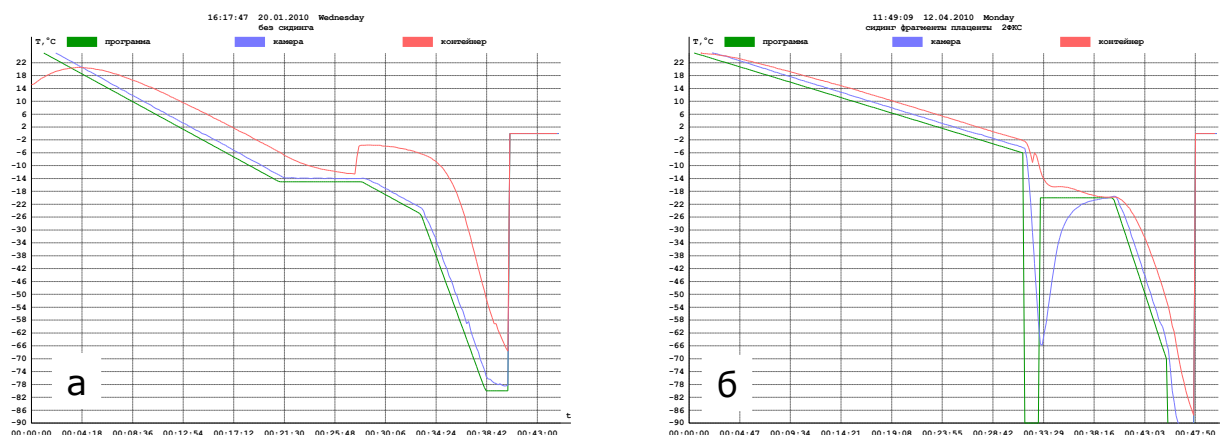


Рис. 3.6. Термограми кріоконсервування фрагментів плаценти: а – без сидінгу, б – з сидінгом. (зелений колір – програмно задана температура заморожування; синій – зміна температури в камері заморожування; червоний – зміна температури в біооб'єкті – фрагменті плаценти).

Ефективне кріоконсервування фрагментів плаценти є найбільш складною проблемою, оскільки метою є збереженість не тільки клітин, а також міжклітинних взаємодій і ембріональної мезенхіми при максимально тривалому функціонуванні імплантованого КФП в організмі без негативних реакцій і ускладнень. Відповідно до цього розробку методів кріоконсервування фрагментів плаценти проводили на основі базових режимів через визначення механізмів морфофункціональних змін, що відбувалися при всіх означених етапах, при порівнянні кріозахисної дії кріоконсервантів і кріопротекторів, які досліджувалися, з метою визначення кріопрограми, що забезпечує мінімізацію кріоушкоджень і максимальну збереженість вітальності КФП.

3.4. Вплив кріоконсервування на властивості суспензії клітин плаценти

У сучасній медико-біологічній науці отримання кріоконсервованих клітин плаценти визначено актуальною проблемою. Це обумовлено тим, що плацента визнана одним з найбільш придатних джерел стовбурових, прогеніторних, мезенхімальних, гормонпродукуючих, гемопоетичних, імунокомпетентних та інших клітин для дослідження, створення лікарських форм та стратегічних запасів аlogenого чи аутологічного генетичного матеріалу з метою застосування в клініці. Клітини плаценти завдяки їх значному потенціалу до різноспрямованого диференціювання і програмування є перспективним об'єктом для клітинної та тканинної біоінженерії [71,104].

Застосування в даному дослідженні комплексного ферментативного методу дозволило отримати СКП. Мікроскопічно в ній визначалися ядерні клітини в концентрації 10^6 /мл, іноді зустрічалися клітинні агрегати, еритроцити, детрит, при фарбуванні трипановим синім забарвлювалося не більше ніж 5% клітин. При культивуванні клітин їх адгезію спостерігали через 3 години з наступним формуванням синцитіоподібних структур (на 3–4 добу) та моношару (на 7 добу). За даними цитофлюориметричного аналізу в СКП визначено 2,6% $CD34^+$ та 0,4% $CD45^+$ клітин, 1,85% життєздатних $CD34^+$ та до 95% інших життєздатних клітин. У середовищі для культивування виявлено секрецію клітинами плаценти ХГЛ та АФП.

Кріоконсервована (деконсервована) за розробленою і наведеною вище програмою СКП мала вигляд однорідної напівпрозорої рідини рожевого кольору з вмістом ядерних клітин у концентрації 10^6 /мл. При фарбуванні трипановим синім забарвлювалося не більше 9% клітин. АФП, ХГЛ визначалися в слідових концентраціях.

Підрахунок живих клітин в суспензії ККП методами забарвлення і цитофлюорометрії показав, що їх збереженість дорівнює 91%. Їхня вітальність підтверджувалася характерними культуральними реакціями: адгезія (рис. 3.7. а), формування та утворення синцитіоподібних структур (рис. 3.7. б), моношару, секреція ХГЛ і АФП.

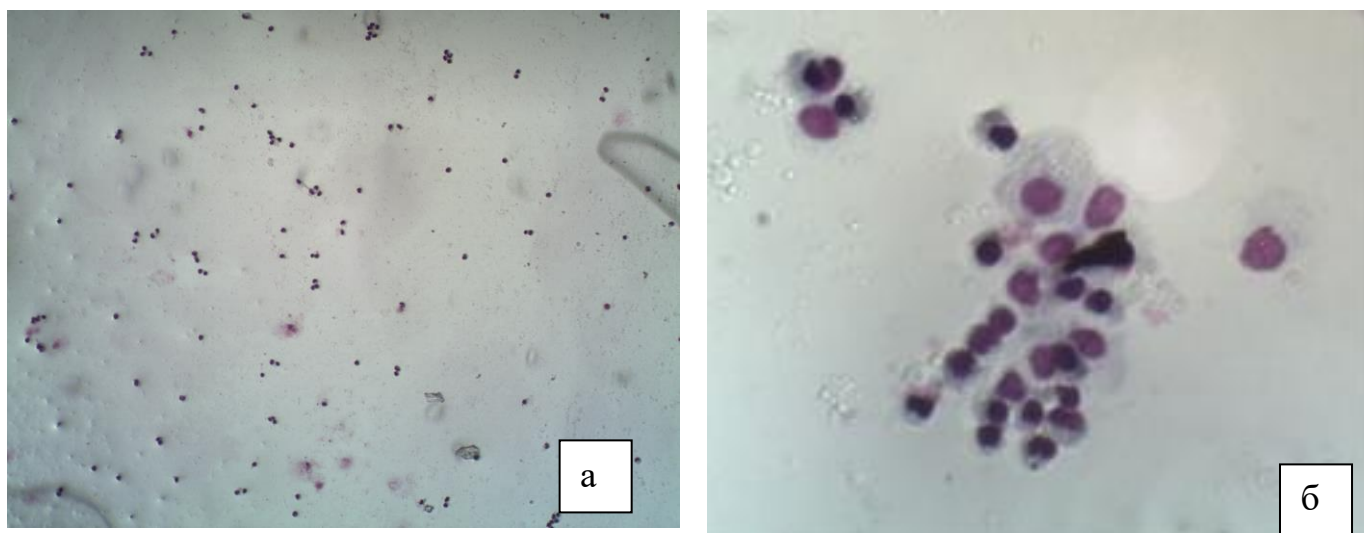


Рис. 3.7. ККП у процесі культивування: а – 1 доба (адгезія, $\times 100$); б) – 4 доба (формування синцитіоподібних структур, $\times 400$). Забарвлення за Романовським.

У даному дослідженні ККП демонстрували фенотип, практично еквівалентний фенотипу, що був визначений в суспензії нативних клітин. Виявлення в суспензії ККП 2,45% клітин (рис. 3.8), які несуть високогліколізований трансмембранний білок CD34, характеризує цю фракцію клітин як генерацію ранніх лімфогемopoетичних стовбурових клітин, клітин-попередників ендотелію судин, нейроклітин і фібробластів. Даний антиген бере участь у міжклітинній адгезії та регулюванні диференціювання клітин. У суспензії також було виявлено 0,33% клітин, які експресують CD45 (рис. 3.8), що є рецептором протеїнтирозинфосфатази – довгої одноланцюгової трансмембранної молекули і вважається загальним для всього лейкоцитарного

ряду. Висока щільність його експресії виявляється на лімфоцитах, активованих Т-клітинах і Т-клітинах пам'яті.

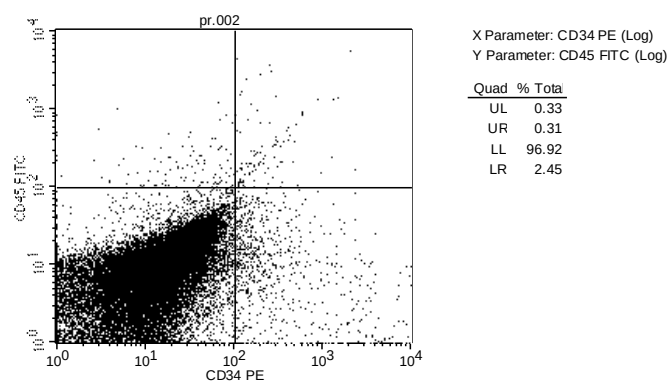


Рис. 3.8. Вміст CD_{34}^{+} (2,45%) и CD_{45}^{+} (0,33%) клітин у зразку деконсервованих плацентарних клітин за даними цитофлюориметричного дослідження.

Одночасно в ККП виявлено значну кількість плацентарних клітин, які не відносяться до лейкоцитів. Їхня вітальність становила понад 90%, серед них було 1,65% життєздатних CD_{34}^{+} , що підтверджувалося характерними культуральними реакціями (рис. 3.9).

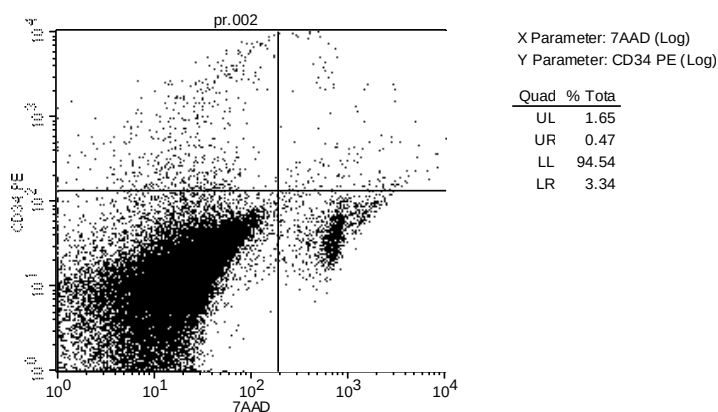


Рис. 3.9. Відсоток вітальності CD_{34}^{+} клітин в зразку деконсервованих плацентарних клітин. Цитофлюориметричне дослідження з використанням вітального барвника 7-AAD

3.5. Вплив низькотемпературного консервування на морфофункціональний стан фрагментів плаценти

«Золотим» стандартом кріобіологічних досліджень є визначення процесів, що відбуваються в біооб'єкті при взаємодії з кріозахисними середовищами під впливом низьких температур залежно від змін швидкостей охолодження в порівнянні з нативними зразками і зразками, які заморожували без кріозахисних заходів [6]. Аналіз даних, отриманих у результаті таких досліджень, може дозволити створити науковообґрунтовані ефективні програми кріоконсервування біооб'єктів. Відповідно до вищевказаної класичної кріобіологічної методології нами проведено дослідження впливу низькотемпературного консервування на морфофункціональний стан фрагментів плаценти 36 – 38 тижнів гестації.

При дослідженні фрагментів плаценти після інкубування з різними кріопротекторами (табл.2.2) було виявлено, що ПЕО-400, ДМФА, 1,2-ПД і їх комбінації є досить токсичними (рис. 3.10). Найбільш часто виявлялися гетерохромія ядер, зміна форм клітин, пошкодження мембран, порушення структури міжклітинної речовини, зміна форм та розміру ворсин (спостерігали різкий набряк). Результати гістологічних досліджень доводять, що 5%-й розчин ДМСО чинить найменшу токсичну дію: структура тканини плаценти мало відрізнялася від інтактної.

При охолодженні без кріопротектора патологічні зміни виявлялися у всіх ворсинах (рис. 3.11, а). Найчастіше спостерігали розриви мезенхіми, які вважали результатом кристалізації надлишка води, відшарування, стоншення трофобласта, багато ворсин були зруйновані (табл. 3.2). Форма клітин та ядер була неправильною.

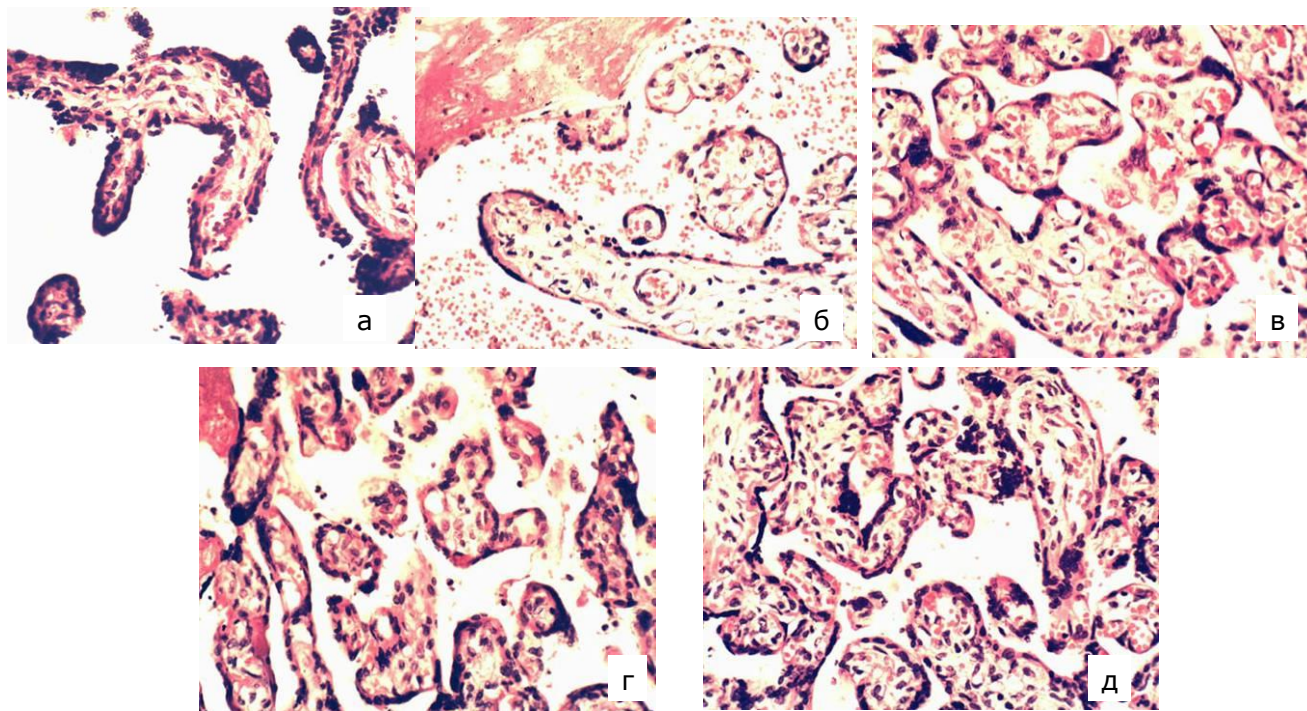


Рис. 3.10. Стан фрагментів плаценти після інкубування з різними кріопротекторами: а – інтактні фрагменти; б – 5% ДМФА; в – 5% 1,2-ПД; г – 10% ПЕО-400; д – 5% ДМСО (пояснення в тексті). Забарвлення гематоксиліном та еозином, $\times 200$

Після кріоконсервування з 5% ДМФА ворсини були дещо дегідратовані, кількість зруйнованих ворсин зменшувалася, однак стоншення трофобласта та його відшарування спостерігали практично в усіх ворсинах (рис. 3.11, б). Окремі клітини також зазнавали суттєвих змін. Застосування 5%-го 1,2-ПД зменшувало кількість зруйнованих ворсин та відшарування трофобласта, але розриви строми спостерігалися в кожній ворсині (рис. 3.11, в). Застосування 10%-го ПЕО-400 також не дало очікуваного результату, основними змінами залишалися пікноз ядер, руйнування ворсин (рис. 3.11, г).

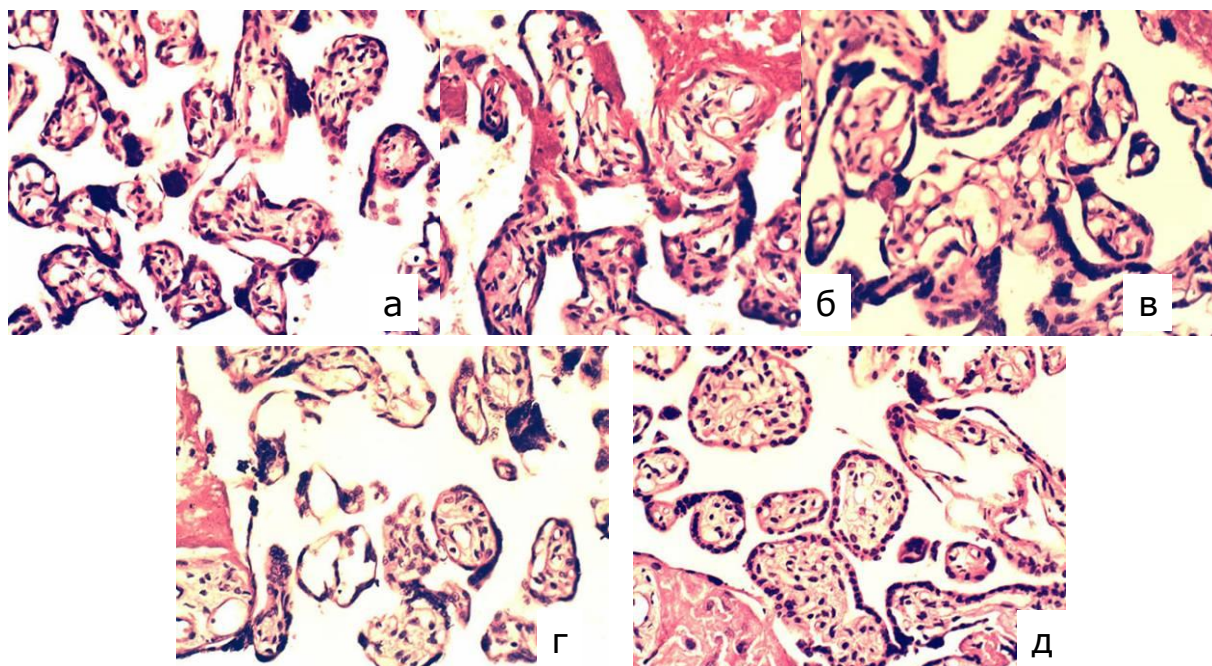


Рис. 3.11 Стан фрагментів плаценти після кріоконсервування з розчинами різних кріопротекторів: а – контроль (без кріопротектора); б – 5% ДМФА; в – 5% 1,2-ПД; г – 10% ПЭО-400; д – 5% ДМСО. Забарвлення гематоксиліном та еозином, $\times 200$

При кріоконсервуванні з 5%-м розчином ДМСО структура тканини була більш збереженою, ніж при застосуванні інших кріопротекторів (рис. 3.11, д), форма та розмір клітин залишалися близькими до нативних, проте ДМСО повністю не запобігав руйнуванню структури тканини. Спостерігалися кріоушкодження у вигляді розривів в міжклітинній речовині та десквамації трофобласта, що пояснюється підвищеною гідрофільністю ембріональної мезенхіми. Проте, кріоушкоджень було менше, ніж при кріоконсервуванні з іншими кріопротекторами (табл. 3.2).

Деструктуризація частіше спостерігалася у великих ворсинах, у меншій мірі кріоушкодження виявлялися в невеликих ворсинах. Певно, виявлений ефект кріостійкості малих ворсин плаценти можна пояснити їх специфічною структурною організацією і біохімічним складом. Тобто, при мінімальному об'ємі, розташуванні клітин у пухкій сполучній тканині, вкритих синцитієм при

наявності різних класів гідрофільних і гідрофобних біомакромолекул плацентарного походження, реалізуються генетичні механізми толерантності до дії не тільки природних ушкоджуючих факторів, а й до штучних, у даних експериментах – до екстремального охолодження (при мінімальному ступені кріозахиста – інкубацією з 5%-м ДМСО).

Таблиця 3.2

Гістологічні зміни структури фрагментів плаценти після кріоконсервування з різними кріопротекторами, % ворсин ($M \pm m$)

Морфологічні ознаки	Нативна тканина	5% ДМФА	5% 1,2-ПД	10% ПЕО-400	5% ДМСО
Ворсини без патологічних змін	94,1 $\pm$ 9,0	11,1 $\pm$ 1,5*	13,2 $\pm$ 2,1*	15,0 $\pm$ 1,2*	37,0 $\pm$ 3,5
Зруйновані ворсини	2,3 $\pm$ 0,21	34,6 $\pm$ 2,8*	31,1 $\pm$ 3,4*	54,5 $\pm$ 3,4*	15,1 $\pm$ 2,1
Набряк ворсин	3,3 $\pm$ 0,29	–	–	32,8 $\pm$ 2,4*	–
Дегідратація ворсин	–	–	32,4 $\pm$ 2,5	–	–
Відшарування трофобласта	–	52,4 $\pm$ 4,1*	53,4 $\pm$ 5,6*	67,5 $\pm$ 5,6*	35,2 $\pm$ 1,2
Розриви мезенхіми	5,1 $\pm$ 0,45	68,4 $\pm$ 5,2*	87,5 $\pm$ 5,0*	75,5 $\pm$ 8,2*	34,0 $\pm$ 2,8
Пікноз ядер	3,9 $\pm$ 0,32	67,4 $\pm$ 2,1*	85,4 $\pm$ 7,4*	65,8 $\pm$ 5,9*	5,1 $\pm$ 3,5
Зміна форми клітин	2,1 $\pm$ 1,8	74,1 $\pm$ 9,1*	73,2 $\pm$ 6,2*	65,2 $\pm$ 5,3*	11,2 $\pm$ 1,2

Примітка: * – вірогідність різниці з ДМСО при $p < 0,05$.

Отримані результати щодо найменшої токсичності і найбільшого ступеня кріозахисту серед досліджуваних кріопротекторів, обумовили подальші

дослідження по оптимізації протоколів кріоконсервування фрагментів плаценти з використанням розчину 5% ДМСО. Було виявлено, що кріоконсервування під захистом 5% ДМСО дозволило зберігати морфологію клітин, проте в структурі тканини і міжклітинних взаємодіях у деяких зразках спостерігали кріоушкодження.

Оскільки найбільш типовими серед них були розриви мезенхіми та відшарування трофобласта, внаслідок накопичення надлишку води в ембріональній мезенхімі ворсин і подальшої її кристалізації при низьких температурах, було вирішено додавати до середовищ кріоконсервування розчини високомолекулярних сполук, які здатні виводити рідину з тканин, не пошкоджуючи її. Такі розчини використовують в медицині в якості протишокових. Це – ГЕК, ПВП, декстран та сахароза. Їх застосовували в стандартних офіційних концентраціях, до них додавали ДМСО в концентрації 5%, який дозволив зберегти морфологічну цілісність клітин у попередніх експериментах. Крім того досліджували властивості ГЕК як кріопротектора без застосування ДМСО.

Після інкубування фрагментів плаценти з різними кріозахисними середовищами було відмічено, що середовища, які містили 5% ГЕК, 5%-у сахарозу та 5% ДМСО мало впливали на структуру тканини (рис. 3.12, б, в, е), викликаючи незначну дегідратацію («зморщування») ворсин. В той же час додавання ПВП чи декстрану викликало більшу дегідратацію, і відшарування трофобласта (рис. 3.12, г).

Після кріоконсервування фрагментів плаценти з вищезазначеними розчинами було продемонстровано, що при додаванні 5% ГЕК та 5 % сахарози до розчину 5% ДМСО структура ворсин була близькою до нативної тканини, цілісність строми не порушена, не мала розривів, але зустрічалися поодинокі відшарування трофобласта. В той же час при додаванні 5% ПВП чи 5% декстрану зберігаються розриви в мезенхімі та відшарування трофобласта. Звертає на себе увагу той факт, що кріоконсервування під захистом 5% ГЕК

може забезпечити цілісність фрагментів плаценти без додавання ДМСО, що є перспективним при клінічному застосуванні, оскільки ГЕК не є токсичною речовиною та може застосовуватися у великих дозах. Виявлені морфологічні ознаки представлено на рис. 3.13, проаналізовано і після морфометричного аналізу наведено в табл. 3.3.

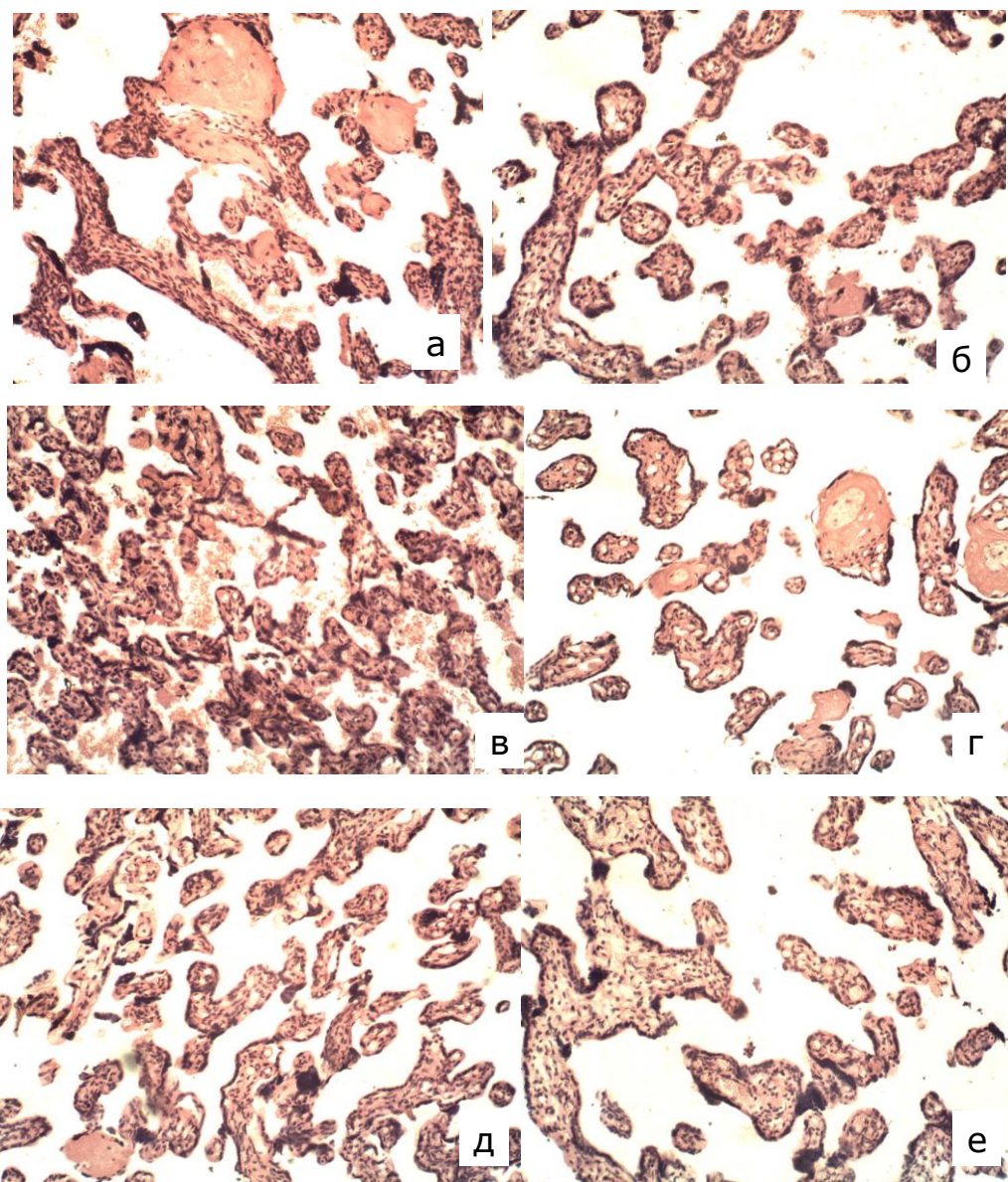


Рис. 3.12. Стан фрагментів плаценти після інкубування з різними кріопротекторами: а – нативна тканина; б – 5% ДМСО+5%ГЕК; в – 5% ДМСО+5% сахароза; г – 5% ДМСО+5% ПВП; д – 5% ДМСО+5% декстран; е – 5% ГЕК. Забарвлення гематоксиліном та еозином, $\times 200$

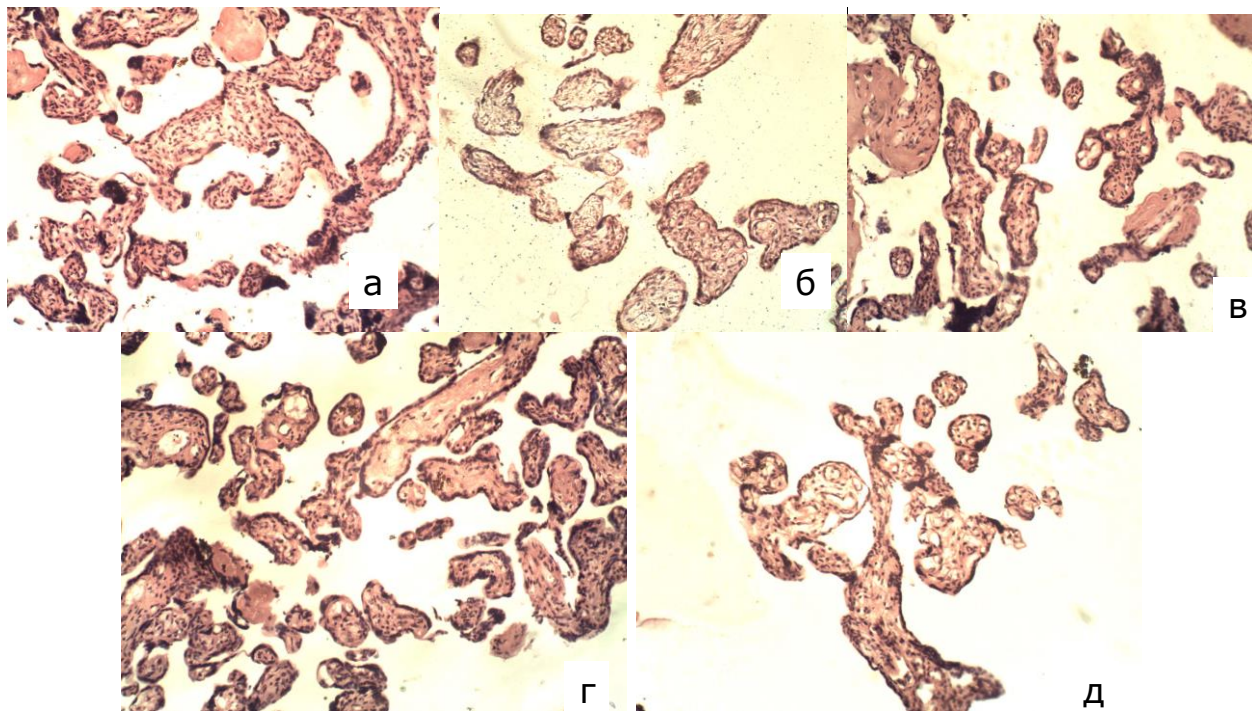


Рис. 3.13 Стан тканини після кріоконсервування з різними кріопротекторами: а – 5% ДМСО+5% ГЕК; б – 5% ДМСО+5% сахароза; в – 5% ДМСО+5% ПВП; г – 5% ДМСО+5% декстран; д – 5 % ГЕК. Забарвлення гематоксиліном та еозином, $\times 200$

Отримані дані гістологічного скринінгу кріоконсервованих фрагментів плаценти характеризують їх достатньо високу структурну збереженість. У подальших дослідження ми оцінювали вітальність КФП за характером їх взаємодії з вітальними барвниками і здатністю секреції плацентарних сполук.

Таблиця 3.3

Гістологічні зміни структури фрагментів плаценти після кріоконсервування з різними кріоконсервантами, % ворсин ($M \pm m$)

Морфологічні ознаки	Нативна тканина	5% ДМСО+ 5% ГЕК	5% ДМСО + 5% сахароза	5% ДМСО + 5% ПВП	5% ДМСО + 5% Декстран	5% ГЕК
Ворсини без патологічних змін	94,5±9,0	85,2±7,6	73,5±0,5	32,2±0,3*	41,4±3,9*	79,4±7,5
Зруйновані ворсини	2,3±1,2	4,2±0,3*	8,1±1,0*	11,0±0,9*	14,0±1,2*	9,2±0,8*
Відшарування трофобласта	—	5,2±0,5	23,2±2,9*	54,2±0,4*	51,1±4,2*	15,0±0,9*
Розриви мезенхіми	—	11,2±1,1*	15,2±1,1*	26,6±0,3*	28,1±2,3*	10,1±0,8*
Пікноз ядер	4,1±1,1	6,1±0,4	8,1±0,5*	12,1±0,8*	15,2±1,2*	11,2±0,9*
Зміна форми клітин	2,2±0,9	6,2±0,5*	9,4±1,2*	21,2±2,7*	14,2±1,2*	8,2±0,7*

Примітка: * – вірогідність різниці з нативною тканиною при $p < 0,05$.

При порівнянні відсотків площі тканини плаценти, що забарвлювалася трипановим синім визначено, що після інкубації в кріозахисних середовищах трипановим синім було забарвлено не більше 2% ворсин, це свідчило про травмування тканини при фрагментації, оскільки практично такий же відсоток девіталізації спостерігали в інтактних фрагментах плаценти. Тобто власне інкубація з досліджуваними кріопротекторами і кріоконсервантами не впливала принципово на вітальність тканини.

Після заморожування без кріопротекторів забарвленою було більш 90% площі ворсин (табл. 3.4), що свідчило про ефективність методу оцінки вітальності тканини в даній серії експериментів. Кріоконсервування з досліджуваними кріозахисними середовищами приводило до зниження ахроматичної площі в КФП (забарвлювалося від 5 до 10 % площі тканини). Водночас такий високий ступінь ахромазії віддзеркалює достатню збереженість окремих клітин. Але цей показник, на нашу думку, не відображає в повній мірі цілісність міжклітинних взаємозв'язків, тому, враховуючи результати попередньої серії експериментів, протоколи кріоконсервування фрагментів плаценти потребують подальшого удосконалення.

Таблиця 3.4

Площа забарвлення ворсин КФП трипановим синім, $\%(M \pm m)$

Розчини	Інкубація	Кріоконсервування
Без кріопротектора	<2	>90
ДМСО+ГЕК	<2	5,1 $\pm$ 0,3
ДМСО+Сахароза	<2	9,6 $\pm$ 0,5
ДМСО+ПВП	<2	5,2 $\pm$ 1,1
ДМСО+ Декстран	<2	10,5 $\pm$ 0,9
ДМСО	<2	9,6 $\pm$ 0,5
ГЕК	<2	10,1 $\pm$ 1,3

Зважаючи на те, що при клініко-експериментальному застосуванні КФП дослідники в першу чергу розраховують на синтез і секрецію фрагментами плацентарних сполук, нами було досліджено ці властивості КФП. При визначенні синтетичної активності фрагментів плаценти за рівнем ХГЛ в добовій культурі продемонстровано, що вміст ХГЛ в середовищі культивування нативних фрагментів плаценти дорівнює близько 20 МОд/мл; після їх замороження без кріоконсервантів – 10 МОд/мл. Останні значення вмісту ХГЛ в живильному середовищі нами визначено як базові, тобто така кількість ХГЛ міститься в експериментальному зразку і після замороження без кріозахисту, тобто після кріодеструкції зразка, виходить у живильне середовище. У ході дослідження не визначено залежності ступеня синтетичної активності КФП від виду кроіпротекторів. Так, після інкубування фрагментів плаценти протягом 15 хв у досліджуваних кріозахисних середовищах та відмивання від них, синтетична активність коливалась у середньому від 17 до 22 МОд/мл без достовірної різниці між зразками, але після кріоконсервування підвищувалась майже вдвічі (табл. 3.5).

Таблиця 3.5

Вміст ХГЛ у добовій культурі фрагментів плаценти, МОд/мл ($M \pm m$)

Розчин	Інкубація	Кріоконсервування
Без кроіпротектора	20,5±1,2	10,3±52,1
ДМСО+ГЕК	21,2±2,3	52,2±6,2
ДМСО+Сахароза	18,8±3,1	39,1±2,2
ДМСО+ПВП	20,9±1,2	44,3±3,7
ДМСО+ Декстран	17,2±2,1	43,2±2,3
ДМСО	19,4±1,7	40,6±1,6
ГЕК	20,3±3,6	37,5±2,1

Такий парадоксальний, на перший погляд, результат пояснюється загальнобіологічною реакцією живої структури (в нашому дослідженні – тканини плаценти) на дію потужного фактора (у даному випадку – низьких температур), що змінює загальнометаболічні процеси до рівня парабіозу і в подальшому – до анабіозу. Реакція проявляється в максимальній активізації функцій та ініціації практично всього структурного потенціалу. У даному дослідженні ми спостерігали підвищення синтетичної активності деконсервованих фрагментів плаценти в порівнянні з нативними.

Таким чином, найкращі результати кріоконсервування фрагментів плаценти було отримано при використанні кріоконсерванта, до складу якого входили 5% ДМСО та 5% ГЕК. Природа даного ефекту в тому, що, як виявлено, ДМСО найбільш ефективно реалізує кріозахист клітин у складі тканини плаценти, а ГЕК, внаслідок своєї специфічної колоїдної структури, є тканинним дегідратантом, що зв'язує рідину в міжклітинних розчинах, не ушкоджуючи клітини. Тому для подальшого дослідження з метою підвищення ефективності кріоконсервування фрагментів плаценти було обрано кріоконсервант, який містив 5 % ДМСО та 5 % ГЕК.

Враховуючи те, що під дією низьких температур у біоструктурах можуть відбуватися зміни, в тому числі сублетальні кріоушкодження на ультратонкому рівні, що проявляються після їх відігріву і подальшого функціонування, ми провели електронно-мікроскопічне дослідження деконсервованих ворсин плаценти після 4-х годин культивування.

У якості зразків порівняння проведено електронну мікроскопію нативних термінальних ворсин плаценти, а також таких, що були заморожені прямим зануренням в азот без кріозахисту для визначення граничних станів (вітальність – кріодеструкція). У контрольних нативних зразках (Рис. 3.14) спостерігали синцитіальний моношар з ядрами, що заповнені хроматином як дифузно розподіленим, так й у вигляді глибок, переважно біля нуклеарної мембрани. Синцитій вкритий маргінальною каймою мікроворсинок. Шар цитотрофобласта

представлений клітинами з великими витягнутими або полігональними ядрами із структурованим хроматином. У цілому ядро і клітинні органели клітин цитотрофобласта чітко структуровані, мають середню електронну щільність. У зразках зустрічаються мікросудини з еритроцитами, клітини Кащенко-Гофбауера, фібробластоподібні клітини, що свідчило про суттєву складову цих елементів у структурі термінальних ворсин.

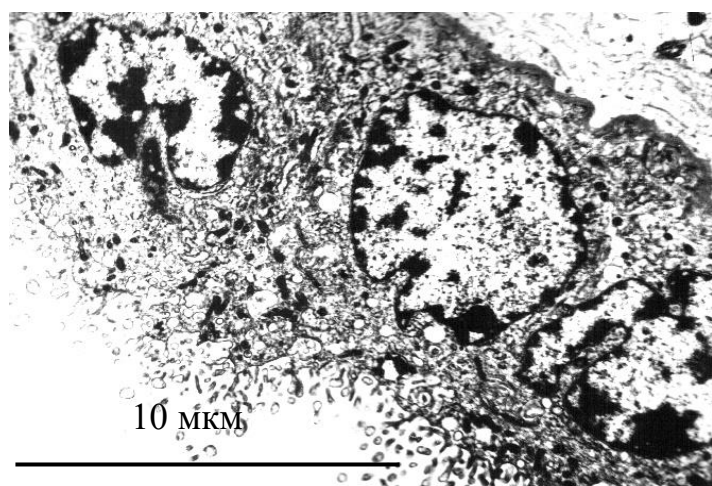


Рис. 3.14. Структура нативної тканини плаценти (термінальна ворсина), електронна мікроскопія

Грубі зміни було виявлено при заморожуванні плаценти без кріопротектора (рис. 3.15). Після відігріву спостерігали відриви клітин одна від одної, через 4 години культивування спостерігали конденсування хроматину по периферії ядер, що інтерпретується як апоптотичні зміни, фрагментацію клітинних мембран, термінальну перинуклеарну вакуолізацію цитоплазми та зменшення кількості мікроворсинок, деструкцію органел, що в цілому завершується незворотніми летальними змінами.

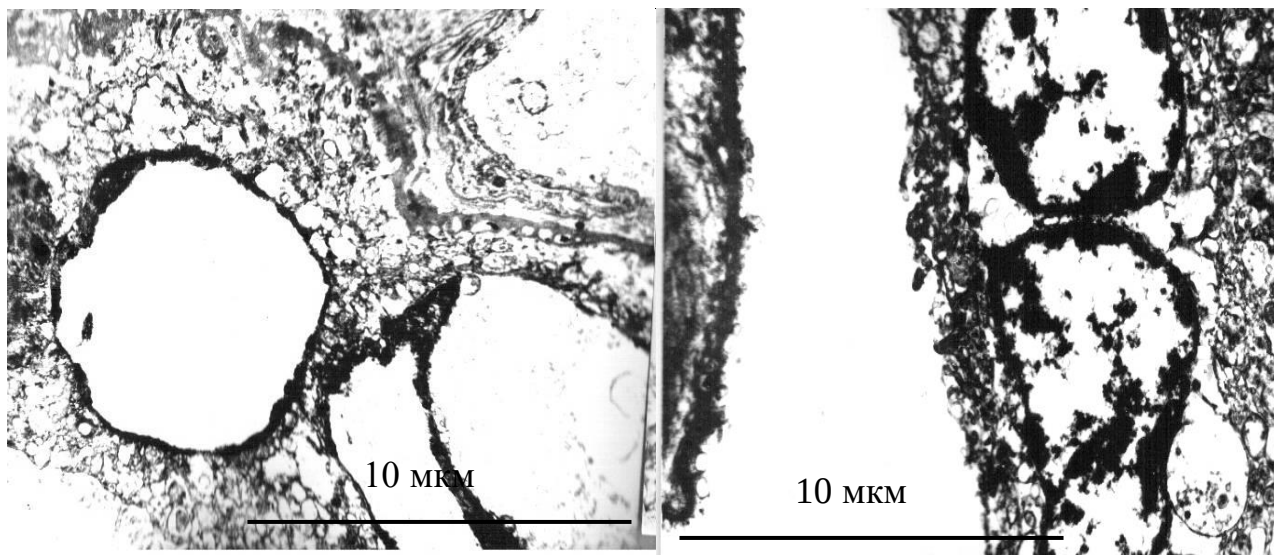


Рис. 3.15. Кріоушкодження в тканині плаценти при заморожуванні без кріопротектору: а – конденсація хроматину, деструкція органел, б – відриви трофобласта, перінуклеарна вакуолізація, елімінація мікроворсинок; електронна мікроскопія.

Після інкубування фрагментів плаценти в розчинах, що містили 5% ДМСО та 5% ГЕК суттєвих відмінностей у порівнянні з нативною тканиною не відмічено (рис. 3.16). Так, в окремих зразках спостерігалися різниця в електронній щільності мікроворсинок маргінальної кайми ворсин, деяке розширення цистерн ендоплазматичного ретикулума, ущільнення міжклітинного простору і незначний перерозподіл хроматину в ядрі. В цілому такі зміни трактуються, як функціональні та не приводять до ушкодження клітин і тканини.

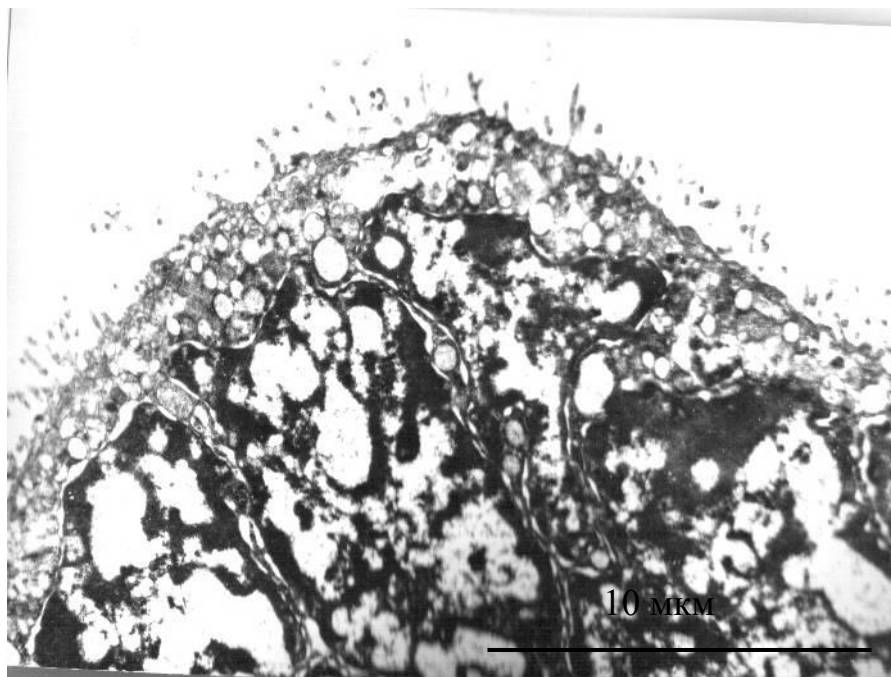


Рис. 3.16. Структура тканини плаценти після інкубування в кріоконсерванті, що містив 5% ДМСО та 5% ГЕК, електронна мікроскопія.

Після кріоконсервування фрагментів плаценти під захистом середовища, що містило розчини 5% ДМСО та 5% ГЕК спостерігали в основному ушкодження ендотеліоцитів. Проте, враховуючи незначну роль плацентарних судин при імплантації фрагментів плаценти, ми вважали, що факт девіталізації ендотеліоцитів не є принциповим для оцінки збереженості КФП. Після 4-х годин культивування деконсервованих фрагментів плаценти було виявлено окремі ділянки відшарування та зміну форми мікроворсинок, а в ряді випадків спостерігалася вакуолізація ендоплазматичного ретикулума і цитоплазми у вигляді збільшення цистерн і розширення каналців ендоплазматичного ретикулума з формуванням вакуолей (рис. 3.17).

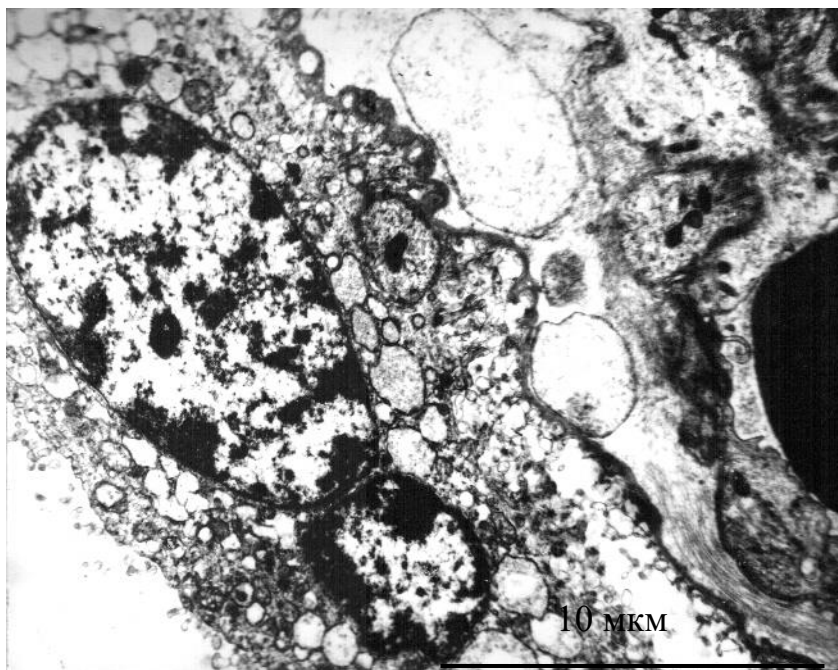


Рис. 3.17. Структура плацентарної тканини після кріоконсервування під захистом розчину, що містив 5% ДМСО та 5% ГЕК (зменшена кількість мікроворсин, вакуолі, ушкодження ендотеліоцитів), електронна мікроскопія.

Визначені ознаки відповідають незначному ступеню кріоушкоджень, які мають зворотній характер при перенесенні в сприятливі фізіологічні умови. Проте клінічне застосування КФП передбачає їх аплікацію за певним медичним показанням відповідно патологічному процесу або захворюванню. Тобто, мікрооточення КФП і реакції макроорганізму на їх імплантацію будуть відмінні від фізіологічних, що посилять процесінг означених сублетальних змін, знизить морфофункціональну здатність, а значить приживлюваність КФП і ефективність їх впливу. Це, в свою чергу, обумовлює подальше дослідження КФП і удосконалення процесу їх кріоконсервування.

Базуючись на результатах попередньої серії експериментів щодо визначення температурних локусів переохолодження при термографічному скануванні кріоконсервантів для подальшої оптимізації протоколу кріоконсервування фрагментів плаценти з метою виключення негативного

впливу переохолодження та ініціації кристалоутворення, ми застосували режим сидінгу протягом 90 с парами азоту при температурі -90°C .

При застосуванні режиму сидінгу та гістологічного дослідження КФП структура тканини була близькою до нативної, розриви в мезенхімі виявлялися менш ніж у 5% ворсин та були невеликі, відшарування трофобласта також спостерігали менш ніж в 5% ворсин (рис 3.18).

Дослідження термінальних ворсин КФП виявило збереженість синцитію у вигляді безперервної базофільної кайми з гіперхромними ядрами, клітинами цитотрофобласта, строми, а також відсутність структурних порушень міжклітинних контактів.

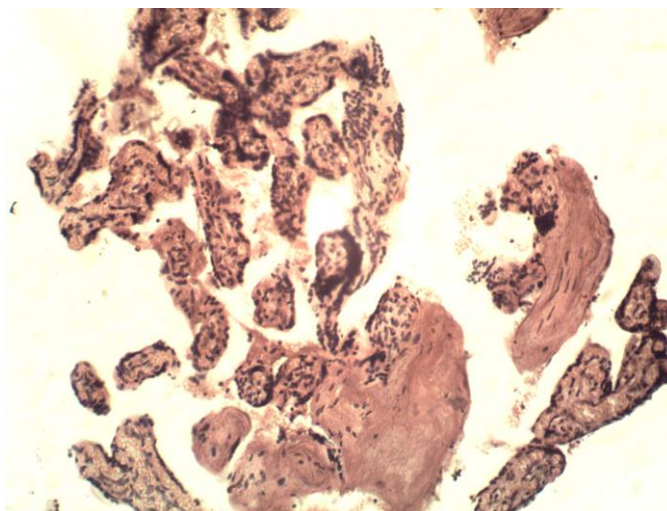


Рис. 3.18. Структура тканини плаценти після кріоконсервування з консервантом, що містив 5% ДМСО та 5% ГЕК, з застосуванням режиму сидінгу. Забарвлення гематоксиліном та еозином, $\times 200$

При електронно-мікроскопічному дослідженні зразків КФП даної серії експериментів (рис. 3.19) чітко диференціювали синцитій, строми, трофобласт, судини. При цьому порушення міжклітинних контактів практично не виявлялися. На поверхні синцитію були розташовані мікроворсинки зі збереженим середнім ступенем електронної щільності. Виявлено синцитіальні

вузли проліферації у вигляді полінуклеарних ділянок. Ядро і органели мали чітку структуру. Нуклеоплазма насичена хроматином у вигляді острівців і глибок по всьому об'єму, але з тенденцією центробіжного розташування. Мітохондрії мали природну овальну форму, в них визначалися кристи. Апарат Гольджі візуалізувався у вигляді пухирців і цистерн, ендоплазматичний ретикулум – у вигляді цистерн з рибосомами. Спостерігали незмінні макрофаги, в тому числі клітини Кащенко-Гофбауера. У процесі електронно-мікроскопічного дослідження з'являлися клітини різних розмірів, форм і будови, проте практично всі вони зберігали структурну цілісність. Через 4 години культивування КФП електронно-мікроскопічна картина не змінювалася.

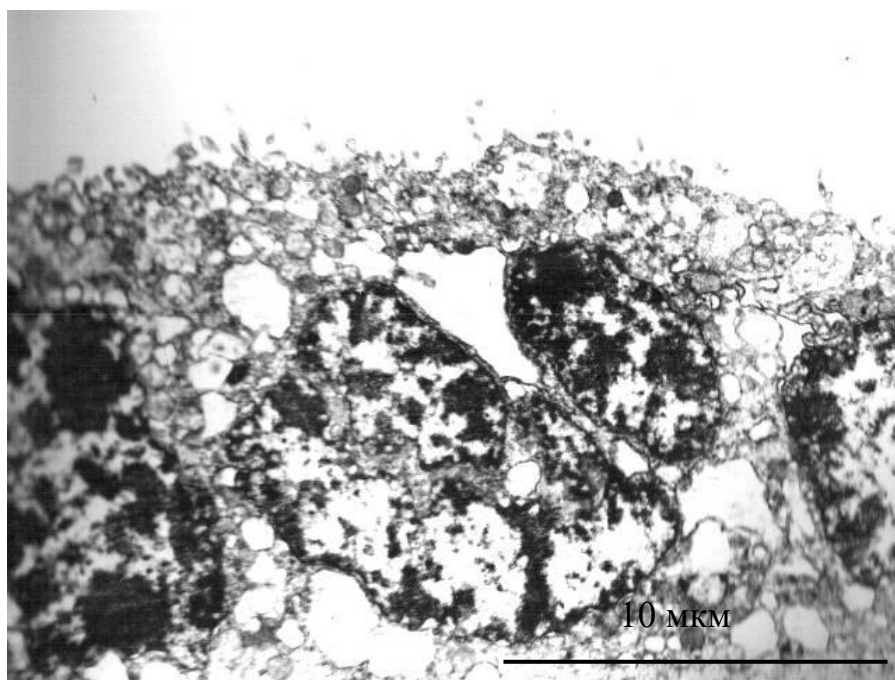


Рис. 3.19. Структура КФП, кріоконсервованого під захистом розчину, що містив 5% ДМСО та 5% ГЕК, з застосуванням сидінгу, електронна мікрофотографія.

Подальше дослідження даних КФП виявило достатньо високий ступінь не тільки структурної, а й функціональної збереженості.

Так, тестування вітальності КФП методом контакту з трипановим синім виявило забарвлення до 6% клітин, при чому барвник не проникав крізь трофобластичний шар.

Синтетична активність деконсервованих фрагментів плаценти, яка визначалась вмістом ХГЛ у добовій культурі, сягала 47,9 МОд/мл; що відповідає рівню збереженої та ініційованій функціям.

При проведенні електрофорезу ДНК кріоконсервованих фрагментів плаценти виявлено, що при заморожуванні без ініціації кристалоутворення спостерігалася фрагментація ДНК, а при означеній програмі та застосуванні сидінгу, цей ефект нівелювався (рис. 3.20).

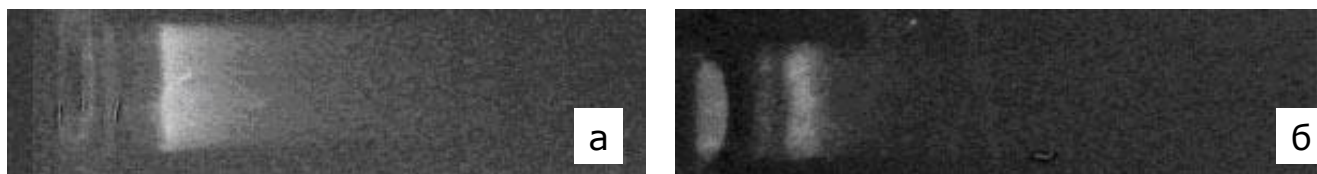


Рис. 3.20. Електрофореграми ДНК фрагментів плаценти: а – фрагментація ДНК, б – збереження єдиної фракції крупномолекулярної ДНК.

Відповідно до даних наукової літератури в галузі кріобіології та результатів власних попередніх досліджень доведено що, сидінг не завжди чинить позитивний вплив на збереженість біооб'єктів. Проте дана серія експериментів, а саме застосування режима сидінгу з метою удосконалення програми кріоконсервовування, дозволило суттєво зменшити ознаки кріоушкоджень і отримати деконсервовані фрагменти плаценти, морофункціональний стан яких практично відповідає нативним зразкам.

Таким чином, результати проведених досліджень у даному розділі дисертаційної роботи демонструють, що розроблена кріотехнологія отримання кріоекстракту плаценти дозволяє зберегти у неушкодженному стані значну кількість біологічно активних речовин плаценти. Отримана суспензія клітин плаценти містить різномірну популяцію клітин, які є життєздатними та ефективно кріоконсервуються з застосуванням 10% ДМСО. Фрагменти плаценти можуть бути збережені за рахунок кріоконсервовування з

кріоконсервантом, що містить 5% розчини ДМСО, ГЕК, і виключення зони переохолодження за допомогою ініціації кристалоутворення.

Одержані результати опубліковані в наступних публікаціях:

Прокопюк О.С. Глава 16. Кріоконсервирование плацентарных биообъектов, содержащих стволовые клетки / О.С.Прокопюк, В.И. Грищенко, Л.А. Бабийчук, В.Ю. Прокопюк, П.М. Зубов // Стволовые клетки и регенеративная медицина / Под. ред. В.А. Ткачука. – М.: МАКС Пресс, 2011. – 320 с. – С. 289–303.

Грищенко В.И. Новые криобиологические технологии получения клеточных и тканевых фетоплацентарных трансплантатов и их использование в медицине / В.И. Грищенко, Т.Н. Юрченко, О.С. Прокопюк // Трансплантология. – 2004. – Т. 7, № 3. – С. 123–129.

Прокопюк О.С. Кріоконсервирование плаценты различной степени зрелости / О.С. Прокопюк, А.Ю. Петренко, В.Ю. Прокопюк, В.В. Чижевский // Проблемы криобиологии. – 2008. – № 2. – С. 220.

Falko O.V. Modification of Placental Blood Serum Proteins induced by Low Temperatures / O.V. Falko, N.G. Zemllianskykh, O.V. Lipina, O.S. Prokopyuk // Biomedical Chemistry. – 2012. – Vol. 6, № 2. – P. 194–202.

Пат. № 30808А Україна, МПК А 01N1/02. Спосіб консервування тканини фетоплацентарного комплексу / Грищенко В.І., Юрченко Т.М., Прокопюк О.С., Строна В.І., Козлова В.П., Прокопюк В.Ю.; заявник та патентовласник Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України. – № 98062927; заявл. 05.06.98; опубл. 15.12.00. Бюл. № 7.

Пат. № 79009 Україна, МПК А01N 1/2 Спосіб кріоконсервування тканини плаценти / Прокопюк В.Ю., Прокопюк О.С., Чижевський В.В.; заявник та патентовласник Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України. – № U 2012 10931; заявл. 19.09.2012; опубл. 10.04.2013. Бюл. № 7.

Заготівля, кріоконсервування плацентарної тканини та її клінічне застосування: метод. рекомендації. / [В.І. Грищенко, О.С. Прокопюк І.Ю. Кузьміна, Т.М. Юрченко, В.І. Строна, Л.М. Юхимук]. – Харків: НАН України ІПКіК НАНУ, МОЗ України, Харк. Держ. Мед. універ., Коорд. центр транспл. орг., тканин та клітин, 1996. – 15 с.

Приготування та зберігання кріоконсервованої суспензії плаценти для клінічного використання: метод. рекомендації. / [В.І. Грищенко, Т.Ф. Морозова, О.М. Воротилін, А.М. Гольцев, О.В. Грищенко, О.С. Прокопюк, О.В. Ліпіна, О.Т. Ходько]. – Харків: НАН України ІПКіК НАНУ; МОЗ України, Харк. ін-т. удосконал. лікарів. – Харків, 1997. – 16 с.

Основні положення даного розділу доповідалися на I-му з'їзді Українського товариства кріобіологів і кріомедиків, 1995; 36-th Annual Meeting of Society for Cryobiology “Cryo’99”; XXVII-й науково-практичній конференції з міжнародною участю «Ліки людини. Сучасні проблеми створення, вивчення та апробації лікарських засобів», 2010; 47-th Annual Meeting of Cryobiology “2010”; Науковій конференції з міжнародною участю «Актуальные проблемы криобиологии и криомедицины», 2012.

РОЗДІЛ 4

ВЕРИФІКАЦІЯ БІОЛОГІЧНОЇ ДІЇ ТА БІОБЕЗПЕЧНОСТІ КРІОКОНСЕРВОВАНИХ БІООБ'ЄКТІВ ПЛАЦЕНТАРНОГО ПОХОДЖЕННЯ

Розвиток сучасних кріомедичних технологій передбачає їх попереднє ретельне дослідження і випробування в модельних експериментах на всіх рівнях біологічної організації. Відносно клітинно-тканинної терапії з використанням плацентарних структур таке наукове завдання є безперечно обов'язковим і актуальним. Обумовлено це різнофакторним, потужним потенціалом біологічного впливу БПП, принциповою онтогенетичною різницею між віком пацієнтів і БПП при їх клінічному використанні. Суттєвим є і той факт, що кріотехнології, при основній їх задачі – зберегти природні властивості біооб'єктів, певною мірою чинять на них модифікуючий вплив. Відповідно до цього ми досліджували дію отриманих КБПП на клітини, тканини, органи і організм у цілому, з метою верифікації їх функціональної активності, біобезпеки і визначення механізмів реалізації передбаченого ревіталізуючого потенціалу.

4.1. Вплив кріоконсервованих біооб'єктів плацентарного походження на культури клітин

Визначення впливу КБПП на клітинну культуру розкривають його особливості на клітинному і субклітинному рівнях.

Вивчення проліферативної активності паспортизованої культури клітин нирки сирійського хом'ячка *BHK-21 clone 13/04* (у якості тест-об'єкта) показало, що додавання КБПП у максимальній фізіологічній концентрації (0,2%) до живильного середовища не знижувало приріст клітин, проте

додавання 0,4% КЕП або 0,4% КФП пригнічувало його порівняно з контролем, що, на нашу думку, може бути пов'язано з наявністю у цих КБПП вільного гемоглобіну, який має токсичну дію на клітини *in vitro* (табл. 4.1). При додаванні ККП у підвищеній до 0,4% концентрації відзначалася стимуляція приросту клітин *BHK-21 clone 13/04* (табл. 4.1)

Таблиця 4.1

Проліферативна активність клітин *BHK-21 clone 13/04* на третю добу росту в присутності досліджуваних КБПП (ум.од.)

КБПП	Інтактний контроль	0,2% КБПП	0,4% КБПП
КФП	3,5±0,4	3,6±0,5	2,6±0,3*
КЕП	3,5±0,4	3,4±0,3	2,6±0,2*
ККП	3,5±0,4	3,7±0,2	4,2±0,3*

Примітка: * – статистична достовірність у порівнянні з контролем при $p < 0,01$.

У присутності досліджуваних КБПП культура клітин складалася переважно з однакових середніх за розміром клітин з округлими ядрами, з наявністю в них від двох до кількох ядерець різної форми. В моношарі клітин патологічних змін не виявлялося (рис. 4.1).

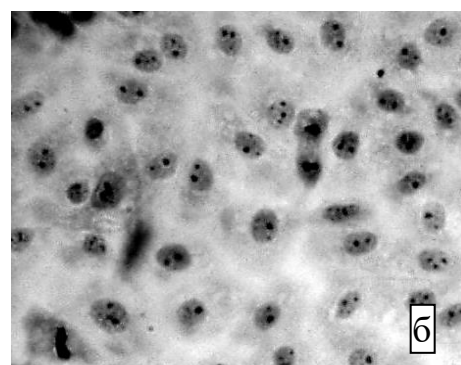
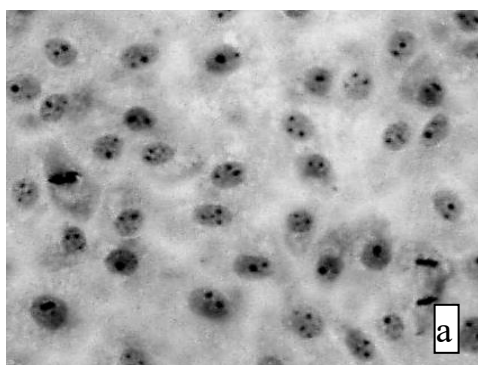


Рис. 4.1. Морфологія моношару клітин культури *BHK-21 clone 13/04* у контрольному варіанті (а) та у присутності досліджуваних КБПП (б). Забарвлення азур-еозином, $\times 400$.

При аналізі мітотичного режиму клітин *BHK-21 clone 13/04*, у більшості клітин, які діляться, фази мітозу відповідали нормі (рис. 4.2).

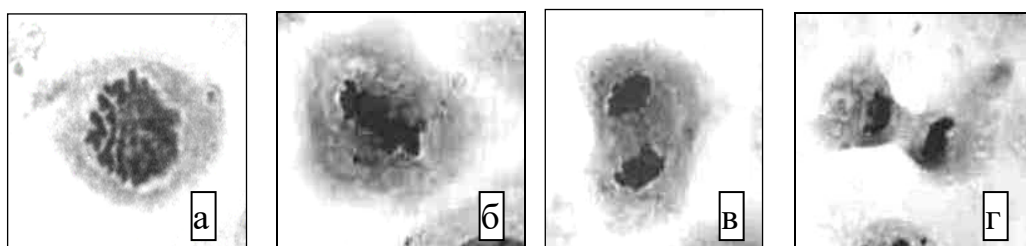


Рис. 4.2. Стадії мітозу клітин *BHK-21 clone 13/04* а – профаза, б – метафаза, в – анафаза, г – телофаза, $\times 900$.

Відсоток патологічних мітозів серед клітин, які діляться, не перевищив гранично допустимий рівень (табл. 4.2). При аналізі кількості патологічних мітозів достовірної різниці з контролем при застосуванні КБПП знайдено не було (табл. 4.2).

Серед патологічних мітозів зустрічалися форми з мікроядрами, 3-полюсний мітоз, що віддзеркалювало хромосомні перебудови, перебудову веретена поділу клітин (рис. 4.3).

Таблиця 4.2.

Наявність патологічних мітозів культури *BHK-21 clone 13/04* в експерименті, ‰

КБПП	Час росту клітин (години)				
	24	48	72	96	120
Контроль	$3,41 \pm 0,7$	$6,41 \pm 1,7$	$10,57 \pm 1,93$	$10,45 \pm 1,97$	$12,37 \pm 1,04$
КФП	$4,01 \pm 1,12$	$7,03 \pm 0,45$	$10,93 \pm 0,17$	$11,25 \pm 1,29$	$12,22 \pm 1,21$
КЕП	$3,12 \pm 0,11$	$9,56 \pm 1,41$	$8,33 \pm 1,21$	$7,53 \pm 0,12$	$13,69 \pm 1,32$
ККП	$4,04 \pm 1,02$	$7,41 \pm 1,7$	$7,33 \pm 0,43$	$2,33 \pm 0,21$	$11,02 \pm 1,25$

Такі зміни та їх кількість, що знаходиться в межах норми, свідчать не про токсичність досліджуваних біопрепаратів, а про адаптивні перебудови в

клітинах культури під дією ростових плацентарних факторів.

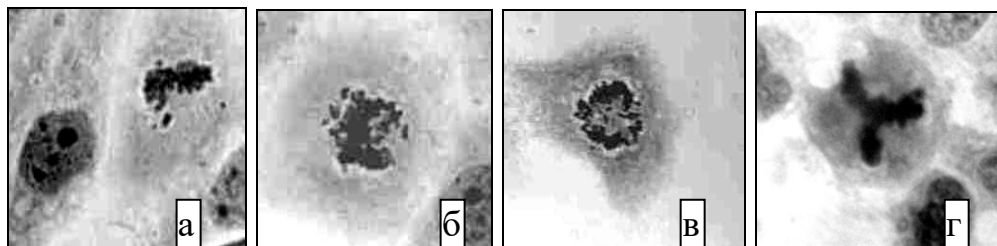


Рис. 4.3. Патологічні форми мітозу клітин *BHK-21 clone 13/04* в експерименті: а – мікроядра, б – К-мітоз, в – порожниста метафаза, г – 3-полюсний мітоз, $\times 900$.

При аналізі мітотичного режиму клітин в експерименті було визначено збільшення мітотичної активності клітин культури в присутності КБПП (табл. 4.3).

Таблиця 4.3

Мітотична активність клітин культури *BHK-21 clone 13/04* в експерименті, ‰

КБПП	Час росту клітин (години)				
	24	48	72	96	120
Контроль	8,33 $\pm$ 1,53	7,04 $\pm$ 1,12	20,33 $\pm$ 3,51	16,33 $\pm$ 1,53	6,67 $\pm$ 1,53
КФП	8,1 $\pm$ 2,04	17,3 $\pm$ 2,08*	27,67 $\pm$ 1,52*	15,33 $\pm$ 1,53	8,67 $\pm$ 1,53
КЕП	12,01 $\pm$ 2,32	13,0 $\pm$ 1,12*	20,33 $\pm$ 1,53	12,67 $\pm$ 2,13	5,56 $\pm$ 1,43
ККП	11,01 $\pm$ 1,33	14,0 $\pm$ 1,23*	25,33 $\pm$ 3,51	18,33 $\pm$ 2,21	6,21 $\pm$ 2,33

Примітка: * – статистична вірогідність в порівнянні з контролем при $p < 0,01$.

Аналіз каріотипічних показників клітин культури *BHK-21 clone 13/04* (будова і кількість хромосом у клітинах, гістограма розподілу хромосом у клітинній популяції та перебудови окремих хромосом) показав відсутність хромосомних порушень у клітинах після введення в середовище культивування досліджуваних КБПП. Виявлений (рис. 4.4) незначний зсув в гістограмі

розподілу хромосом у клітинах є характерним для адаптаційних процесів, які розвиваються в культурі клітин, які активно ростуть.

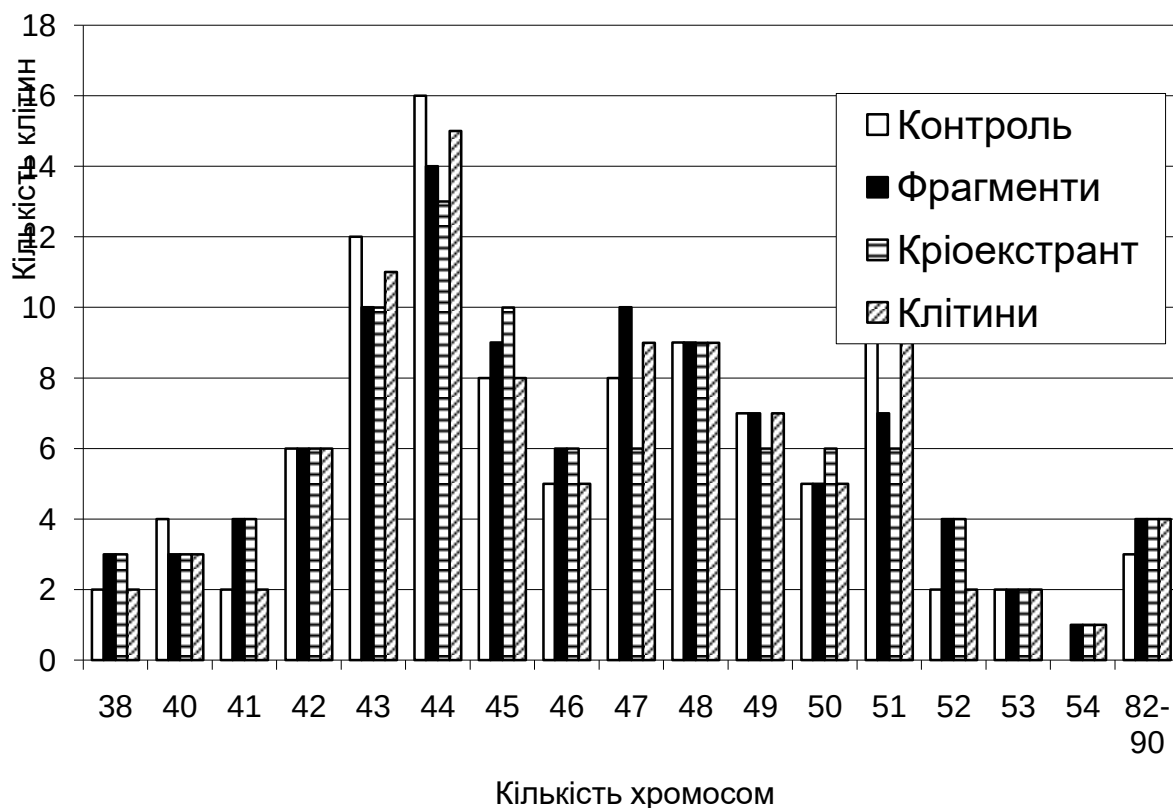


Рис. 4.4. Розподіл кількості хромосом в клітинах культури *BHK-21 clone 13/04* в присутності КБПП в концентрації 0,2%.

Таким чином, визначено, що кріоконсервовані фрагменти і кріоекстракт плаценти, а також суспензія кріоконсервованих клітин плаценти в 0,2% концентрації не чинять токсичної дії на морфологічний стан моношару клітинної культури *BHK-21 clone 13/04*. У присутності КБПП спостерігалось збільшення мітотичної активності клітин тест-культури. Виявлені специфічні нуклеарні перебудови в процесі мітозу (у допорогових збільшеннях) і незначний зсув у гістограмі розподілу хромосом у клітинах свідчили про адаптацію клітинної популяції до зростання в присутності кріоконсервованих біоб'єктів плацентарного походження, які містять і секретують комплекс ростових факторів, онтогенетично характерних для моменту народження дитини.

4.2. Динаміка активності та тривалість функціонування кріоконсервованих біооб'єктів плацентарного походження в організмі експериментальних тварин

Визначення плацентарних сполук в організмі після введення КБПП у динаміці спостереження характеризує особливості впливу на організм клітинно-тканинних і безклітинних біооб'єктів. Такі дані важливі для визначення часу настання біологічного ефекту, його піку і тривалості впливу на макроорганізм.

Так, після введення КЕП лабораторним тваринам вміст АФП і ХГЛ був максимальним у першу добу, після чого різко знижувався протягом 7-и діб і в подальшому практично не відрізнявся від рівня цих речовин у інтактних тварин. Достовірність даних може підтвердити отримана раніше динаміка зміни вмісту цих сполук після введення лабораторним тваринам МІБП кріоцелл-кріокорд, який є кріоконсервованою сироваткою плацентарної крові та в певній мірі відповідає за фізико-біохімічними характеристиками КЕП. Дослідження показали, що таке припущення є правомірним, оскільки рівень вмісту і динаміка зміни АФП і ХГЛ при введенні лабораторним тваринам як КЕП, так й сироватки кордової крові (МІБП кріоцелл-кріокорд) були аналогічними (рис. 4.5.).

При введенні КФП лабораторним тваринам підвищення концентрації ХГЛ і АФП у крові спостерігали, починаючи з 3–4 доби, максимум відзначали, в середньому, до кінця тижня, після чого їхні рівні залишалися стабільними протягом місяця, потім знижувалися та до кінця другого місяця практично відповідали вихідним даним.

При введенні суспензії ККП лабораторним тваринам рівень АФП підвищувався вже з першої доби, ХГЛ реєструвався в крові на 3-ю добу, концентрації цих сполук наростали протягом тижня і залишалися на такому рівні до 30-ти діб, після чого практично одночасно знижувалися до вихідних даних (рис. 4.5.).

Визначено, що після введення КФП і ККП кінетики коливань вмісту есенціальних плацентарних сполук в організмі та їх елімінації мають схожі характери.

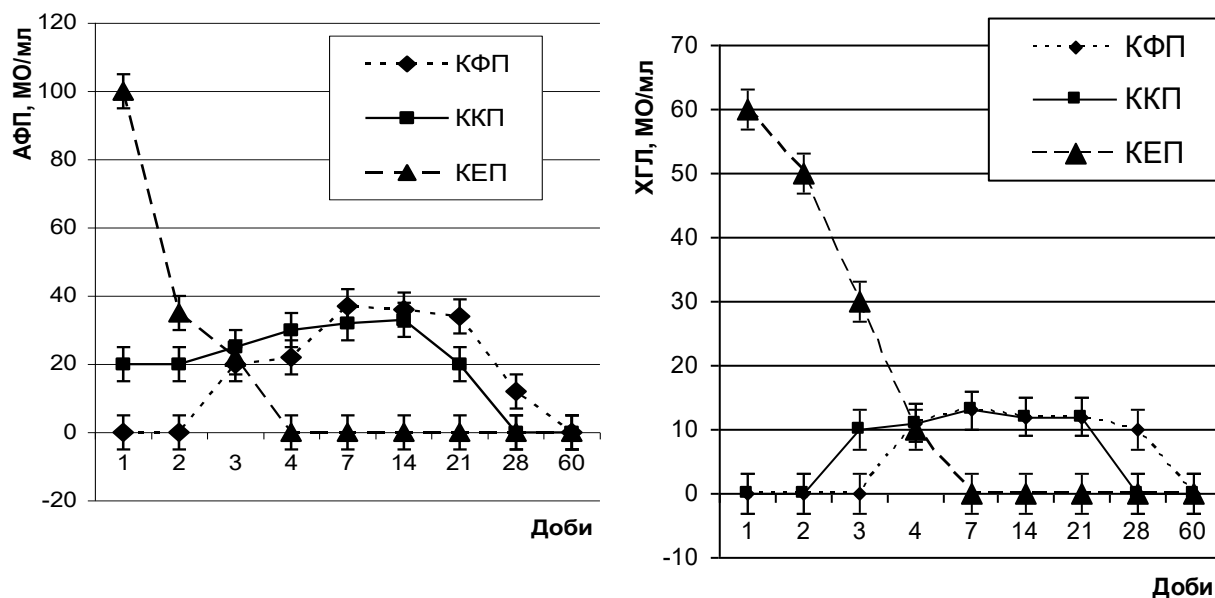


Рис. 4.5. Динаміка рівней АФП і ХГЛ у крові лабораторних тварин після введення КБПП, МОд/мл.

Таким чином, КБПП, що містять тільки есенціальні сполуки, чинять виражений і максимальний вплив у першу добу після введення, їх пряма дія на організм обмежується тижнем, а в подальшому ефект обумовлюють реакції організму на сполуки, які вводяться та їх релізінг-ініціююча дія. Введення клітинно-тканинних структур плаценти (КФП і ККП) приводило до більш плавної динаміки вмісту досліджуваних речовин (ХГЧ і АФП), тривалість їх виявлення була більшою (в 4–9 разів), що може пояснюватися функціонуванням в організмі збережених фрагментів і клітин плаценти.

Для визначення особливостей функціонування імплантованих КФП в організмі важливе дослідження їх структури і оточуючих тканин як прояву реакції організму на введення плацентарного БПП. Суттєвим є дослідження означених змін у динаміці та проведення кореляції морфологічного стану з коливанням рівнів БАР плацентарного походження в системі *in vivo* для подальшого виявлення хронології механізмів біологічної дії КБПП.

Після імплантації експериментальним тваринам під шкіру стегна на 1-у добу КФП на гістологічних зрізах вони виглядали морфологічно збереженими і функціонально активними. Серед термінальних ворсин плаценти виявлялися спеціалізовані форми з периферичним розташуванням капілярів і синцитіальних вузлів. Однак щільність «упакування» функціонально активних структур (кровоносних капілярів і синцитіальних вузлів) в ворсинах була меншою, ніж в нормі, спостерігалось збільшення кількості безсудинних ворсин і подекуди відшарування синцитіотрофобласта, (рис. 4.6.).

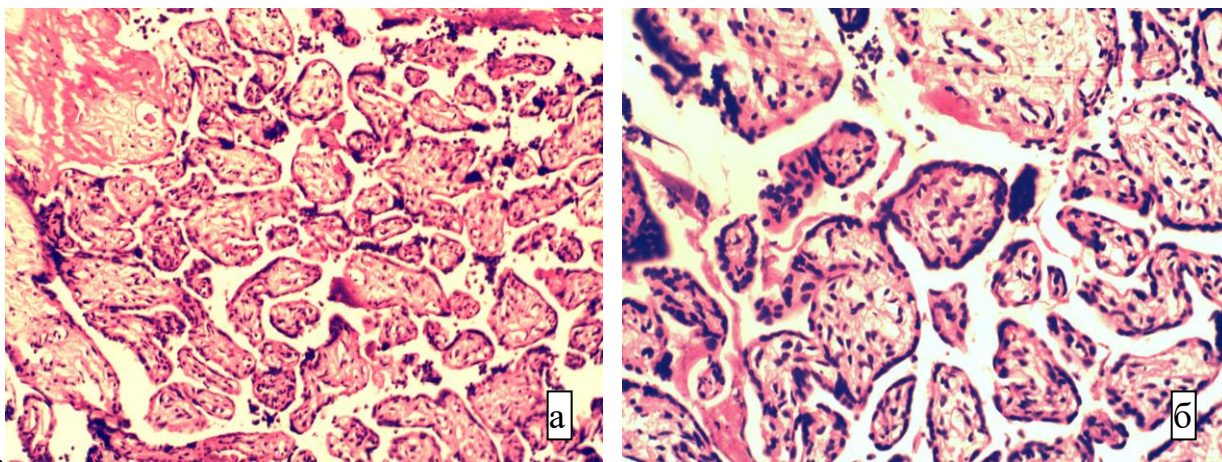


Рис. 4.6. Кріоконсервованій фрагмент плаценти через добу після імплантації: а – $\times 200$; б – $\times 400$. Забарвлення гематоксилином і еозином.

На 3-ю добу після імплантації у КФП візуалізувалися набухання строми ворсин, місцями – дистрофічні процеси в трофобласті. При цьому синцитіальні вузли зберігалися. Спостерігалось нерівномірне розширення і звуження інтервільозного простору. Були помітні ознаки асептичного запального процесу у вигляді помірної лейкоцитарної інфільтрації (рис. 4.7).

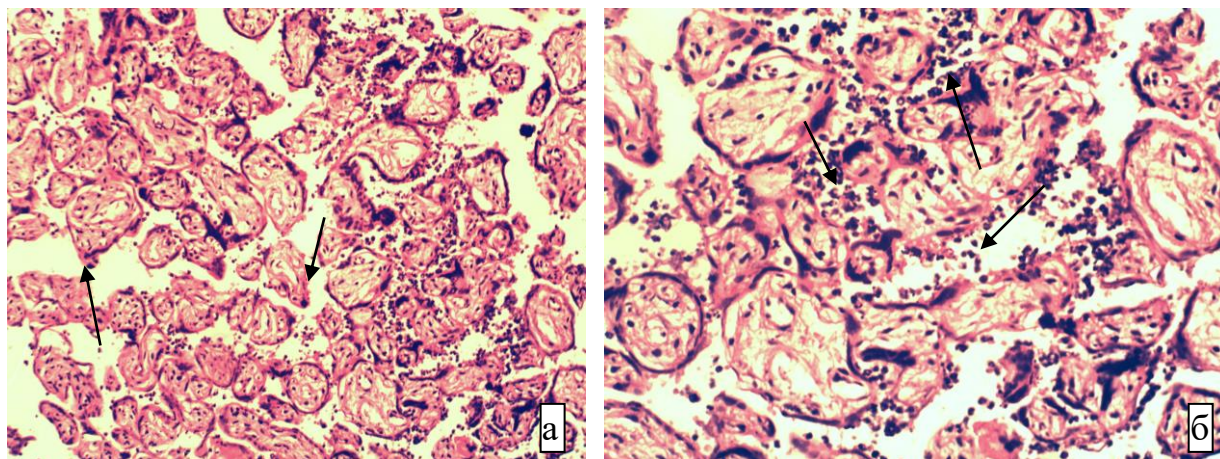


Рис. 4.7. Кріоконсервований фрагмент плаценти на 3-ю добу після імплантації: а – термінальні ворсини зі збереженими синцитіальними вузлами, $\times 200$; б – помірна лейкоцитарна реакція, $\times 400$. Забарвлення гематоксиліном і еозином.

На 4-у добу інтервільозні простори по всій площі імплантованого КФП були звужені, набухання строми ворсин стало помітніше. Лейкоцитарна реакція залишалася на тому ж рівні (рис. 4.8).

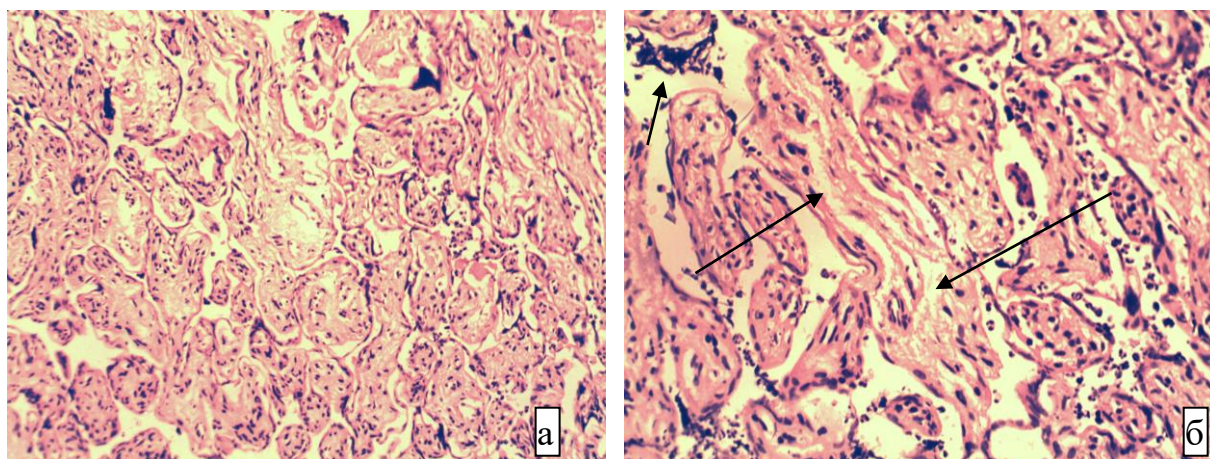


Рис. 4.8. Кріоконсервований фрагмент плаценти на 4-у добу після імплантації: а – $\times 200$; б – набухання строми ворсин, помірна макрофагально-лейкоцитарна реакція, $\times 400$. Забарвлення гематоксиліном і еозином.

Через 7 діб після імплантації КФП між групами щільно прилеглих одна до одної термінальних ворсин і окремими термінальними ворсинами виявлялася макрофагально-лейкоцитарна інфільтрація, що зазвичай розвивається у

відповідь на пошкодження тканини. При цьому у термінальних ворсинах практично не визначалися плацентарні кровоносні судини, водночас спостерігався початок васкуляризації імплантованого КФП судинами реципієнта. Мукоїдне набухання строми ворсин було більш вираженим (рис. 4.9).

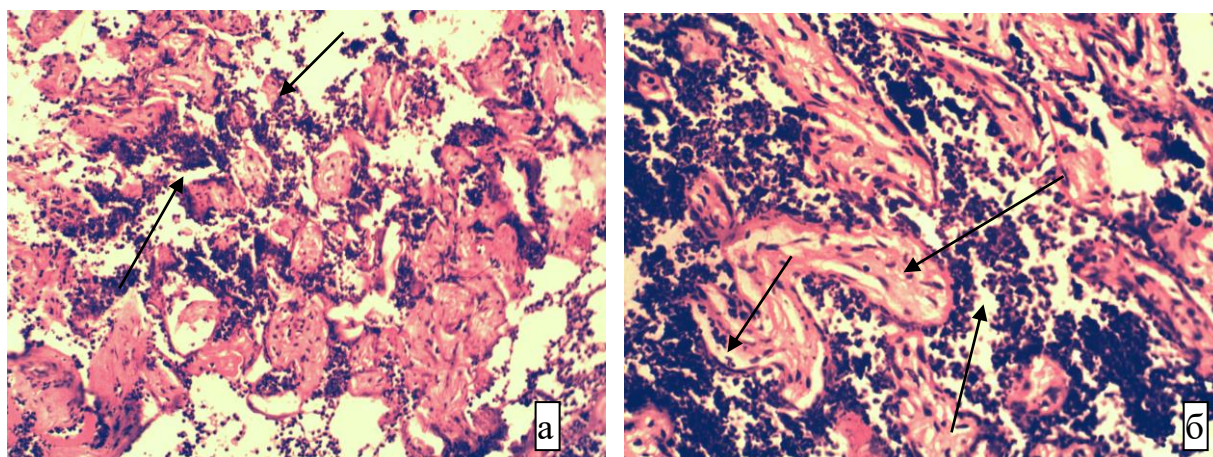


Рис. 4.9. Кріоконсервований фрагмент плаценти на 7-у добу після імплантації: а – лейкоцитарний інфільтрат між окремими термінальними ворсинами та їх групами, щільно прилеглих одна до одної, $\times 200$; б – набухання строми ворсин, макрофагально-лейкоцитарна реакція, $\times 400$. Забарвлення гематоксиліном і еозином.

Через 14 діб реакція ложа імплантації визначалася у вигляді випотівання білкової рідини з судин (набряк), міграції лейкоцитів, формування грануляційного валу, продовження васкуляризації КФП *de novo* (рис. 4.10).

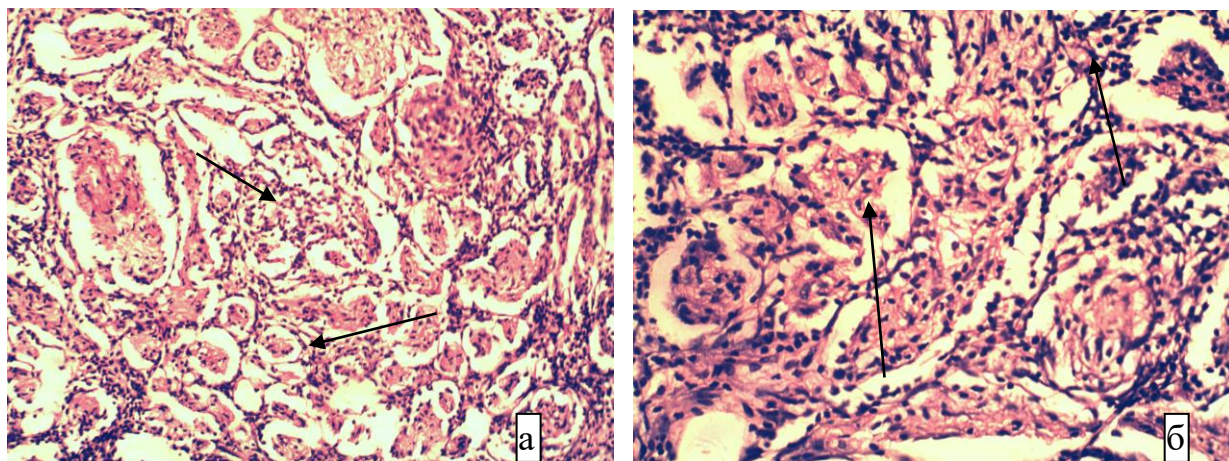


Рис. 4.10. Кріоконсервований фрагмент плаценти на 14-у добу після імплантації: а – набряк і міграція лейкоцитів, $\times 200$; б – виражена проліферація сполучнотканинних клітинних елементів і різноманітність клітинних форм, $\times 400$. Забарвлення гематоксиліном і еозином.

Молоді сполучнотканинні клітини різної величини і форми, які є нащадками місцевих клітин сполучної тканини, розташовувалися переважно навколо молодих судин. Серед цих клітин розрізнялися: дрібні круглі клітини, морфологічно подібні до лімфоцитів крові; макрофаги, великі лімфоїдні клітини зі світлим ядром і чітко помітним цитоплазматичним шаром, у якому знаходилися зерна, вакуолі, клітинний детрит (що вказувало на їх фагоцитарну діяльність); плазматичні клітини; фібробласти. Серед вищевказаних клітин у ранні періоди розвитку грануляційної тканини знаходилося багато поліморфноядерних лейкоцитів. Взагалі проведення межі між запаленням і гранулюванням не завжди можливо, і розвиток грануляційної тканини іноді відбувається паралельно з запаленням, яке вважають грануляційною або репаративною складовою запалення. Підставою для цього служить те, що запалення з самого початку (а в його розпалі обов'язко) протікає з більш-менш вираженими проліферативними явищами з боку сполучнотканинних елементів, що і спостерігалось в даному випадку. Таким чином, грануляційна тканина по суті є відновною тканиною.

На 30-у добу у всіх тварин місце імплантації КФП являло собою структуру з осередками цитотрофобласта в молодій сполучній тканині, в якій клітини майже витіснили білкову рідину (рис. 4.11) при цьому зменшилась кількість лейкоцитів і зникли дрібні лімфоїдні клітини, а почали переважати більші пластинчасті клітинні елементи, які набували витягнутої форми і, розташовуючись один до одного, утворювали пучки і виявляли властивості фібробластів, що синтезують колагенові волокна. Капіляри були помірно повнокровні.

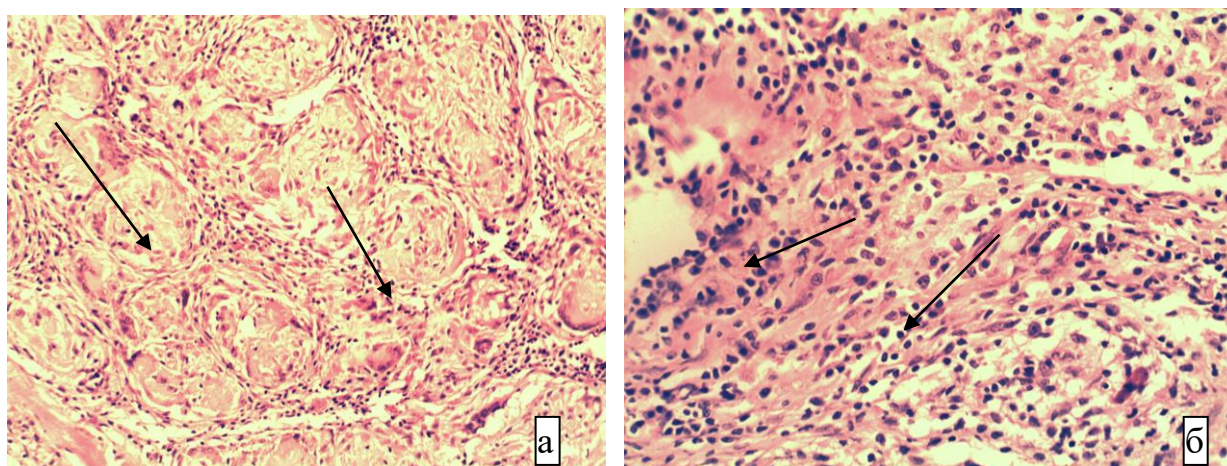


Рис. 4.11. Кріоконсервований фрагмент плаценти на 30-у добу після імплантації: а – розвинена грануляційна тканина з осередками трофобласта, капіляри $\times 200$; б – великі пластинчасті клітинні елементи, фібробласти, капіляри, $\times 400$. Забарвлення гематоксиліном і еозином.

Через 60 діб після імплантації КФП (рис. 4.12) майже в усіх тварин на місці імплантата виявлялося зменшення кількості клітин і судин грануляційної тканини, з'являлися стійкі елементи сполучної тканини у вигляді колагенових волокон і нормально розвинені кровоносні судини. Однак вздовж останніх у цей час спостерігалися муфти з лімфоцитів і плазматичних клітин. При збільшенні кількості колагенових волокон грануляційна тканина поступово перетворювалась на зрілу волокнисту сполучну тканину. У розвитку стійких елементів сполучної тканини на місці імплантованого КФП брали участь усі клітини грануляційної тканини, за винятком лейкоцитів. Поряд з фібробластами

в розвитку сполучної тканини важливу роль відігравали лімфоїдні форми, які зазвичай позначаються як полібласти. Осередки трофобласта визначалися рідко, лише в окремих полях зору, в основній масі вони були заміщені сполучною тканиною.

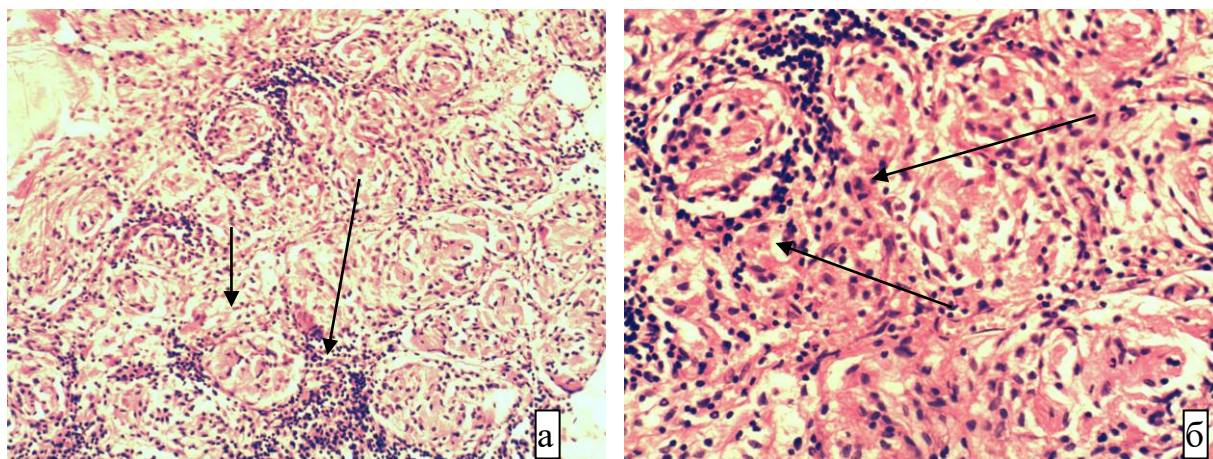


Рис. 4.12. Кріоконсервований фрагмент плаценти на 60-у добу після імплантації: а – муфти з лімфоцитів і плазматичних клітин по ходу кровоносних судин, $\times 200$; б – зріла волокниста сполучна тканина, $\times 400$. Забарвлення гематоксиліном і еозином.

Таким чином, результати морфологічного дослідження імплантованих КФП і *locus implantatio* корелюють з отриманими даними щодо динаміки циркуляції і виведення біологічно активних речовин (АФП, ХГЛ) плацентарного походження, та демонструють достатньо високу морфофункціональну збереженість КФП.

Результати вивчення структури імплантованих КФП, оточуючих тканин і дані щодо циркуляції БАР плаценти в організмі експериментальних тварин, свідчать про те, що запропоновані кріотехнології дозволяють досить тривалий час функціонувати імплантованим КФП, отриманим з плаценти 36–38 тижнів гестації, реалізувати замісну, регуляторну та синтетичну функції, а також чинити ініціюючий вплив на регенеративний потенціал в організмі реципієнта.

4.3. Результати дослідження вірогідної аномальної токсичності, ембріотоксичності та тератогенності кріоконсервованих біоб'єктів плацентарного походження

Результати спостереження за лабораторними тваринами, що використовувалися у тестовому експерименті, на можливу аномальну токсичність КБПП у порівнянні з інтактними тваринами не виявили достовірної різниці. У жодної з експериментальних тварин не спостерігалось ознак інтоксикації, видимих проявів захворювань або патологічних станів. Усі тварини до кінця терміну спостереження були живі. Маса кожної тварини в день закінчення експерименту достовірно не змінилася в порівнянні з початковою. В місці введення препаратів проявів запальних процесів у вигляді набряку, гіперемії, ексудації, абсцедування або інших змін шкірних покривів чи вовни не виявлено.

При розширеному гістологічному дослідженні внутрішніх органів кролів, що використовувалися в даній серії модельного експерименту, отримані наступні дані. Тканина кори головного мозку виглядала збереженою. Цито- і мієлоархітектоніка молекулярного і зовнішнього зернистого шарів кори були в нормі. Нейрони кори головного мозку мали світлі ядра з добре означеним ядерцем, нейропіль (петельна мережа, що оточує тіла нейронів та утворюється аксонами, дендритами і відростками клітин глії) був рівним, дрібночарунковим. Ознак порушень у нейропіль у вигляді вакуолей не виявлено (рис. 4.13, а). У кровоносних судинах кори формені елементи крові частіше за все не виявлялися (рис. 4.13, б). Так само, як і в тканині головного мозку у інтактних тварин, відзначалися незначні періцелюлярні і періваскулярні набряки.

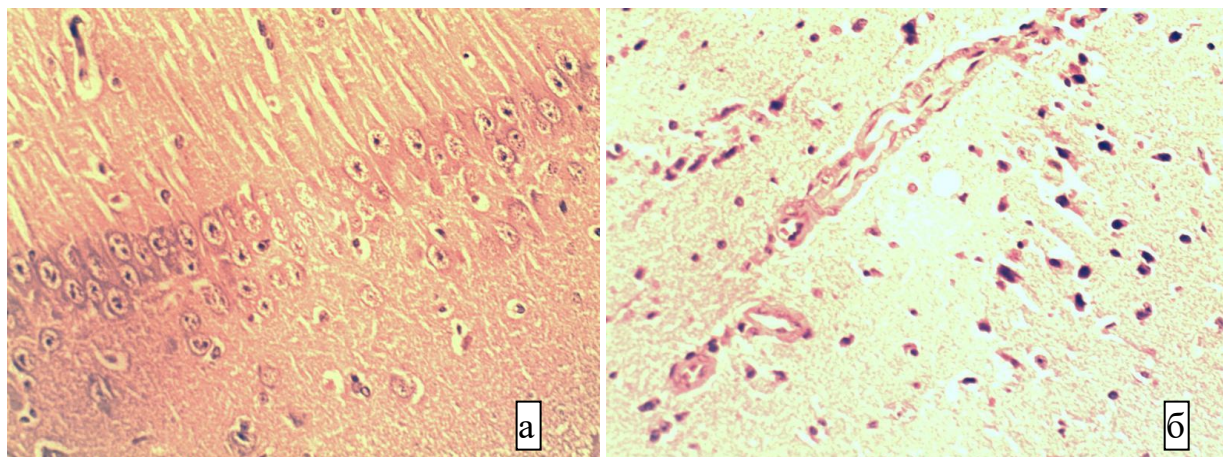


Рис. 4.13. Головний мозок кроля після введення КБПП (КФП). Збереженість нейроцитів (а) і нейроглії (б). Забарвлення гематоксиліном і еозином, $\times 400$.

М'язова оболонка стінки серця (міокард) кролів була представлена поперечносмугастим серцевим м'язом. На зрізах міокарда була добре видно мережу розгалужених поперечносмугастих м'язових волокон, у які за допомогою клітинних контактів (вставні диски) об'єднувалися в кардіоміоцити (рис. 4.14).

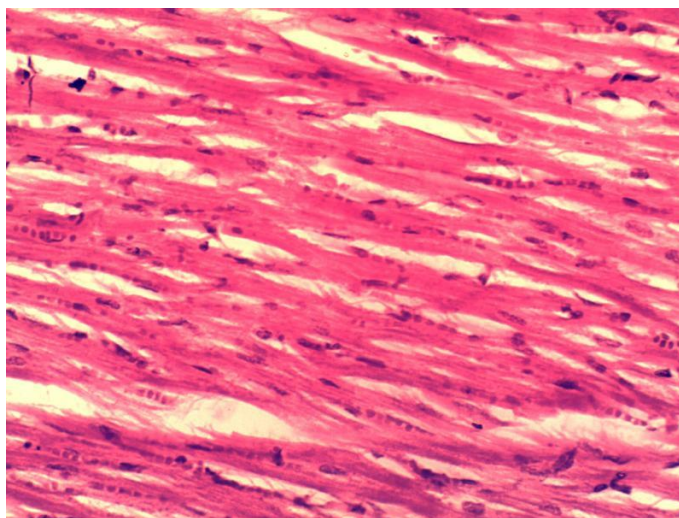


Рис. 4.14. Поздовжній зріз міокарда кроля після введення КБПП (КФП). Кардіоміоцити об'єднані в м'язові волокна з анастомозами між ними і сполучною тканиною з кровоносними судинами. Забарвлення гематоксиліном і еозином, $\times 400$.

Вставні диски в складі волокон маркували кордон між кардіоміоцитами. Ядра з дифузним дрібнодисперсним хроматином мали овальну форму, були

розташовані вздовж поздовжньої осі волокон і займали центральне положення. На поперечному зрізі м'язові волокна мали округлу форму. Між волокнами серцевого м'яза визначалися пухка сполучна тканина і кровоносні капіляри, заповнені форменими елементами крові.

У кролів було виявлено нормальну будову печінкової тканини з правильною організацією печінкових часточок, регулярною трабекулярною будовою паренхіми печінки, правильною організацією і нормальним діаметром капілярів синусоїдного типу (рис. 4.15). Подекуди судини венозного типу були помірно діатовані. Міжчасточкова сполучна тканина містила невелику кількість фібробластичних клітинних елементів і подекуди була інфільтрована лімфоцитами. У портальних зонах міжчасточкові артерії, вени і жовчні протоки були вільні. Поблизу портальних зон виявлялися регенеруючі гепатоцити з великими світлими ядрами, які знаходилися в стадії мітотичного поділу. Діаметр капілярів синусоїдного типу був дещо збільшеним, за рахунок чого паренхіма печінки виглядала більш функціонально активною.

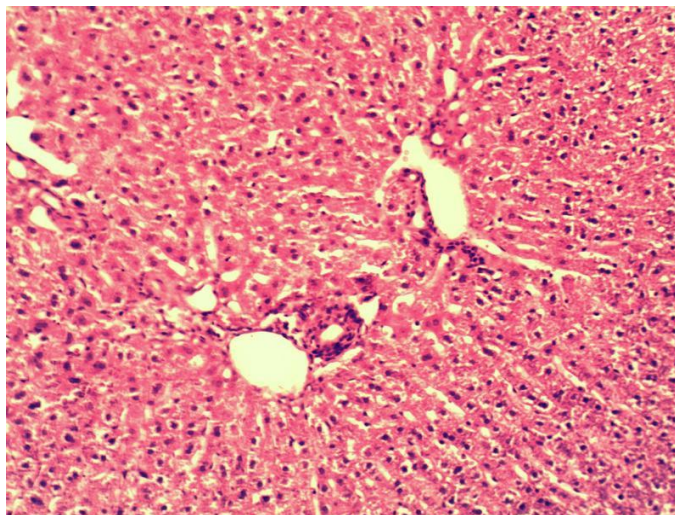


Рис. 4.15. Печінка кроля після введення КФП. Регулярна трабекулярна будова паренхіми печінки. Правильна організація діатованих капілярів синусоїдного типу. Міжчасточкові артерії, вени і жовчні протоки вільні. Забарвлення гематоксиліном і еозином, $\times 200$.

У тканині нирки кролів виявлялася нормальна структура як коркової, так і мозкової речовини. У корковій речовині були присутні ниркові тільця овальної форми, які складаються з капілярного клубочка і його епітеліальної капсули, а також звиті каналці (проксимальні та дистальні).

У мезангіумі капілярного клубка досить часто виявлялися макрофаги і фібробласти, поодинокі колагенові волокна (рис. 4.16, а). Мозкову речовину було представлено паралельними низхідними і висхідними частинами петлі Хенля, збиральними трубочками і кровоносними капілярами. Товстий відділ низхідної частині петлі складався з високого кубічного каємчатого епітелію. Клітини товстого відділу висхідної частини петлі мали меншу висоту і світлішу цитоплазму, щіткова кайма була відсутня. Тонкий відділ петлі утворений плоским епітелієм. Збірні трубочки мали відносно широкий просвіт, їх стінка утворена циліндричними клітинами зі світлою цитоплазмою (рис. 4.16, б).

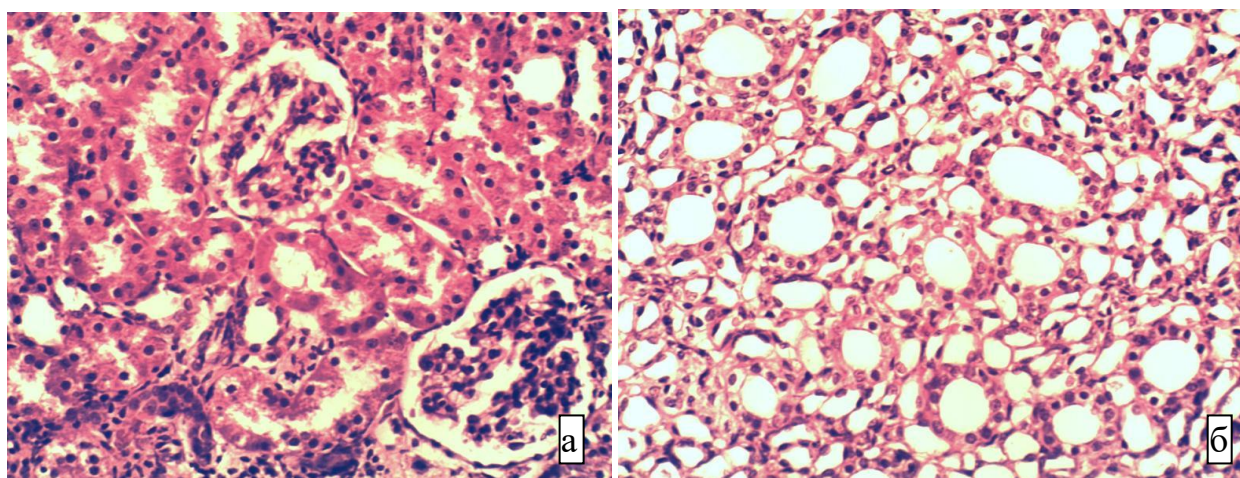


Рис. 4.16. Коркова речовина нирки кроля після введення КБПП (КФП). Наявність просвіту капсули Шумлянського-Боумена і прояв «лапчастості» клубочка (а); мозкова речовина нирки з морфофункціонально активним каналцевим епітелієм (б). Забарвлення гематоксиліном і еозином, $\times 400$.

Селезінка кролів мала практично звичайну будову (рис. 4.17). В основі пульпи визначалася ретикулярна тканина, яка утворює її строму. У середину від

сполучнотканинної капсули відходили трабекули селезінки, що в глибоких її частинах анастомозували між собою. У розташованих між синусами пульпарних тяжах виявлялися осередки плазмоцитогенезу. Сукупність лімфоїдної тканини – біла пульпа селезінки – була в адвентиції її артерій у вигляді кулястих скупчень або подовжених лімфатичних піхв (лімфатичні фолікули). У них виявлялися артерії, які розташовувалися ексцентрично. Від фолікулів відходили гемокапіляри у напрямку до крайових синусів червоної пульпи. У лімфатичних фолікулах можна було розрізнити три нечітко розмежовані зони: периартеріальну (центр розмноження), мантийний шар і крайову або маргінальну зону. Суттєвих змін у селезінці кролів відзначено не було, крім того, що співвідношення червоної і білої пульпи було трохи зрушене в бік білої пульпи, що свідчить про активізацію лімфоїдної тканини селезінки, тобто про підвищення її імунологічної функції.

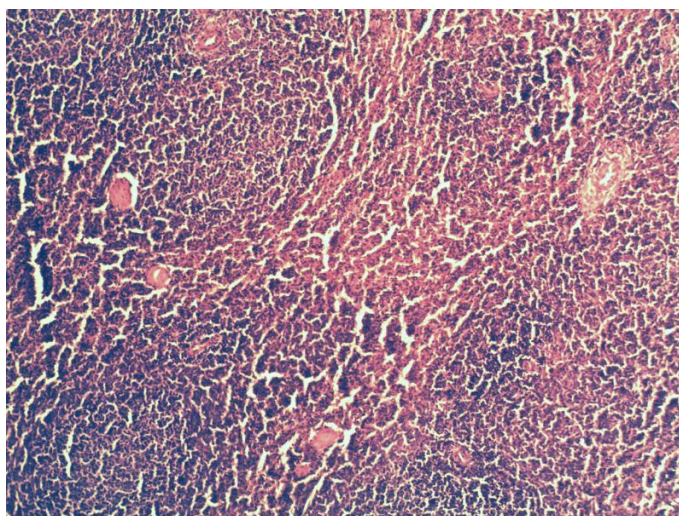


Рис. 4.17. Селезінка кроля після введення КБП (КЕП). Зміщення співвідношення червоної і білої пульпи в бік білої пульпи з лімфатичними фолікулами, що залягають в адвентиції артерій. Забарвлення гематоксиліном і еозином, $\times 200$.

На підставі проведених досліджень було встановлено, що введення КБПП не чинить ушкоджуючої токсичної дії на морфофункціональні властивості органів кролів у експерименті *in vivo*. Водночас виявлено ознаки підвищення функціональної активності та деякого структурного ремоделювання в життєвоважливих органах (головному мозку і серці) при характерних проявах напруги діяльності органів відповідних за метаболізм та виведення екзогенних плацентарних сполук (печінки, нирок, селезінки), що надійшли до організму в багатократно збільшеній дозі.

Таким чином, виявлено, що КБПП, а саме кріоконсервовані кріоекстракт, фрагменти, клітини плаценти, в модельних експериментах «аномальної токсичності», коли лабораторним тваринам вводили повну терапевтичну дозу, розраховану на людину середньої ваги, не мають ушкоджуючого впливу на організм, тобто відповідають необхідним вимогам щодо відсутності токсичності.

Виявлення біологічної дії КБПП на процеси запліднення, розвиток внутрішньоутробного плода і результат вагітності проведено з розумінням того, що саме гестація і система мати-плацента-плід найбільш чутливі до екзогенних факторів і, відповідно, до змін (позитивних або негативних), якщо вони відбуваються, є демонстративними.

На першому етапі проводили визначення вірогідної ембріотоксичної, ембріолетальної і тератогенної дії КЕП, яку вводили вагітним самицям щурів.

Отримані результати (табл. 4.4) свідчать про відсутність значної ембріолетальної дії КЕП, але необхідно відмітити тенденцію до збільшення постімплантаційної летальності, загальної ембріональної летальності та достовірного збільшення місць резорбції передімплантаційної летальності та зменшення кількості живих плодів у вагітних самок на фоні введення КЕП. Водночас спостерігалася тенденція до збільшення ваги плодів і плацент.

Таблиця 4.4

Показники вірогідної ембріолетальної дії кріоекстракту плаценти

Показники	Тварини, які отримували КЕП	Інтактні тварини (контроль)
Кількість вагітних самиць	20	18
Кількість жовтих тіл на одну самицю	9,90±0,40	8,88 ± 0,79
Кількість місць імплантації	7,70±0,59	8,63 ± 0,68
Кількість місць резорбції	0,75±0,02*	0,38 ± 0,16
Кількість живих плодів	6,95±0,25*	8,25 ± 0,37
Маса плода, г	2,46±0,06	2,38 ± 0,05
Маса плаценти, г	0,87±0,07	0,73 ± 0,03
Плодово-плацентарний індекс	0,35±0,03	0,31± 0,01
Краніокаудальний розмір, см	3,22±0,04	3,10 ± 0,07
Передімплантаційна летальність, %	22,2* (17–27)	2,8 (1 – 5)
Постімплантаційна летальність, %	9,7 (5–15)	4,4 (2 – 7)
Загальна ембріональна летальність, %	29,7 (10–35)	7,2 (5–12)

Примітка : * – відхилення вірогідне щодо інтактного контролю, $P < 0,050$.

Проведений зовнішній огляд плодів самиць, яким вводили КЕП показав, що в усіх ембріонів контрольної та дослідних груп були відсутні вади лицевого та мозкового черепа. Сам череп мав овально-подовжену форму. Вушна раковина та повіки очей були закриті. Передня черевна стінка зарощена, без ознак пупкової грижі. Хвіст звичайної довжини, відхідник спостерігався в усіх

плодів. Кінцівки мали добре розвинуте плече, передпліччя, кисть, стегно, гомілку та стопу. Положення, форма кінцівок, кількість пальців і їх розмір були звичайні. На шкірі плями порушеної пігментації були відсутні.

При дослідженні внутрішніх органів було виявлено наступні ознаки. На першому розрізі, який був проведений безпосередньо за вібрисами, перпендикулярно до нижньої щелепи внутрішні органи представлено переднім відділом твердого піднебіння, нижньої щелепи, носової перегородки, хоан. У всіх переглянутих ембріонів нижня і верхня щелепа не мали патологій, язик вільно містився у роті. Тверде піднебіння без ознак розщеплення, носова перегородка не скривлена (рис. 4.18).

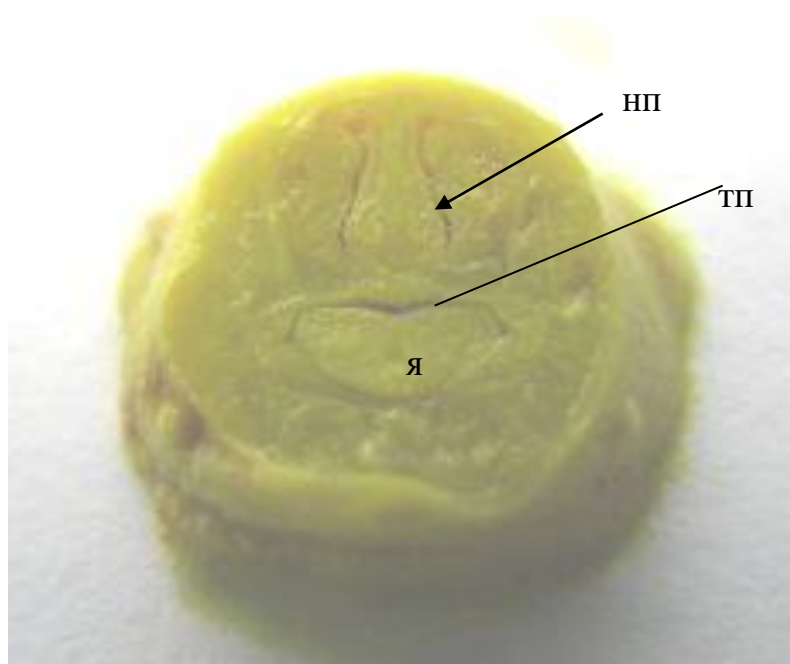


Рис. 4.18. Перший розріз голови плода з приплоду самиці, яка отримувала КЕП під час вагітності. Носові перегородки (нп), передній відділ твердого піднебіння (тп), язик (я) не змінені. Фіксування у розчині Буена.

При другому розрізі візуалізувалися середини очних яблук і орбіт, нюхові цибулини головного мозку, які розташовані в лобовій частині головного мозку, великі, мали довгасту овальну форму. Очні орбіти та яблука – парні, розташовані на одному рівні, без патології (рис. 4.19).

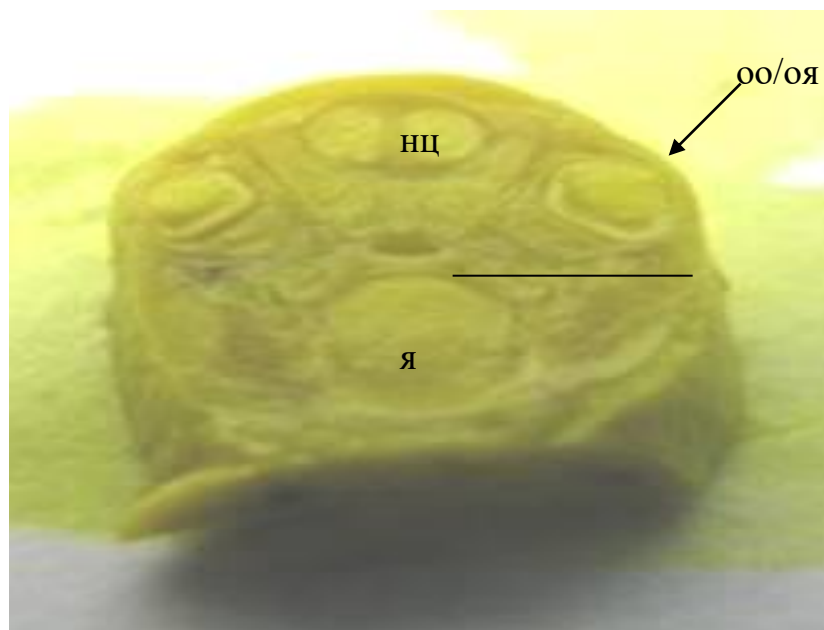


Рис. 4.19. Другий розріз голови плода з приплоду самиці, яка отримувала КЕП під час вагітності. Очні орбіти, очні яблука (оо/оя), передній відділ твердого піднебіння (тп), язик (я), нюхові цибулини (нц) без ушкоджень. Фіксування у розчині Буена.

Третім розрізом позначено поперечний діаметр головного мозку (перед вухами), четвертий розріз, проведений паралельно третьому, але за вухами разом з третім дозволили дослідити розвиток головного мозку. У всіх ембріонів відділи головного мозку були розвинуті пропорційно. На розрізах простежувалися півкулі, таламус (проміжний мозок), мозочок, бічні, третій і четвертий шлуночки головного мозку. Бічні шлуночки головного мозку мали вигляд вузької щілини. Третій шлуночок на розрізі невеликий, краплевидної форми. Четвертий шлуночок сплющеної форми. Субдуральний простір у всіх оглянутих плодів у межах норми (рис. 4.20, а – б).

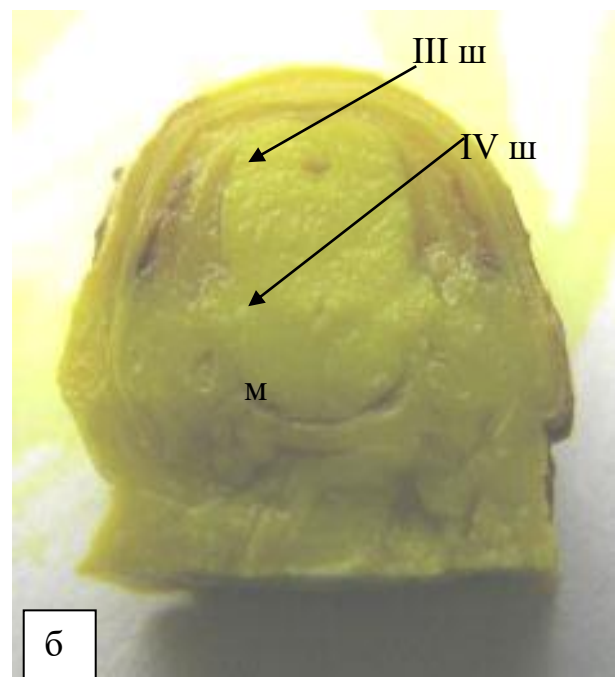
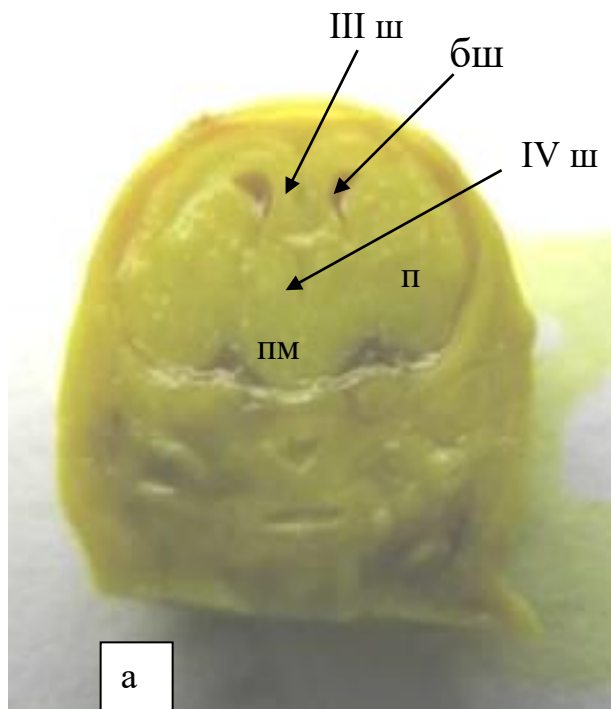


Рисунок 4.20. Третій (а) та четвертий (б) розрізи голови плода з приплоду самиці, яка отримувала кріоекстракт плаценти під час вагітності. Півкулі (п) головного мозку, проміжний мозок (пм), мозочок (м), бічні (бш), III-й (III ш) та IV-й (IV ш) шлуночки у нормальному стані. Фіксування у розчині Буена.

Дослідження плодів при проведенні п'ятого розрізу крізь гортань, стравохід, спинний мозок, великі кровоносні судини і слинні залози, довело, що вище вказані утворення були звичайної топографії, без видимої патології. Підпавутинний простір – у нормі, діаметр кровоносних судин – приблизно однаковий у всіх ембріонів. Після виконання розрізу над верхніми кінцівками просліджували незмінений стан стравоходу, трахеї, кровоносних судин, спинного мозку. Стравохід по всій довжині був вільний, без ознак стенозу. Кільця трахеї добре розвинуті, звичайної топографії (рис. 4.21).

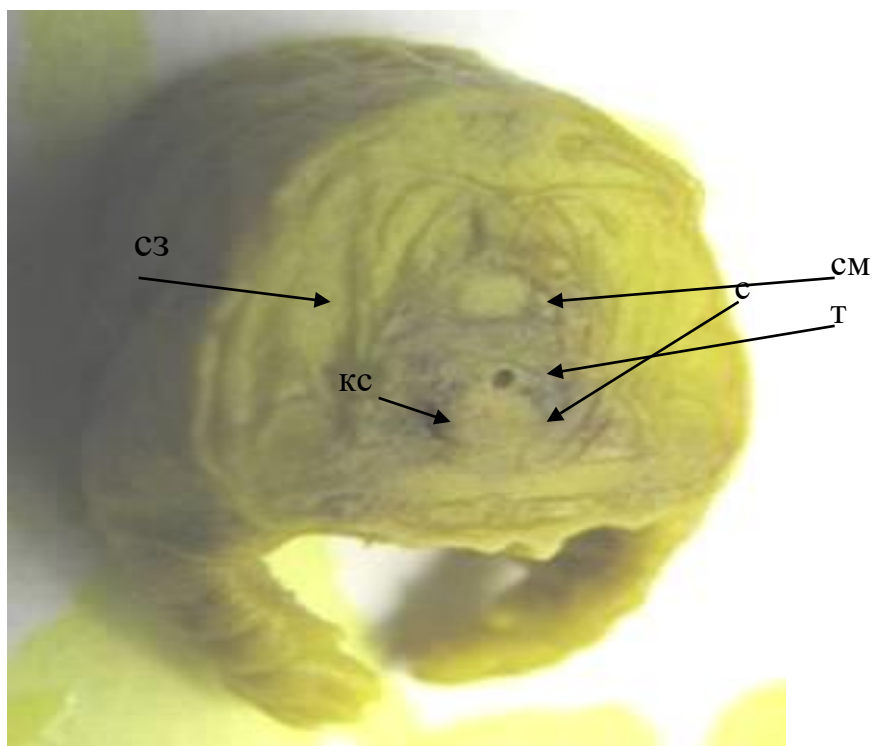


Рисунок 4.21. Шостий розріз плода (тулуб) з приплоду самиці, яка отримувала кріоекстракт плаценти під час вагітності: стравохід (с), трахея (т), слинні залози (сз), спинний мозок (см), кровоносні судини (кс) без ушкоджень. Фіксування у розчині Буена.

На цьому розрізі, що проводили під верхніми кінцівками, чітко було видно органи грудної порожнини: чотирьохкамерне серце з правим і лівим шлуночками та вушками, права легень, що складалася з чотирьох часток і однодольна ліва легень. Тканина легень мала добре виражену комірчасту структуру, розвинуті бронхи. На цьому ж розрізі візуалізувалися частини стравоходу і спинного мозку. Всі органи були звичайної топографії, розмірів і стану (рис. 4.22).

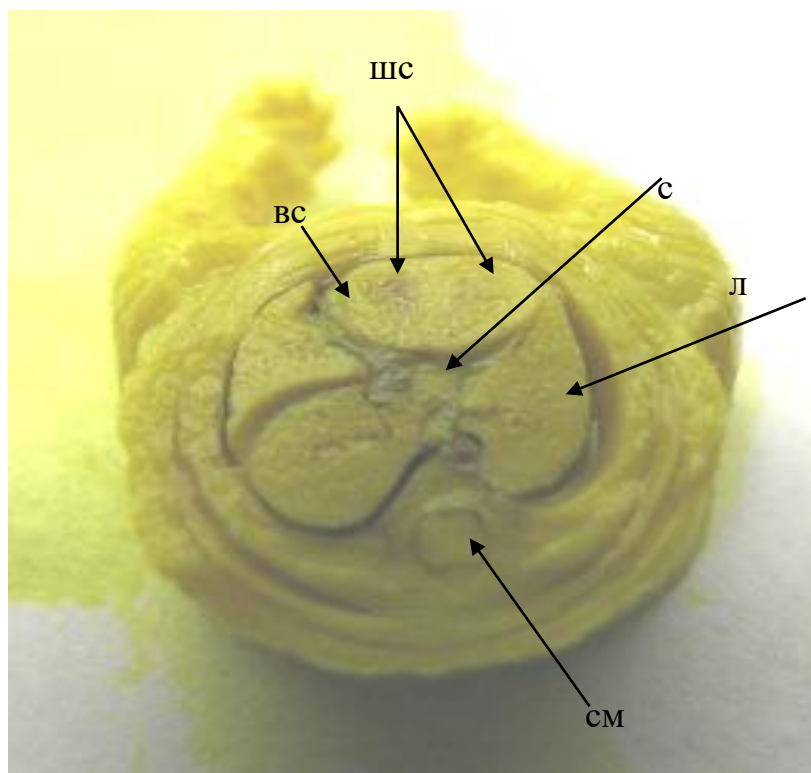


Рис. 4.22. Сьомий розріз плода (тулуб) з приплоду самиці, яка отримувала кріоекстракт плаценти під час вагітності: стравохід (с), шлуночки (шс) та вушко (вс) серця, легені (л), спинний мозок (см) без патології. Фіксування у розчині Буена.

При наступному (восьмому) розрізі визначено, що печінка складалася із шести часток, була звичайної консистенції та кольору. Після огляду печінки та її видалення візуалізувалася діафрагма. Діафрагмальна перегородка мала трохи увігнуту форму, її цілісність не була порушена. Подовження дослідження спинного мозку дозволило зробити висновок про його фізіологічну будову, що відповідало досліджуваному періоду онтогенеза (рис. 4.23).

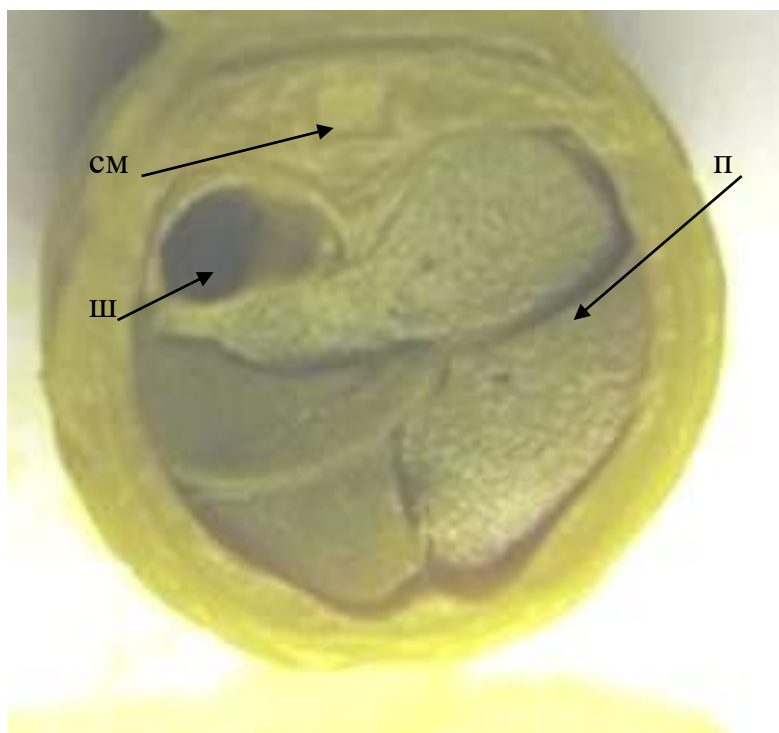


Рис. 4.23. Восьмий розріз плода (тулуб) з приплоду самиці, яка отримувала КЕП під час вагітності. Печінка (п), шлунок (ш), спинний мозок (см) у нормальному стані. Фіксування у розчині Буена.

Дослідження будови органів черевної порожнини і малого таза шляхом томії у частини ембріонів нижче пупочного кільця, у частини – уздовж черевної порожнини і малого таза виявило наступну картину. На поперечних і поздовжніх розрізах органи черевної порожнини були розташовані ортотопічно, без видимих ознак вад розвитку і патології. Шлунок великий, на розрізі ніжноскладчастий. Підшлункова залоза компактна, у ній були добре помітні (поздовжній розріз) голова, тіло і хвіст. Селезінка звичайна, помірна за розміром. Після видалення переглянутих органів (для вивчення стану сечостатевої системи) виявлено парні, розташовані трохи асиметрично, нирки. На розрізі ниркова мисочка була без ознак гідронефрозу в переважній кількості спостережень. Наднирники парні, бобовидні, досить великі. Сечоводи протягом всієї довжини без стриктур. Сечовий міхур малий, однак, у невеликої частини плодів основної групи спостерігали збільшення розмірів сечового міхура. Пряма кишка була без видимої патології.

У самців чітко спостерігалися видні розвинуті парні тестикули з придатками, у самок – дворого матка і яєчники (розташовані за нирками), у одного ембріона на фоні введення КЕП не було можливості визначити стать через відсутність розвинутих статевих органів (рис. 4.24).

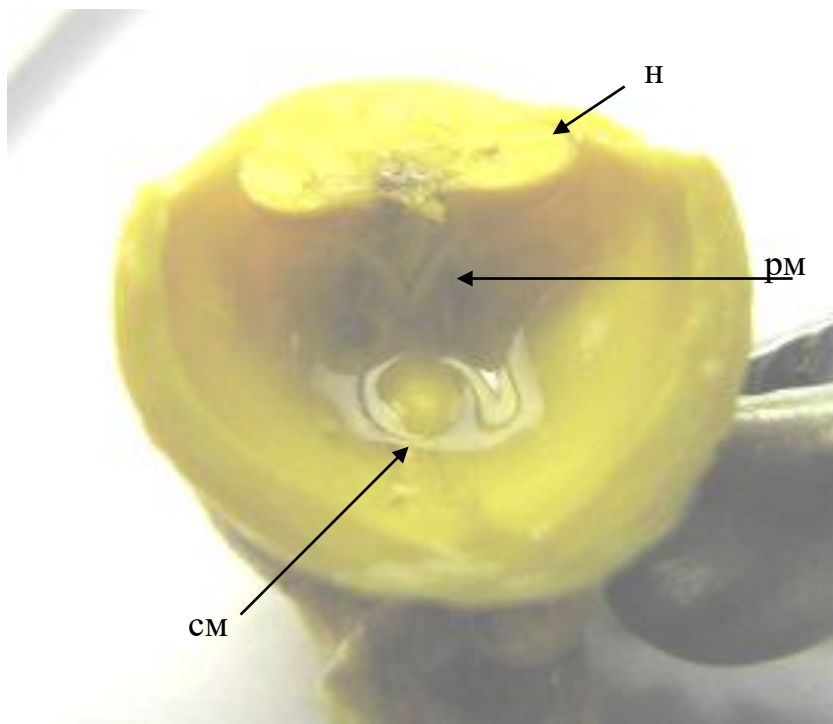


Рис. 4.24. Дев'ятий розріз плода (тулуб) жіночої статі з приплоду самиці, яка отримувала КЕП під час вагітності. Видні нирки (п) без ознак гідронефрозу, нормальні роги матки (рм) та сечовий міхур (см). Фіксування у розчині Буена.

Водночас, слід зазначити, що введення КЕП вагітним самицям, викликало у плодів вірогідне збільшення набряку підшкірної жирової клітковини (9,09 %), вірогідне збільшення крововиливів у підшкірну жирову клітковину (9,09 %), внутрішні органи (10,61 %), а саме у тканину печінки, черевину, плевральну порожнину (рис. 4.25–4.28).



Рис. 4.25. Плід з приплоду самиці, яка отримувала КЕП під час вагітності. Набряк підшкірної клітковини (стрілки). Фіксування у розчині Буена.

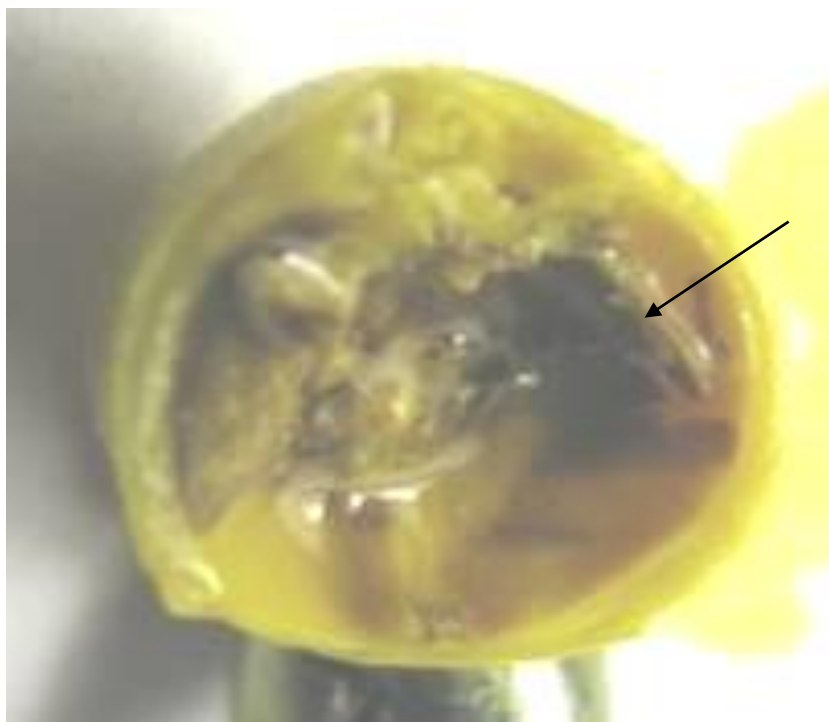


Рис. 4.26. Плід з приплоду самиці, яка отримувала КЕП під час вагітності. Крововилив у черевину (стрілка). Фіксування у речовині Буена.



Рис. 4.27. Плід з приплоду самиці, яка отримувала КЕП під час вагітності. Крововилив у печінку (стрілка). Фіксування у розчині Буена.

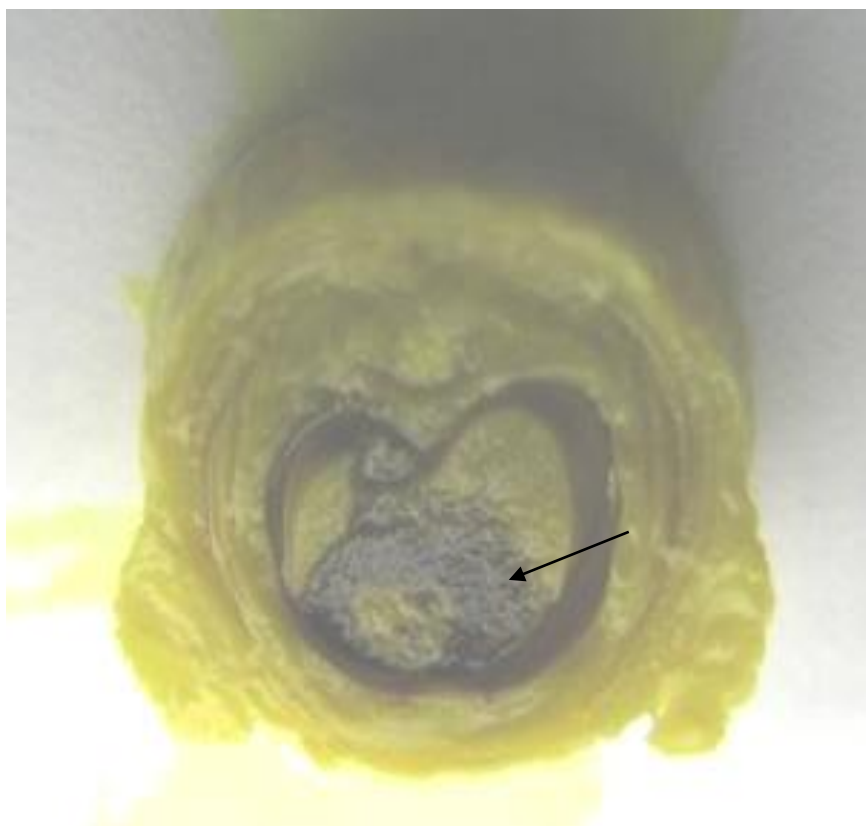


Рис. 4.28. Плід з приплоду самиці, яка отримувала КЕП під час вагітності. Крововилив у легені (стрілка). Фіксування у розчині Буена.

Результати дослідження стану внутрішніх органів ембріонів щурів, які в період вагітності отримували КЕП, а також співвідношення статі ембріонів, наведено у табл. 4.5.

Таблиця 4.5

Морфоанатомічні ознаки плодів самиць, які отримували кріоекстракт плаценти під час вагітності

Ознаки абсолютна кількість/%	Група тварин, які отримували КЕП	Інтактний контроль	Узагальнений контроль
Кількість оглянутих ембріонів	66	82	782
Гематоми підшкірні	6/9,09*	4/4,87	51/6,52
Набряк підшкірної клітковини	6/9,09*	0/0	16/2,05
Збільшення розмірів сечового міхура	1/1,52	2/2,44	21/2,69
Крововиливи у внутрішні органи	7/10,61*	0	6/0,77
Самці	30/45,45	38/46,34	388 /49,62
Самиці	36/54,54	44/53,66	394/50,38
Стать не виявлена	1/1,52	0	5/0,64

Примітка: * – відхилення вірогідне щодо інтактного контролю, $P < 0,005$.

Випадок аплазії внутрішніх статевих органів у плода основної дослідної групи (після введення вагітній самиці КЕП) згідно зі «Схемою оцінки виразності ембріотоксичної дії» [17] має спонтанний характер прояву.

У результаті дослідження кісткової системи ембріонів щурів у даній експериментальній серії визначено характер осифікацій черепа, кістяка, кінцівок, просторове розташування і форму кісток, кількість закладок у метакарпальних і метатарзальних кістках, кількість осифікацій у грудині, тазовому поясі, хребетному стовпі ембріонів на тлі введення КЕП (табл. 4.6).

Таблиця 4.6

Показники осифікації кістяка плодів від самиць, що отримували кріоекстракт плаценти під час вагітності

Ознаки, абсолютна кількість/%	Група тварин, які отримували КЕП	Інтактний контроль	Узагальнений контроль
Кількість оглянутих ембріонів	73	79	394
Зниження кількості кісткових закладок у п'ясті	8/10,96	6/7,60	32/8,12
Зниження кількості кісткових закладок у плеснах	7/9,58	6/7,59	34/8,57
Відсутність осифікацій у під'язичній кістці	7/9,58	7/8,86	31/7,86
Відсутність осифікацій у лобковій кістці	35/47,94*	23/29,11	152/38,57
Затримка осифікацій у лобковій кістці	10/13,70*	5/6,32	13/3,30
Затримка осифікацій у потиличній кістці	15/20,54*	9/11,39	35/8,88
Відсутність осифікацій у потиличній кістці	7/9,58*	4/5,06	23/5,83
Затримка осифікацій у міжтім'яній кістці	8/10,96*	4/5,06	22/5,58
Відсутність осифікацій у міжтім'яній кістці	4/5,47*	8/10,12	4/0,09
Затримка осифікацій у тім'яній кістці	9/12,33*	2/2,53	16/4,06
Затримка осифікацій у сідничній кістці	3/4,11*	1/1,27	9/2,28
Відсутність осифікації у сідничній кістці	4/5,48*	2/2,53	26/6,65
Кількість центрів осифікації у грудині	2/2,74	2/2,53	10/2,54
Кількість центрів осифікації у поперековому відділі	13/17,81	14/17,72	70/17,76
Кількість центрів осифікації у крижовому відділі	7/9,59	9/11,39	38/9,64
14 рудиментне ребро	2/2,74	2/2,53	12/3,04
Збільшення розмірів тім'ячка	6/8,22	2/2,53	18/4,57

Примітка: * – статистична вірогідність в порівнянні з контролем при $p < 0,01$.

Як видно з табл. 4.6 та на рис. 4.29 – 4.33, введення КЕП самицям під час вагітності призвело до порушення процесів скостеніння у їх плодів. На відміну від контролю, у певної частин тіл плодів дослідної групи на тлі введення КЕП була помічена відсутність або затримка скостеніння у міжтім'яній, потиличній, лобовій,тім'яній кістках.



Рис. 4.29. Плід з приплоду самиці, яка отримувала КЕП. Відсутність осифікації у потиличній, міжтім'яній кістках (овал), затримка осифікації утім'яній кістці (стрілка). Тотальний просвітлений препарат. Фарбування червоним алізарином.

У хребті процес скостеніння добре простежувався в шийному (дуги хребців), грудному, поперековому та крижовому (дуги та тіла хребців) відділах. У деяких плодів цих груп спостереження були відсутні осередки осифікації у тілах або/і дугах хребців крижового відділу. На відміну від контролю, на фоні введення КЕП цей показник у дослідних плодів збільшувався та мав статистично значимий характер.

У тазовому поясі 20-денних плодів у нормі спостерігаються окремі осифіковані закладки клубової, сідничної та лобкової кісток. При тому, що те у

плодів контрольної групи осередок скостеніння в лобковій кістці доволі часто був відсутній, а у плодів дослідної групи (введення КЕП) такі випадки були частішими. Затримка процесу скостеніння зачіпала і сідничну кістку.

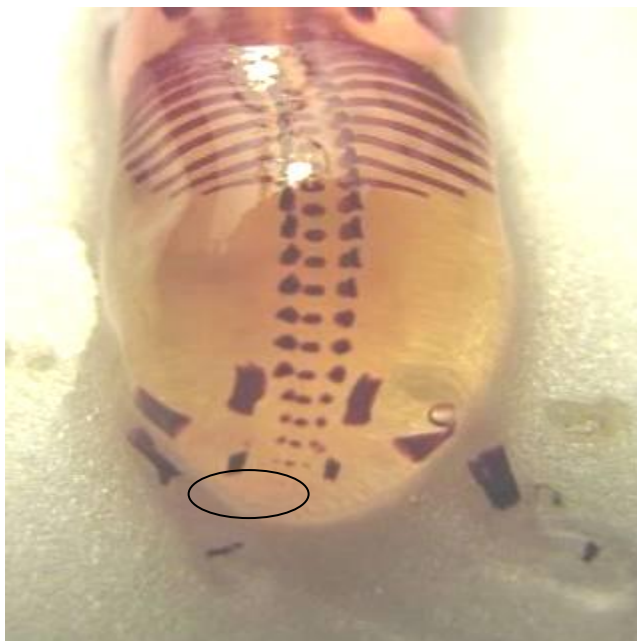


Рис. 4.30. Плід з приплоду самиці, яка отримувала КЕП. Відсутність осифікації у лобкових кістках (овал). Тотальний просвітлений препарат. Фарбування червоним алізаринном.

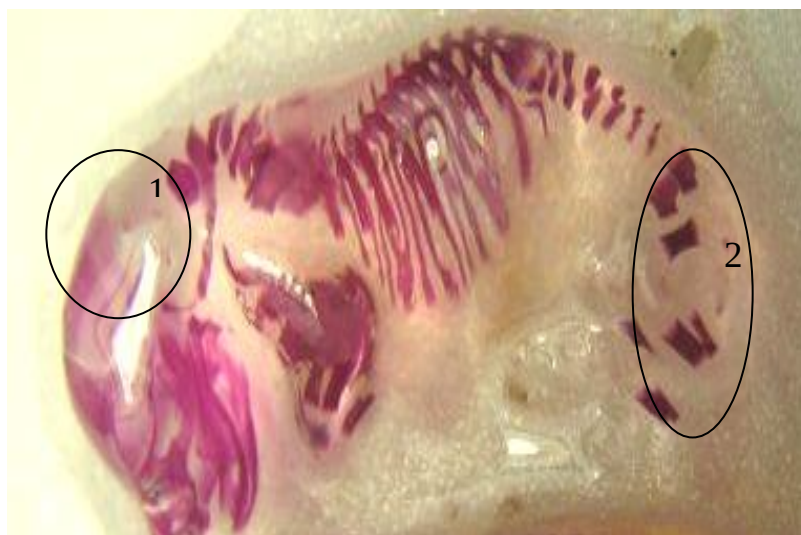


Рисунок 4.31. Плід з приплоду самиці, яка отримувала КЕП. Відсутність осифікації у тім'яній, потиличній, міжтім'яній кістках (овал 1), сідничній та лобковій кістках (овал 2). Тотальний просвітлений препарат. Фарбування червоним алізаринном.

Скелет верхніх та нижніх кінцівок у всіх плодів був без патологічних змін. У той же час кількість ядер осифікації в п'ясткових та плеснових кістках була вірогідно зменшена у частини плодів від самок, що отримували КЕП під час вагітності.

У грудині були знайдені ядра скостеніння в ручці та сегментах тіла. У деяких плодів обох груп ознаки скостеніння в цій кістці або були відсутні, або мали зменшену кількість ядер.

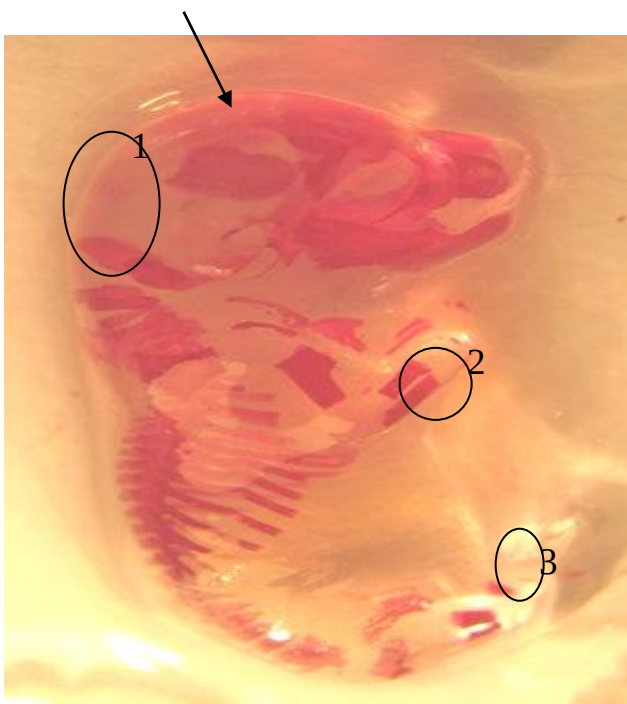


Рис. 4.32. Плід з приплоду самиці, яка отримувала КЕП. Відсутність осифікації у потиличній, міжтім'яній кістках (овал 1), п'ясті (овал 2), плесні (овал 3), затримка осифікації у тім'яній кістці (стрілка). Тотальний просвітлений препарат. Фарбування червоним алізарином.



Рис. 4.33. Плід з приплоду самиці, яка отримувала КЕП. Відсутність осифікації у потиличній, міжтім'яній кістках (овал 1), п'ясті (овал 2), сідничній та лобковій кістках (овал 3), затримка осифікації утім'яній кістці (стрілка). Тотальний просвітлений препарат. Фарбування червоним алізаринном.

Ребра у всіх дослідних плодів парні, кісткові стрічки праворуч та ліворуч були звичайної довжини, добре пофарбовані. Виняток складала 13-а пара ребер, в якій у ряді випадків у плодів дослідної групи спостерігали помітне скорочення одного чи обох ребер. Приблизно в однаковій кількості випадків у плодів різних груп спостерігали наявність додаткової пари ребер (14-ї) або її зародків.

Отже, аналіз стану нащадків у кінці антенатального періоду життя показав, що кріоекстракт плаценти, який вводили вагітним щурам з 6-ї по 16-у добу ембріогенезу, суттєво впливає на темпи скостеніння у цілій низці кісток черепа та скелета порівняно з плодами інтактного контролю. Хоча середні показники темпів скостеніння кісток в деяких випадках і були вищими за аналогічні показники узагальненого лабораторного контролю, в жодному випадку не перевищували максимальний їх рівень. Крім того, помічені зміни не зачіпали ділянок осифікації довгих трубчастих кісток, не порушували просторову орієнтацію кісток, тому можуть кваліфікуватися як неспецифічне уповільнення процесів остеогенезу.

Результати досліджень щодо визначення можливої ушкоджуючої дії внаслідок отримання самицями під час вагітності кріоконсервованих клітин або фрагментів плаценти в більшості спостережень співпадали, тому отримані дані представлено сумісно.

Аналіз репродуктивних показників, (табл. 4.7) в означених групах спостереження показав, що, введення КФП і ККП вагітним самицям призводить до помірної стимуляції овуляції з наступним збільшенням кількості запліднень, зниження перед-, постімплантаційної і, як результат – загальної летальності. Кількість і маса живих плодів була декілька збільшена при збереженому плодово-плацентарному індексі. Означені позитивні зміни в фертилізації та репродуктивних показниках статистично знаходилися в межах тенденції. Водночас достовірно визначено відсутність ембріотоксичної і, відповідно, ембріолетальної дії застосування КФП і ККП.

Результати морфоанатомічного дослідження стану внутрішніх органів ембріонів щурів на тлі імплантації вагітним самицям КФП та суспензії ККП, а також співвідношення статей ембріонів наведені у табл. 4.8.

Серією послідовних поперечних розрізів плодів самиць, яким вводили КФП або ККП під час вагітності в краніокаудальному напрямку, виявлено сформовані тверде піднебіння, верхня і нижня щелепи, носову перегородку, хоани. Нижче візуалізувалися парні структури головного мозку, очні яблука і орбіти, які розташовувалися симетрично, мали округлу форму. Далі спостерігалися пропорційно розвинуті півкулі головного мозку, таламус (проміжний мозок), мозочок, бічні, третій і четвертий шлуночки головного мозку. Шлуночки мали характерні форми, субдуральний простір – вільний. Далі в каудальному напрямку, на розрізі – слинні залози, гортань, стравохід, спинний мозок і великі кровоносні судини були звичайної топографії, без видимої патології. Підпавутинний простір у нормі, діаметр кровоносних судин приблизно однаковий у всіх ембріонів. Наступний розріз дозволив констатувати

правильний розвиток нижнього відділу стравоходу без ознак стенозу, а також кровоносних судин, спинного мозку, трахеї з розвинутими кільцями.

Таблиця 4.7

Репродуктивні показники самиць, що отримували КФП і ККП під час вагітності

Показники	ККП	КФП	Контроль
Кількість вагітних самиць	12	12	18
Кількість жовтих тіл на одну самицю	9,05±0,37	11,05±0,58	8,88 ± 0,79
Кількість місць імплантації	8,6±4	9,58±0,80	8,63 ± 0,68
Кількість місць резорбції	0,51±0,33	0,42±0,19	0,38 ± 0,16
Кількість живих плодів	8,1±0,83	10,17±0,94	8,25 ± 0,67
Маса плода, г	2,46±0,07	2,43±0,05	2,38 ± 0,05
Маса плаценти, г	0,71±0,03	0,70±0,04	0,73 ± 0,03
Плодово-плацентарний індекс	0,29±0,05	0,28±0,01	0,31± 0,01
Краніокаудальний розмір, см	3,20±0,04	3,18±0,05	3,10 ± 0,07
Передімплантаційна летальність, %	4,9 (2–8)	4,1 (2–8)	2,8 (1 – 5)
Постімплантаційна летальність, %	5,9 (5–7)	4,0 (2 – 7)	4,4 (2 – 7)
Загальна ембріональна летальність, %	10,5 (8–12)	7,9 (5–12)	7,2 (5–12)

Примітка: * – відхилення вірогідне щодо інтактного контролю, $p < 0,05$.

На наступному розрізі, під верхніми кінцівками, визначали стан органів грудної порожнини: чотирьохкамерне серце з правим і лівим шлуночками та правим і лівим вушками, легені з вираженою комірчастою структурою,

розвинуті бронхи. У грудній порожнині органи були звичайних розмірів і топографії.

Таблиця 4.8

Морфоанатомічні ознаки плодів від самиць, які отримували кріоконсервовані фрагменти і клітини плаценти під час вагітності

Ознаки, абсолютна кількість/%	Тварини, яким імплантували КФП	Тварин, яким вводили КПК	Інтактний контроль	Узагальнений контроль
Кількість оглянутих ембріонів	46	53	30	782
Гематоми підшкірні	1 / 2,17	1 / 1,89	1 / 3,33	51 / 6,52
Набряк підшкірної клітковини	3 / 6,52*	0	0	49 / 6,29
Збільшення розмірів сечового міхура	1 / 2,17*	0	0	21 / 2,68
Крововиливи у внутрішні органи	1 / 2,17*	1 / 1,89*	1 / 3,33	6 / 0,76
Самці	25 / 54,34	25 / 47,17	19 / 63,33	388 / 49,62
Самиці	21 / 45,65	28 / 52,83	11 / 36,67	394 / 50,38

Примітка:* відхилення вірогідне щодо інтактного контролю, при $p < 0,005$.

При розтині грудної і черевної порожнин і огляді розташованих у них органах, на відміну від даних попередніх досліджень, набряків, крововиливів чи гематом не спостерігалось.

Печінка складалася із шести часток, була звичайної консистенції і кольору. Діафрагмальна перегородка мала трохи увігнуту форму, без грижових отворів.

На подальших поперечних і на поздовжніх розрізах органи черевної порожнини малого таза (шлунок, підшлункова залоза, селезінка, нирки, наднирники, сечоводи, сечовий міхур і пряма кишка) були звичайної топографії,

розмірів структури і кольору, без стигм, вад чи іншої видимої патології. Оглядали сечостатеву систему. У самців були чітко видні розвинуті парні тестикули з придатками, у самок – дворога матка і яєчники.

Встановлено, що імплантація КФП вагітним самицям викликає вірогідне збільшення набряків підшкірної клітковини (6,52%) відносно інтактного контролю, проте він співпадав з відсотом випадків набряків підшкірної клітковини в спостереженнях узагальненого контролю. Крововиливи у внутрішні органи спостерігалися достовірно в меншому відсотку досліджень, як відносно інтактного контролю, так і відносно узагальненого (табл. 4.8). У цілому результати морфоанатомічного дослідження внутрішніх органів ембріонів щурів цієї групи показали відсутність у них специфічних аномалій чи ознак патології.

У групі тварин, яким вводили суспензію ККП усі вищезазначені показники знаходились у межах фізіологічної норми.

Процеси осифікації кісткової системи у внутрішньоутробному періоді є досить чутливими, і в даному форматі дослідження ми спостерігали таке структуроутворення, просторове розташування і форму черепа, кістяка, кінцівок, що відповідали онтогенетичній фазі розвитку плодів (рис. 4.34).

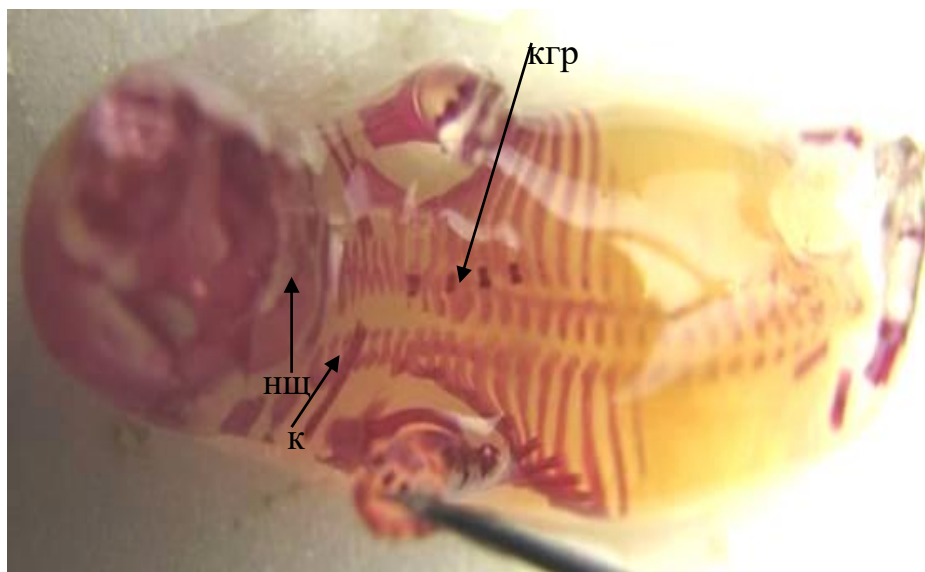


Рис. 4.34. Скелетна система плода самиці щура, якій під час вагітності вводили ККП. Позначено: нижня щелепа (нщ), ключиця (к), осередки осифікації

у груднині (кгр). Тотальний просвітлений препарат. Фарбування червоним алізарином.

Як видно на рис. 4.34, 4.35 процес скостеніння у плодів самиць цих груп простежувався у всіх тестованих кістках. Нижня щелепа, носова, лобова, тім'яна, міжтім'яна, потилична, верхньощелепна кістки, вилиця були звичайного розміру, добре пофарбовані. Під'язикова кістка замала, скронева та вилицева – дещо більші. У невеликої частини плодів цієї групи самиць, що отримували під час вагтності ККП, спостерігали відсутність під'язикової кістки та зменшення розмірів і ступеня пофарбування міжтім'яної та потиличної кісток. Але відмінності в визначенні цих ознак були недостовірними.

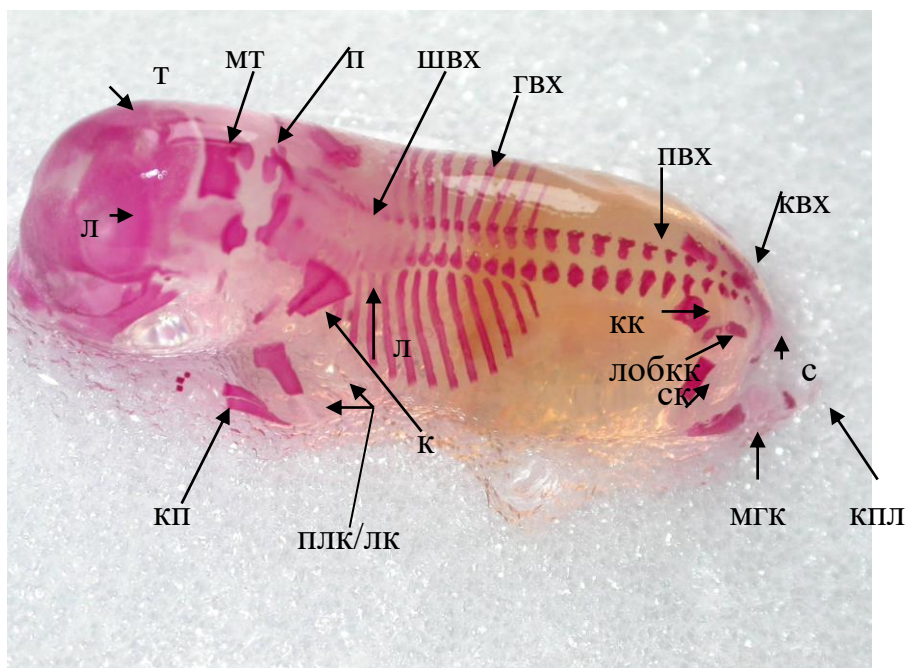


Рис. 4.35. Скелетна система плода самиці, що отримувала КФП під час вагітності: лобова (л), тім'яна (т), міжтім'яна (мт), потилична (п) кістки; лопатка (л), ключиця (к), плечова та локтева (плк/лк) кістки, п'ясткові кістки (кп); клубова (кк), лобкова (лобкк), сіднична (с) кістки; стегнова (ск), малогомілкова (мгк), плеснові кістки (кпл); шийний (швх), грудний (гвх), поперековий (пвх) та крижаний (квх) відділи хребта. Тотальний просвітлений препарат. Фарбування червоним алізарином.

Динаміка визначених показників розвитку кісткової системи дозволяє зробити висновок про синхронність осифікації, що відбувалася.

Виявлено позитивний вплив КФП на розвиток кісткової системи плода (табл. 4.9) в вигляді достовірного зменшення затримки осифікацій у всіх досліджуваних сайтах відносно інтактного і узагальненого контролю. Достовірне зменшення відсотку зниження, затримки або відсутності ядер осифікації практично в усіх досліджуваних локусах відносно інтактного контролю інтерпретуються, як прояв позитивно стимулюючого впливу введення КФП на остеогенез.

Водночас, суперечливі дані отримано щодо збільшення розмірів тім'ячка: 8,34% у групі інтактних тварин проти 2,08% у дослідній групі і 3,59% за даними узагальненого контролю. У даному випадку виявленим показником суттєвого збільшення тім'ячка в інтактному контролі можна зневажити, оскільки дані узагальненого контролю отримані на значно більшій кількості спостережень і перш за все враховуються саме в таких випадках. У цілому цей показник співпадає з даними загальної тенденції синхронної активізації остеогенезу під впливом КФП.

Дані морфоанатомічного дослідження становлення кістяка плодів від самиць, яким вводили ККП під час вагітності представлено в табл. 4.10.

Таблиця 4.9

Показники осифікацій кістяка плодів шурів після імплантації КФП

Ознаки абсолютна кількість / %	Тварини, яким імплантували КФП	Інтактний контроль	Узагальнений контроль
Кількість оглянутих ембріонів	48	36	473
Зниження кількості кісткових закладок у п'ясті	1 / 2,08	2 / 5,56	18 / 3,8
Зниження кількості закладок у плеснах	1 / 2,08*	2 / 5,56	20 / 4,22
Відсутність осифікацій у під'язичній кістці	1 / 2,08*	5 / 13,89	23 / 4,86
Відсутність осифікацій у лобній кістці	9 / 18,75 *	11 / 30,55	102 / 21,56
Затримка осифікацій у лобній кістці	1 / 2,08*	2 / 5,56	16 / 3,38
Затримка осифікацій у потиличний кістці	1 / 2,08 *	2 / 5,56	33 / 6,79
Відсутність осифікацій у потиличний кістці	0*	1 / 2,78	26 / 5,50
Затримка осифікацій у міжтім'яній кістці	1 / 2,08*	1 / 2,78	26 / 5,50
Відсутність осифікацій у міжтім'яній кістці	0	0	1 / 0,21
Затримка осифікацій у тім'яній кістці	1 / 2,08*	3 / 8,33	18 / 3,81
Затримка осифікацій у сідничній кістці	1 / 2,08*	0	11 / 2,33
Відсутність осифікацій у сідничній кістці	0*	1 / 2,78	30 / 6,34
Кількість центрів осифікації у грудині	2 / 4,17*	1 / 2,78	12 / 2,54
Кількість центрів осифікації у поперековому відділі	9 / 18,75*	5 / 13,89	85 / 17,97
Кількість центрів осифікації у крижовому відділі	6 / 12,50*	3 / 8,34	46 / 9,73
14 рудиментне ребро	1 / 2,08	1 / 2,78	1 / 0,21
Збільшення розмірів	1 / 2,08*	3 / 8,34	17 / 3,59

Примітка: * – відхилення вірогідне щодо інтактного контролю, $p < 0,002$.

Таблиця 4.10

Показники осифікацій кістяка плодів щурів яким вводили ККП під час вагітності

Ознаки, абсолютні показники / %	Тварини, яким вводили ККП	Інтактний контроль	Узагальнений контроль
Кількість оглянутих ембріонів	57	36	400
Зниження кількості кісткових закладок у п'ясті	2 / 3,51	2 / 5,56	16/ 4,0
Зниження кількості кісткових закладок у плеснах	1 / 1,75*	2 / 5,56	17/ 4,25
Відсутність осифікацій у під'язичній кістці	2 / 3,51*	5 / 13,89	20/5,0
Відсутність осифікацій у лобній кістці	19 / 33,3	11 / 30,55	83/ 20,75
Затримка осифікацій у лобній кістці	2 / 3,51	2 / 5,56	16/ 4,0
Затримка осифікацій у потиличній кістці	2/3,51 *	2 / 5,56	27/ 6,75
Відсутність осифікацій у потиличній кістці	1 / 1,75	1 / 2,78	23 / 5,84
Затримка осифікацій у міжтім'яній кістці	1 / 1,75	1 / 2,78	22 /5,58
Відсутність осифікацій у міжтім'яній кістці	0/0	0/0	1 /0,25
Затримка осифікацій у тім'яній кістці	4/ 7,01	3 / 8,33	16 / 4,0
Затримка осифікацій у сідничній кістці	1/ 1,75	0	9 / 2,28
Відсутність осифікацій у сідничній кістці	0/0*	1 / 2,78	26 / 6,60
Кількість центрів осифікації у грудині	3/ 5,26*	1 / 2,78	10 /2,54
Кількість центрів осифікації у поперековому відділі	10 / 17,54	5 / 13,89	70 / 17,77
Кількість центрів осифікації у крижовому відділі	6 / 10,53	3 / 8,34	38 / 9,65
14 рудиментне ребро	1 / 1,75	1 / 2,78	12 / 3,05
Збільшення розмірів тім'ячка	16 /28,07*	3 / 8,34	18 /4,57

Примітка: * – відхилення вірогідно щодо інтактного контролю, $p < 0,002$.

За даними табл. 4.10 дослідження закладок лицевого черепа плодів не виявило аномалій розвитку на тлі введення самицям ККП під час вагітності.

У всіх тварин були добре розвинуті нижня та верхня щелепи, носові перегородки та очні орбіти. Кісткові закладки в лобовій, виличній, ґратчастій кістках – добре помітні. Забарвлення кісткової тканини яскраве. Аналіз результатів дослідження кісток черепа показав, що відсоток затримок осифікації у потиличній і лобовій кістках був вірогідно нижчий за показники інтактної контрольної групи і узагальненого контролю.

При дослідженні хребетного стовпа не виявлено вірогідних порушень осифікації у плодів дослідної групи порівняно з контрольною інтактною. Довжина лівих і правих стрічок грудини була приблизно однакова. Кількість пар ребер – 13. Однак у незначної кількості плодів усіх дослідних груп виявлено 14-е рудиментне ребро у вигляді крапки чи невеликої лінії з однієї або обох сторін хребта. У шийному відділі осифіковані лише дуги хребців. У грудному, поперековому та крижовому відділах закладки осифікації знайдені як у дугах, так і в тілах хребців. У тазовому поясі ядра осифікації відзначені в трьох окремих кістках: клубовій, сідничній і лобковій. У плодів усіх груп вони відокремлені одна від одної. Найбільш осифікована клубова кістка. У двох інших тазових кістках процес осифікації відбувався повільніше. Результати дослідження показали, що у плодів як дослідних, так і контрольної інтактної групи найменше осифікована лобкова кістка.

Дослідження кісток верхніх і нижніх кінцівок ембріонів не виявило аномалій розвитку. Плечовий пояс осифікований чітко. У ключиці осифіковано лише тіло. Кістки плеча, передпліччя, стегна і гомілки мали виражений характер осифікації діафізів і епіфізів. Ядра осифікації знайдені у 2–4-й п'ястковій та плесневій кістках.

Як видно з табл. 4.10, у плодів дослідної групи (під впливом введення ККП) зареєстровані достовірне поліпшення процесів осифікації і збільшення кісткових закладок. При цьому процес осифікації відбувався синхронно.

Таким чином, була відмічена тенденція до збільшення місць резорбції, передімплантаційної, постімплантаційної, загальної ембріональної летальності та достовірне зменшення кількості живих плодів у вагітних самок на тлі введення кріоекстракту плаценти. Водночас введення КЕП вагітним щурам не викликає специфічних аномалій стану внутрішніх органів та скелету їх плодів, які можна було б вважати проявом тератогенної дії. Проте, під впливом КЕП пригнічується розвиток кісткових закладок різних кісток черепа, скелета плодів, збільшується чисельність випадків крововиливів у внутрішні органи та набряків підшкірної клітковини. Проведені дослідження дозволили встановити відсутність ембріолетальної дії кріоконсервованих фрагментів плаценти та суспензії плацентарних клітин. Введення КФП і ККП дозволило знизити показники передімплантаційної, загальної ембріональної летальності, та достовірно встановити відсутність їх ембріолетальної дії. Введення ККП або КФП вагітним самицям щурів у період закладки, розвитку, диференціювання та активного росту скелета та внутрішніх органів плодів не індукувало фенотипічних порушень та специфічних скелетних аномалій, які б свідчили про тератогенну дію препарату. Встановлено позитивний вплив на поліпшення процесів осифікації у плодів на тлі застосування вищезазначених препаратів.

Отримані дані можуть бути інтерпретовані кореляцією вмісту біологічно активних плацентарних сполук в організмі реципієнта після введення КБПП у динаміці. Значна концентрація плацентарних речовин у першу добу після введення КЕП з наступним різким її зниженням порушує процеси гістогенезу, а поступове і тривале їх надходження при введенні КФП або ККП потенціює структуроутворення клітин, органів та їх відновлення.

Наведені в цьому розділі результати були опубліковані в наступних роботах:

Прокопюк В.Ю. Глава 5. Верификация биобезопасности и сохранности криоконсервированных плацентарных биообъектов. Плацента:

криоконсервирование, структура, свойства, перспективы клинического применения / Прокопюк В.Ю., Прокопюк О.С., Чижевский В.В., Волина В.В. / Под. ред. В.И. Грищенко, Т.Н. Юрченко. – Харьков: СПД ФЛ Бровин А.В., 2011. – С. 207–245.

Строна В.И. Изучение влияния экстракта плаценты и нейроткани на мембранометаболическую функцию митохондрий и микросом из печени крыс в системе *in vivo* / В.И. Строна, Т.Н. Юрченко, В.В. Рязанцев, В.И. Шепитько, О.С. Прокопюк, А.И. Гордиенко // Проблемы криобиологии. – 2002. – № 4. – С. 24–29.

Грищенко В.И. Клеточная терапия: фундаментальные и клинические аспекты / В.И. Грищенко, О.С. Прокопюк, Т.Н. Юрченко // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2005. – № 3. – С. 41–42.

Грищенко В.И. Фундаментальные и клинические аспекты клеточной терапии / В.И. Грищенко, О.С. Прокопюк, Т.Н. Юрченко, Н.Г. Грищенко // Доктор. – 2004. – № 4. – С. 5–8.

Прокопюк О.С. Дослідження можливої ембріолетальної та тератогенної дії криоконсервованих біоб'єктів плацентарного походження / О.С. Прокопюк // Світ медицини та біології. – 2007. – № 1. – С. 56–60.

Прокопюк О.С. Верифікація впливу плацентарних біоб'єктів на клітинну культуру *BHK-21 clone 13/04* / О.С. Прокопюк // Трансплантологія. – 2007. – Т. 9, № 1. – С. 231–234.

Також результати доповідалися на VI-th Meeting of the European Placenta Group, 1995; 34-th Annual Meeting of Society for Cryobiology “Cryo’97”; 2nd World Congress on Tissue Banking and 8th International Conference of EATB, 1999; 44-th Annual Meeting of the Society for Cryobiology “Cryo 2007”; Науковій конференції з міжнародною участю «Актуальные проблемы криобиологии и криомедицины», 2012.

РОЗДІЛ 5

ВПЛИВ КРІОКОНСЕРВОВАНИХ ФРАГМЕНТІВ ПЛАЦЕНТИ НА ОРГАНІЗМ ТВАРИН ПІЗНЬОГО ОНТОГЕНЕЗУ

Однією з найбільш актуальних демографічних проблем сучасності стало старіння населення – збільшення в його складі абсолютної і відносної кількості людей похилого віку. Сучасна демографічна ситуація характеризується суттєвим збільшенням частки населення старшого віку. Водночас спостерігається стійка тенденція до активного образу життя цієї вікової групи, що пов'язано з тривалими фізичним навантаженням, творчою активністю, визначенням репродуктивних прогнозів. Природне бажання похилих людей продовжити активне фізичне, творче життя, сексуальну і репродуктивну функції, а також зменшити тяжкість хвороб, пов'язаних із віком, зумовлює розвиток медичних технологій у геріатрії. Існуючі профілактично-терапевтичні програми корекції геріатричної патології є мультикомпонентними, їхня фармакологічна складова представлена багатьма класами лікарських препаратів, застосування яких призводить до ускладнень від фармакологічної агресії [2, 26, 54, 190]. Водночас недостатня ефективність існуючих геропротекторів ініціює активний пошук природних комплексних біорегуляторів для відновлення порушених з віком функцій організму.

Враховуючи специфічні властивості плаценти для використання її в якості об'єкта клітинно-тканинної терапії можна ефективно купірувати патогенетичні механізми старіння і пов'язаний з ним широкий спектр нозологічних форм. Питанням вивчення і застосування препаратів фетоплацентарного комплексу в геронтології присвячено поодинокі роботи, в яких не повністю розкрита дана проблема [23, 69, 213].

Відповідно до концепції дисертаційної роботи наступним етапом дослідження було визначення механізмів саногенезу та ефективності корекції інволютивних процесів у похилому віці з використанням КБПП. Керуючись попередніми висновками, ми вважали оптимальним використання КФП 36–38 тижнів гестації у програмі корекції геріатричних проявів. Обґрунтуванням цього вибору є доведені структурна збереженість, висока функціональна активність КФП, повільна динаміка їх біологічного впливу при відсутності негативно-пошкоджуючої дії на біосистеми організму.

5.1. Вплив кріоконсервованих фрагментів плаценти на організм самців пізнього онтогенезу

5.1.1. Загальна характеристика тварин.

Експериментальні тварини – щури групи 3 спостереження (основної), яким було імплантовано КФП, були в періоді пізнього онтогенезу, мали середню вагу $359 \pm 18,4$ г, активну поведінку, щільний шерстяний покрив, не мали жодних видимих ознак хвороб (абсцеси, пухлини, виразки).

Щури пізнього онтогенезу групи 4 (група порівняння без застосування КФП) мали середню вагу $367 \pm 20,3$ г, менш активні (малорухливі), шерстяний покрив у деяких тварин з дефектами, ознаки хвороб – відсутні.

Молоді щури групи 5 (контрольної) мали середню вагу $253 \pm 11,7$ г, активну поведінку, щільний шерстяний покрив, відсутні жодні видимі ознаки хвороб (абсцеси, пухлини, виразки).

5.1.2. Стан серцево-судинної системи експериментальних тварин у групах спостереження.

Мікроскопічна картина міокарда молодих самців (група 5) виявилася однорідною у всіх тварин. Кардіоміоцити були однакової величини, з помірно виявленою поперечною смугастістю, м'язові волокна стиковувалися

вставочними дисками. Цитоплазма клітин еозинофільна, ядра мали декілька витягнуту форму, переважно помірно базофільні, проте зустрічалися і великі гіперхромні ядра, інтерстиціальна тканина достатньо виражена. Судини міокарда помірно кровонаповнені. У мікроциркуляторному руслі ендотеліальна вистилка була представлена клітинами, розташованими в один ряд зі вставочними дисками (Рис. 5.1).

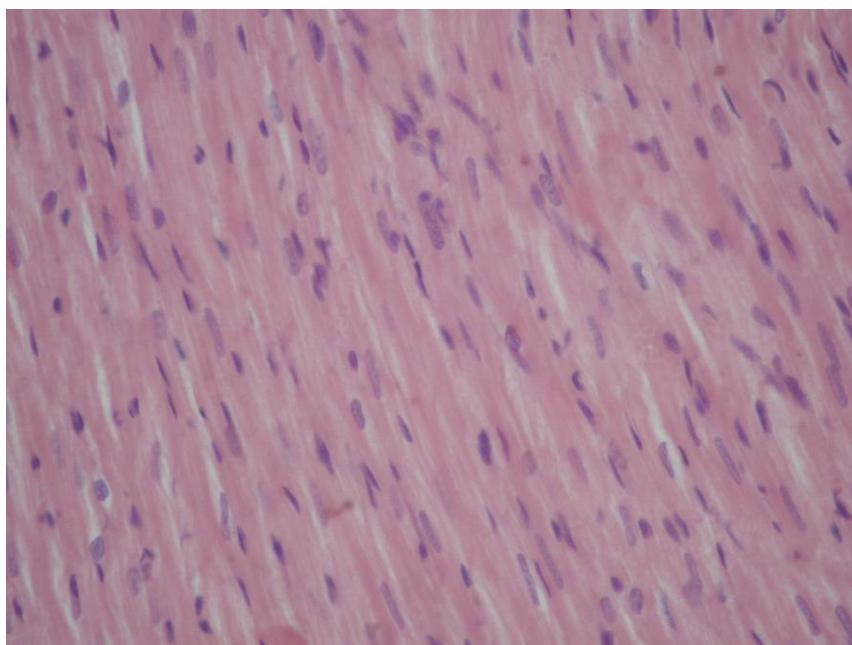


Рис. 5.1. Міокард молодого самця. Цитоплазма кардіоміоцитів еозинофільна; ядра помірно базофільні, рідше гіперхромні; достатньо виражена інтерстиціальна тканина. Зabarвлення гематоксилином і еозином, $\times 400$.

Відносні об'єми основних структурних компонентів міокарда (співвідношення частин сполучної тканини, судин міокарда, кардіоміоцитів) у тварин групи 5 відповідало фізіологічній нормі (табл. 5.1).

Таблиця 5.1

Відносні об'єми основних структурних компонентів міокарда самців (%)

Структурні компоненти	Молоді самці (група 5)	Старі самці (група 4)	Старі самці з імплантацією КФП (група 3)
Сполучна тканина	7,0±0,14	13,2±0,9*	9,4±0,09*
Судини	5,0±0,01	4,9±0,02	5,6±0,02*
Кардіоміоцити	88,0±3,0	81,9±2,0*	85,0±3,2

Примітка: * – вірогідність різниці групою 5, $p < 0,05$.

При реакції Браше в цитоплазмі кардіоміоцитів виявлено практично рівномірне накопичення РНК (група 5). Переважали клітини з помірно-позитивною реакцією Браше. У той же час виявлялися кардіоміоцити як з високим рівнем накопичення РНК, так і незначним вмістом РНК в їх цитоплазмі. При цьому інтенсивність реакції Фельгена-Россенбека на ДНП виявилася неоднорідною в різних ядрах. Дані щодо оптичної щільності РНК у цитоплазмі та ДНП у ядрах кардіоміоцитів представлена в табл. 5.2.

Таблиця 5.2

Оптична щільність РНП і ДНП у кардіоміоцитах міокарда самців (умовні одиниці)

Оптична щільність	Молоді самці (група 5)	Старі самці (група 4)	Старі самці з імплантацією КФП (група 3)
РНП в цитоплазмі	0,312±0,04	0,198±0,03*	0,299±0,07
ДНП в ядрі	0,131±0,02	0,173±0,02*	0,142±0,08

Примітка: * – вірогідність різниці з групою 5, $p < 0,05$.

За допомогою МКА до CD95 виявлена інтенсивність вираженості апоптозу в клітинах міокарда. Індекс апоптозу склав $3,8 \pm 0,6$ (табл. 5.3).

При імуногістохімічному дослідженні виявлено помірний рівень світіння ендотеліоцитів у препаратах, оброблених МКА до ендотеліну-1. Оптична щільність інтенсивності світіння ендотеліну-1 склала $0,222 \pm 0,08$ (табл. 5.3.).

Таблиця 5.3

Індекс апоптозу клітин міокарда і оптична щільність світіння ендотеліну-1 і колагену IV типу в судинах міокарда самців

Показник	Молоді самці (група 5)	Старі самці (група 4)	Старі самці імплантацією КФП (група 3)
Індекс апоптозу	$3,8 \pm 0,6$	$7,8 \pm 0,9^*$	$5,2 \pm 0,6^*$
Оптична щільність світіння ендотеліну – 1 (ум. од.)	$0,222 \pm 0,08$	$0,112 \pm 0,05^*$	$0,164 \pm 0,06^*$
Оптична щільність світіння колагену IV типу (ум. од.)	$0,487 \pm 0,03$	$0,598 \pm 0,09^*$	$0,503 \pm 0,07^*$

Примітка: * – вірогідність різниці з групою 5, $p < 0,05$.

Субендотеліальні базальні мембрани – тонкі, містили відповідну до віку кількість колагену IV типу (рис. 5.2.).

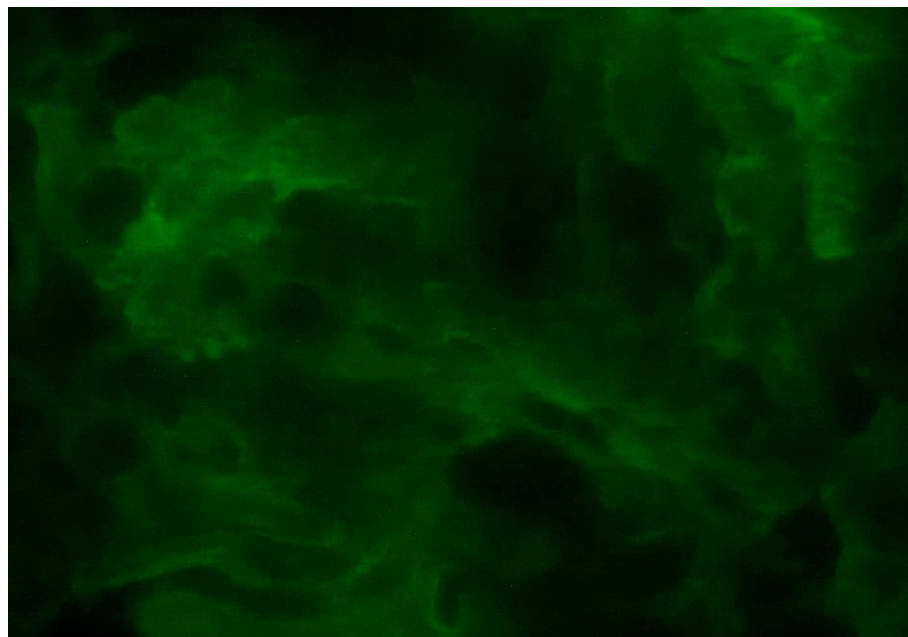


Рис. 5.2. Рівномірне світіння помірної інтенсивності в базальних мембранах судин міокарда молодого самця. Прямий метод Кунса з МКА до колагену IV типа, $\times 400$.

Отримані дані дослідження міокарда тварин даної експериментальної групи віддзеркалюють збереженість і активність його структур, що відповідають молодому віку і можуть слугувати порівнянням для результатів подальших досліджень тварин у пізньому онтогенезі.

Мікроскопічне дослідження міокарда самців пізнього онтогенезу (група 4) виявило відмінності у гістологічній картині. М'язові волокна мали нерівномірну величину, їх розташування було регулярним. Поперечна смугастість кардіоміоцитів виражена помірно, місцями дуже слабо. Цитоплазма клітин нерівномірно забарвлена еозином – переважали зони помірної еозинофілії, спостерігалися скупчення кардіоміоцитів зі слабо еозинофільною цитоплазмою. Ядра клітин подовженої форми, помірно базофільні.

Звертав увагу факт збільшення сполучнотканинного компонента. При цьому сполучна тканина розросталася як між кардіоміоцитами, так і периваскулярно (рис. 5.3). У більшості спостережень відзначався інтерстиціальний набряк.

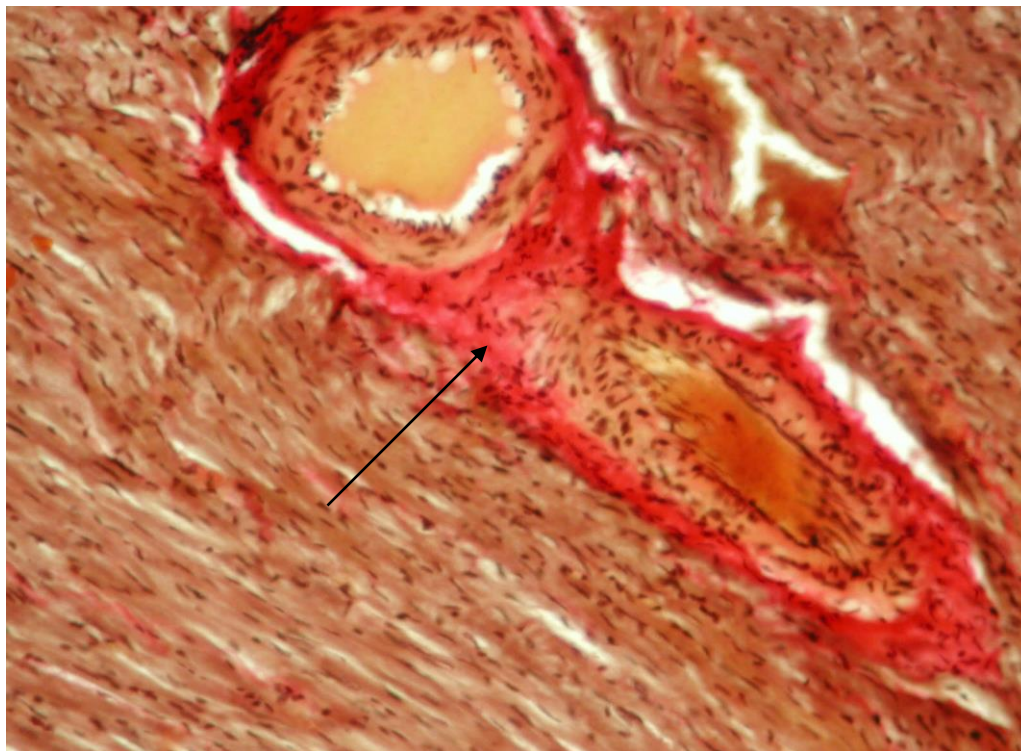


Рис. 5.3. Периваскулярний та інтерстиціальний склероз у міокарді старого самця. Забарвлення за Ван Гізона, $\times 100$, поздовжній зріз.

Відносний обсяг строми у тварин групи 4 достовірно перевищував показник групи 5 (див. табл. 5.1.). Відносний обсяг м'язових волокон був достовірно низьким.

Інтенсивність реакції Браше на РНП в цитоплазмі кардіоміоцитів виявилася нерівномірною і в середньому нижчою за таку в групі 5. Інтенсивність реакції Фельгена-Россенбека на ДНП була вищою за відповідний показник 5-ї групи. Динаміка показників оптичної щільності ДНП у ядрах і РНП у цитоплазмі кардіоміоцитів представлена в табл. 5.2 і свідчить про достовірні зміни вмісту нуклеопротейдів, що пояснюється їх віковими ушкодженнями – деструктуризацією з відповідним зниженням потенціалу передачі та реалізації тканинноспецифічної генетичної інформації в клітинах міокарда старих щурів.

Індекс апоптозу клітинних елементів міокарда достовірно перевищив подібний показник групи 5, що свідчить про високу активність процесів програмованої елімінації коронарних структур у похилому віці.

У судинному компоненті міокарда виявлені суттєві особливості, порівняно з групою 5. Відносний обсяг судинного компонента достовірно збільшився внаслідок потовщення та склерозування судинних стінок. У стінках судин виявлялось інтенсивне фуксинофільне фарбування. Судини були помірно кровонаповнені, ендотеліюцити розташовані в один ряд, місцями коронарні судини десквамовані. У препаратах, оброблених МКА до ендотеліну-1, виявлялося нерівномірне світіння (рис. 5.4).

Оптична щільність інтенсивності світіння ендотеліну-1 в порівнянні з тваринами групи 5 достовірно знижена (див. табл. 5.3.). Субендотеліальні базальні мембрани були нерівномірної товщини, вміст колагену IV типу в них достовірно перевищив показник групи 5 (за оптичною щільністю інтенсивності світіння колагену IV типу) (див. табл. 5.3).

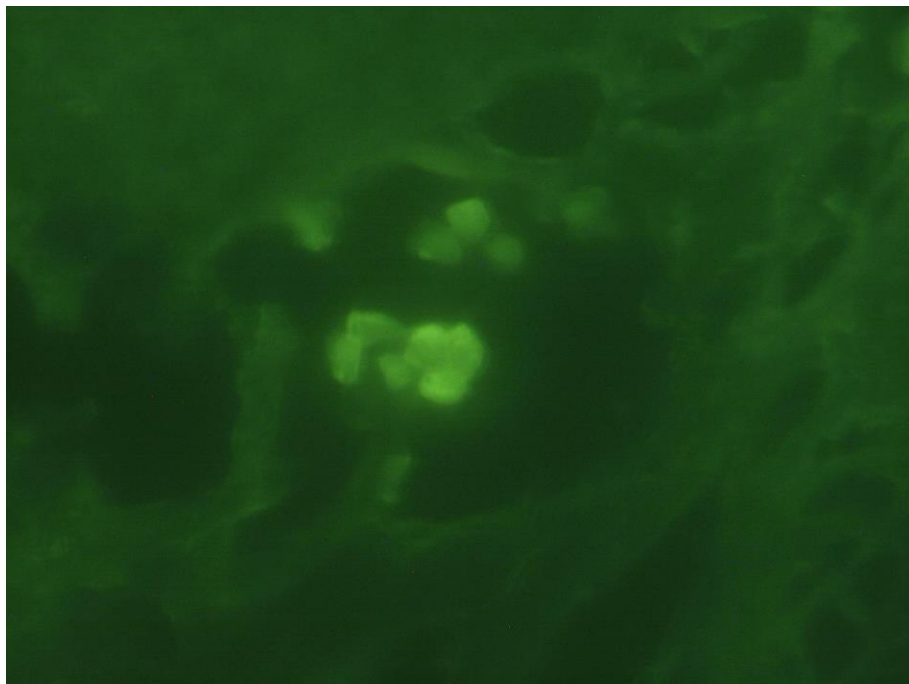


Рис. 5.4. Нечисленні ендотеліоцити, що експресують рецептори до ендотеліну-1 у судині міокарда старого самця. Прямий метод Кунса з МКА до ендотеліну-1, $\times 600$.

Таким чином, у міокарді старих самців виявлено ряд морфологічних особливостей з боку всіх основних структурних компонентів. У стромальному компоненті – склеротичні зміни в інтерстиції та периваскулярних просторах, у м'язовому компоненті визначалися зниження інтенсивності метаболізму нуклеїнових кислот у кардіоміоцитах і посилення апоптозу клітинних елементів міокарда, в судинному компоненті – склероз судинних стінок, потовщення базальних мембран, підвищене накопичення в них колагену IV типу, зниження здатності ендотеліоцитів експресувати рецептори до ендотеліну-1. Визначені особливості морфофункціонального стану міокарда розкривають механізми сенільно-інволютивних процесів, що відбуваються в ньому при старінні.

У результаті імплантації КФП старим щурам у їхньому міокарді визначалося зменшення ознак, характерних для старих тварин. У гістологічній картині міокарда спостерігали упорядкування розташування кардіоміоцитів, деяке відновлення поперечної смугастості та більшу рівномірність розподілу

розмірів. Цитоплазма кардіоміоцитів нерівномірно забарвлювалася еозином – переважали зони помірної еозинофілії, рідше, ніж в групі 4 спостерігалися скупчення кардіоміоцитів зі слабо еозинофільною цитоплазмою. Вставочні диски стали більш чіткішими, значні склеротичні прояви, які виявлялися в групі 4, нівелювалися. Водночас мікроскопічні дані міокарда свідчили про деяке розростання сполучної тканини між кардіоміоцитами і периваскулярно (рис. 5.5).

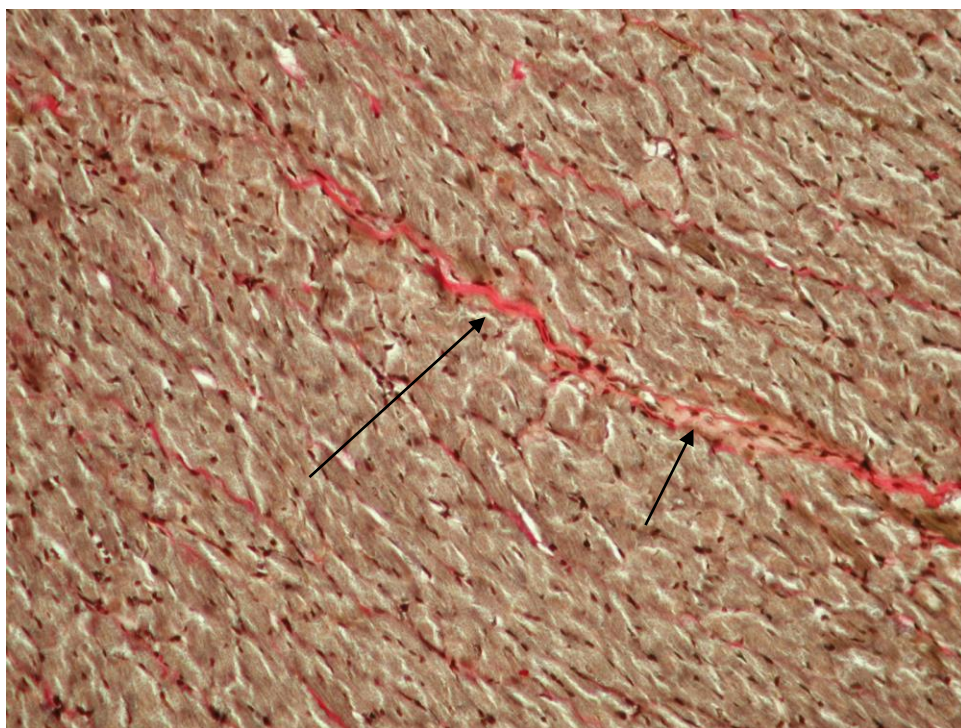


Рис. 5.5. Незначний інтерстиціальний склероз, відсутність набряку в міокарді старого самця на фоні імплантованих КФП. Забарвлення за Ван Гізон, $\times 100$, поперечний зріз.

Звертала на себе увагу відсутність вираженого інтерстиціального набряку, що може свідчити про інтенсифікацію обміну та відновлення сполучної тканини. Відносний об'єм стромального компонента перевищував такий у молодих тварин (група 5), але став меншим, ніж у старих без введення КФП (група 4) (див. табл. 5.1), відповідно збільшився і відносний обсяг кардіоміоцитів. Відносний обсяг судинного компонента був достовірно вище такого в групі 4 внаслідок розширених і повнокровних судин

мікроциркуляторного русла, а також ангіогенезу *de novo*, що взагалі є характерною реакцією на введення плацентарних структур, які містять ростові васкулопоетичні фактори.

Було виявлено істотні зміни з боку гістохімічних реакцій на РНП і ДНП. Так, оптична щільність РНП у цитоплазмі та ДНП у ядрах кардіоміоцитів достовірно відрізнялась від відповідних показників групи 4, що свідчило про високу функціональну напругу й анаболічну активність клітин (див. табл. 5.2.). Позитивні зміни порівняно з групою 4, відзначалися і в результатах імуногістохімічних досліджень. Апоптозний індекс клітинних елементів міокарда достовірно знижувався (див. табл. 5.3.).

Відзначалися ознаки склерозу судинних стінок, однак при цьому вміст колагену IV типу в базальних мембранах судин був нижчим, а інтенсивність експресії рецепторів до ендотеліну-1 – підвищеною (рис. 5.6).

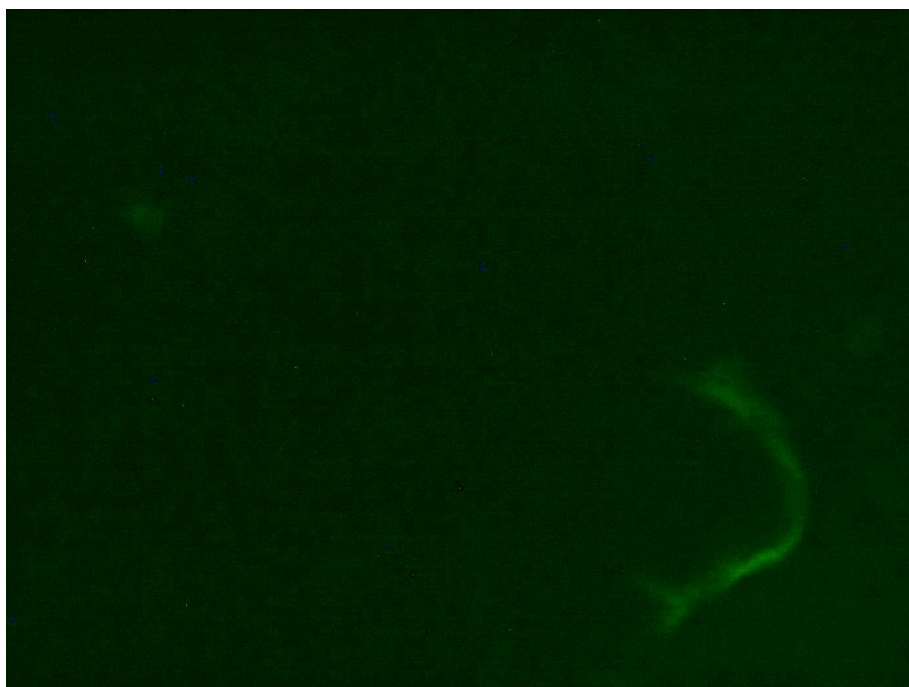


Рис 5.6. Слабке світіння колагену IV типу в базальній мембрані судини міокарда самця пізнього онтогенезу на фоні імплантованих КФП. Прямий метод Кунса з МКА до колагену IV типу, $\times 600$.

Таким чином, морфологічні зміни в міокарді старих самців з імплантацією КФП свідчили про поліпшення метаболічних процесів у кардіоміоцитах, активізацію обміну нуклеопротеїдів, зменшення активності апоптозу в клітинних елементах міокарда, зниження інтенсивності накопичення в базальних мембранах судин колагену IV типу, підвищення здатності ендотеліоцитів експресувати рецептори до ендотеліну-1. Динаміка останнього показника віддзеркалює нормалізацію регуляції реактивності судин, вазоконстрикції, ангіогенезу, продукції вазорелаксантів, факторів росту, забезпечує ефективну мікрогемодинаміку.

5.1.3. Морфофункціональний стан печінки самців експериментальних тварин.

Печінка як життєвоважлива і найбільша за розміром залоза в організмі, виконує численні життєвоважливі функції, основними з яких є гомеостатична, метаболічна, синтетична, захистна, екскреторна, бар'єрна і депонуюча. Реалізація цих функцій відбувається завдяки тісному взаємозв'язку печінки з іншими органами і середовищами організму (кров'ю, лімфою). Відповідно до цих положень і генетично детермінованої ролі, печінка одна з перших взаємодіє і реагує на екзогенні чинники. У періоді пізнього онтогенезу морфофункціональний стан печінки зазнає вікових змін, тому гепатогенна дія різних факторів, у тому числі плацентарного походження, в похилому віці потребує окремого вивчення.

У результаті проведеного дослідження виявлено, що печінка 5-місячних самців мала структуровану часточкову будову паренхіми. Чітко визначалися тріади, представлені печінковою артерією, портальною веною і жовчним протоком. Судини – помірно повнокровні. У прилеглих відділах визначається незначна лімфоцитарна інфільтрація (рис.5.7). Печінкові трабекули добре структуровані. Міждолькова сполучна тканина слабо розвинена. Печінкові часточки складаються з радіально орієнтованих гепатоцитів. Неправильної

форми гепатоцити містили одне–два ядра. Зустрічалися поліплоїдні клітини. Ядра гепатоцитів округлі, великі. Цитоплазма більшості гепатоцитів була помірно еозинофільною, крім того зустрічалися клітини як з яскравоеозинофільною цитоплазмою, так і з слабкоеозинофільною і навіть слабкобазофільною цитоплазмою. Як відомо, це зумовлено нерівномірним накопиченням у ній глікогену, РНП, ліпідів.

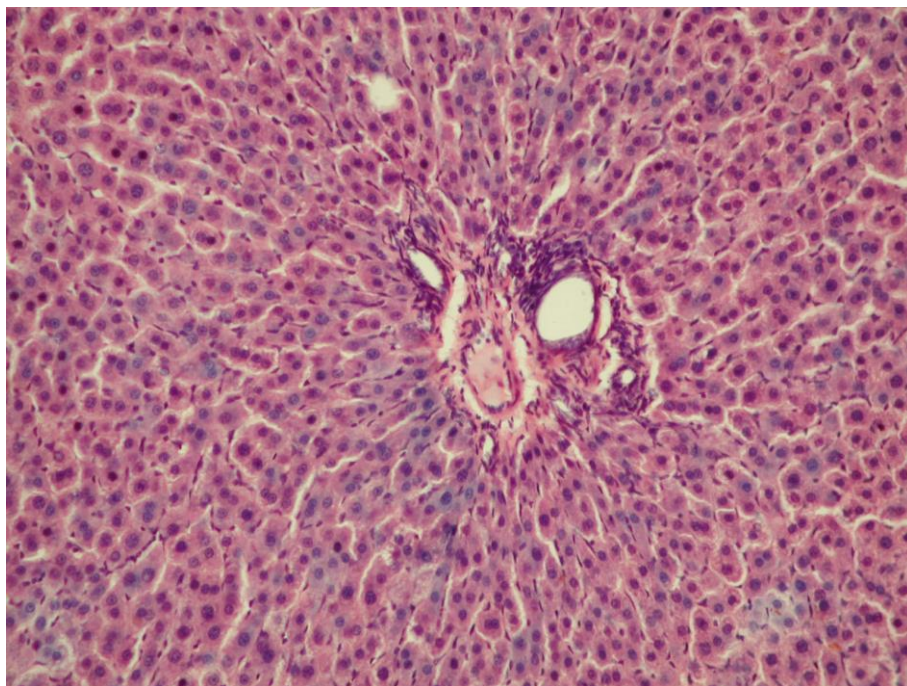


Рис. 5.7. Печінкова триада, паренхіма печінки молодого самця. Забарвлення гематоксиліном і еозином, $\times 100$.

Інтенсивність реакції Фельгена-Россенбека на ДНП розцінювалася як помірна, практично однорідна в різних ядрах. При реакції Браше в цитоплазмі гепатоцитів виявлено накопичення РНП. Дані оптичної щільності ДНП в ядрах і РНП у цитоплазмі гепатоцитів представлено в табл. 5.4.

Ендотеліоцити в судинах печінки молодих щурів були розташовані в один ряд, виявляли яскраве рівномірне світіння в препаратах, оброблених МКА до ендотеліну-1 (рис. 5.8).

Таблиця 5.4

Оптична щільність РНП і ДНП в гепатоцитах печінки самців, умовні одиниці

Оптична щільність	Молоді самці (група 5)	Самці 18 місяців (група 4)	Самці 18 місяців з імплантацією КФП (група 3)
РНП в цитоплазмі	0,229±0,09	0,163±0,09*	0,198±0,08*
ДНП в ядрі	0,119±0,07	0,149±0,03*	0,128±0,05*

Примітка: * – вірогідність різниці з групою 5, $p < 0,05$.

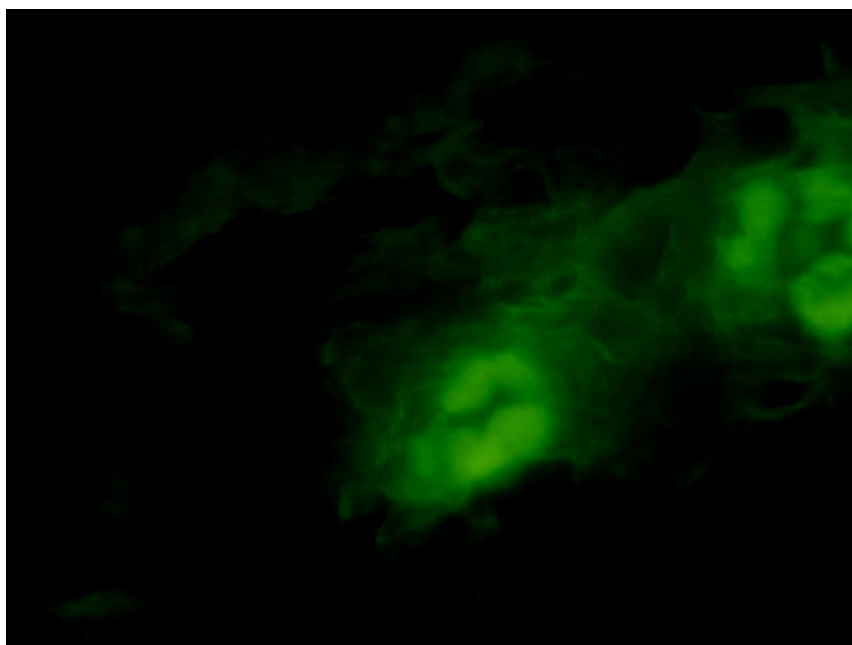


Рис. 5.8. Яскраве світіння ендотеліоцитів, які експресують рецептори до ендотеліну-1 у судинах печінки молодого самця. Прямий метод Кунса з МКА до ендотеліну-1, $\times 600$.

Оптична щільність інтенсивності світіння ендотеліну-1 представлена в табл. 5.5.

У структурі печінки виявлено тонкі субендотеліальні базальні мембрани, що містили помірну кількість колагену IV типу. Оптична щільність інтенсивності світіння колагену IV типу представлена в табл. 5.5.

Таблиця 5.5

Індекс апоптозу клітин печінки і оптична щільність світіння ендотеліну-1 і колагену IV типу в судинах печінки тварин у групах спостереження

Показник	Молоді самці (група 5)	Старі самці (група 4)	Старі самці з імплантацією КФП (група 3)
Індекс апоптозу	5,8±0,5	10,9±1,8*	7,5±0,3* **
Оптична щільність світіння ендотеліну – 1 (ум. од.)	0,201±0,07	0,145±0,09*	0,178±0,06* **
Оптична щільність світіння колагену IV типу (ум. од.)	0,401±0,09	0,489±0,03*	0,422±0,07* **

Примітки: * – вірогідність різниці з групою 5, $p < 0,05$;

* * – вірогідність різниці з групою 4, $p < 0,05$.

У мікроскопічній картині печінки самців групи 4 візуалізовалася часточкова будова з тріадами між часточками. В окремих полях зору спостерігали часточки неправильної форми меншого або більшого розміру з деформацією. Сполучна тканина була більш розвинена (червоний колір при забарвленні пікрофуксином за Ван-Гізон). Спостерігалася деформація перисинусоїдальних і інтерстиціальних просторів. Центральні вени і синусоїдні капіляри були нерівномірно кровонаповнені. Печінкові трабекули склалися з радіально орієнтованих гепатоцитів. Проте в порівнянні з групою 5, виявлено зони, в яких була порушена трабекулярна будова органа. Гепатоцити мали неправильну форму, частіше містили одне, рідше два ядра. Ядра клітин округлі, великі. Цитоплазма гепатоцитів нерівномірно забарвлена еозином – від слабкоеозинофільної до яскравоеозинофільної, було виявлено певну кількість клітин з слабкобазофільною цитоплазмою. Серед гепатоцитів спостерігалися клітини, у цитоплазмі яких при фарбуванні гематоксиліном і еозином

виявлялися вакуолеоподібні порожнини, що є непрямим свідченням наявності у цих клітинах альтеративних змін, а саме внутрішньоклітинної жирової дистрофії (рис. 5.9). Ознаки гіаліново-крапельної дистрофії виявлено в цитоплазмі ряду гепатоцитів, переважно прилеглих до центральних вен, при цьому інші ознаки дистрофічних змін подекуди визначалися у всій часточці.

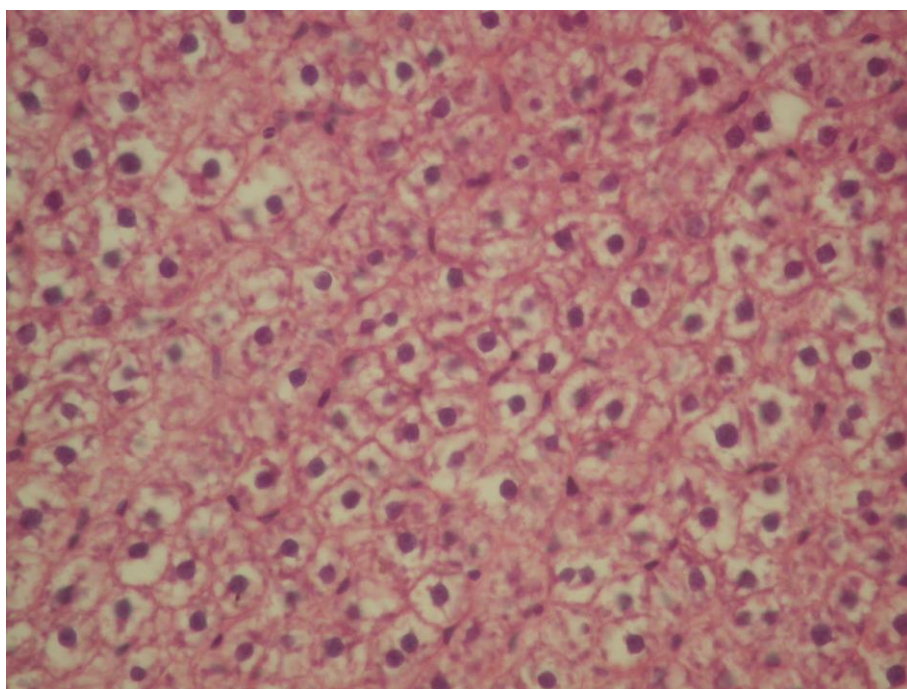


Рис. 5.9. Виражені альтеративні зміни в цитоплазмі гепатоцитів старого самця. Забарвлення гематоксиліном і еозином, $\times 400$.

Інтенсивність реакції Фельгена-Россенбека на ДНП була вища порівняно з групою 5, про що свідчить показник оптичної щільності ДНП у ядрах гепатоцитів і віддзеркалює накопичення барвника в щільнішому гетерохроматині (збільшення вмісту якого характерне для старіючої клітини) відносно еухроматина. При реакції Браше у цитоплазмі гепатоцитів виявлено слабкіше порівняно з групою 5 накопичення РНП, на що вказує і показник оптичної щільності РНП у цитоплазмі гепатоцитів (див. табл. 5.4.).

Ендотеліоцити, які були розташовані в один ряд, виявляли слабкіше світіння в препаратах, оброблених МКА до ендотеліну-1. Оптична щільність інтенсивності світіння ендотеліну-1 була нижче такої в групі 5 (рис. 5.10).

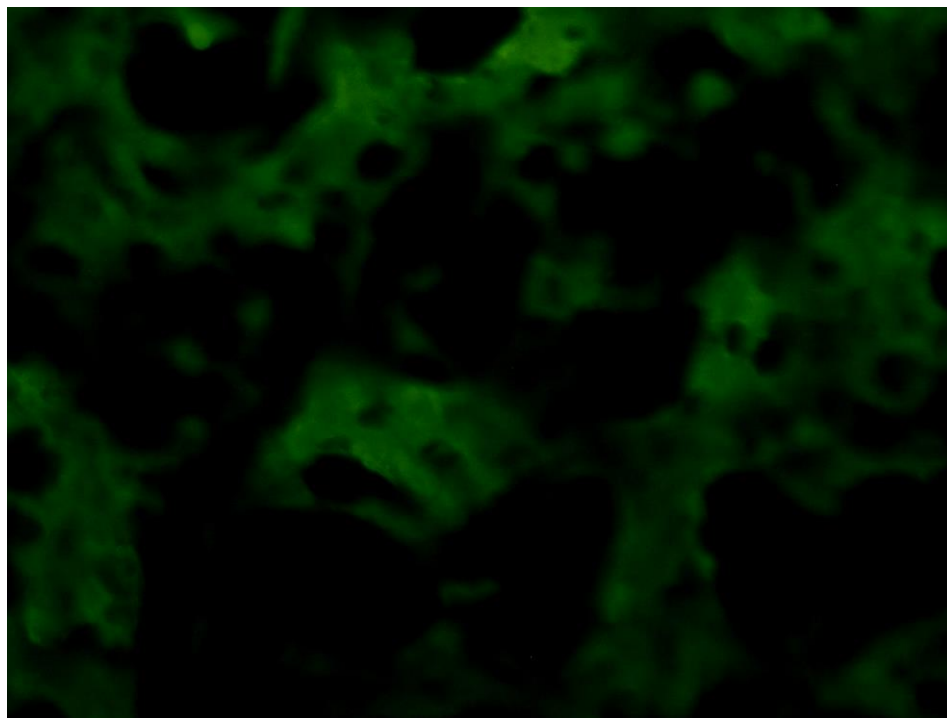


Рис 5.10. Велика кількість клітин, які експресують рецептори до CD95 у печінці 18-місячних самців. Прямий метод Кунса з МКА до CD95, $\times 600$.

Субендотеліальні базальні мембрани були декілька потовщені, містили збільшену кількість колагену IV типу. Оптична щільність інтенсивності світіння колагену IV перевищувала такий показник у групі 5 та представлена в табл. 5.5.

Індекс апоптозу клітинних елементів печінки у спостереженнях цієї групи достовірно перевищив відповідний показник тварин з групи 5 (табл. 5.5).

Таким чином, у печінці старих самців визначено інволютивні ознаки порівняно з молодими тваринами. Ці морфологічні зміни виявляються у вигляді склеротичних процесів, посилення внутрішньоклітинної альтерації на тлі помірно виражених компенсаторно-приспосувальних процесів, зниження інтенсивності метаболічних процесів нуклеїнових кислот у гепатоцитах, а також посилення апоптозу клітинних елементів печінки. З боку судинного компонента

виявлено підвищене накопичення колагену IV типу, зниження здатності ендотеліоцитів експресувати рецептори до ендотеліну-1. Усі вищевказані зміни можна розцінювати як сенільні дистрофічні ознаки, що свідчать про порушення структури і зниження гістіоспецифічних функцій печінки в періоді пізнього онтогенезу.

Дослідженням морфофункціонального стану печінки самців пізнього онтогенезу після імплантації КФП (група 3) виявлена досить чітка частоскова будова паренхіми печінки на фоні незначного розростання сполучної тканини (рис. 5.11), переважно в периваскулярних зонах.

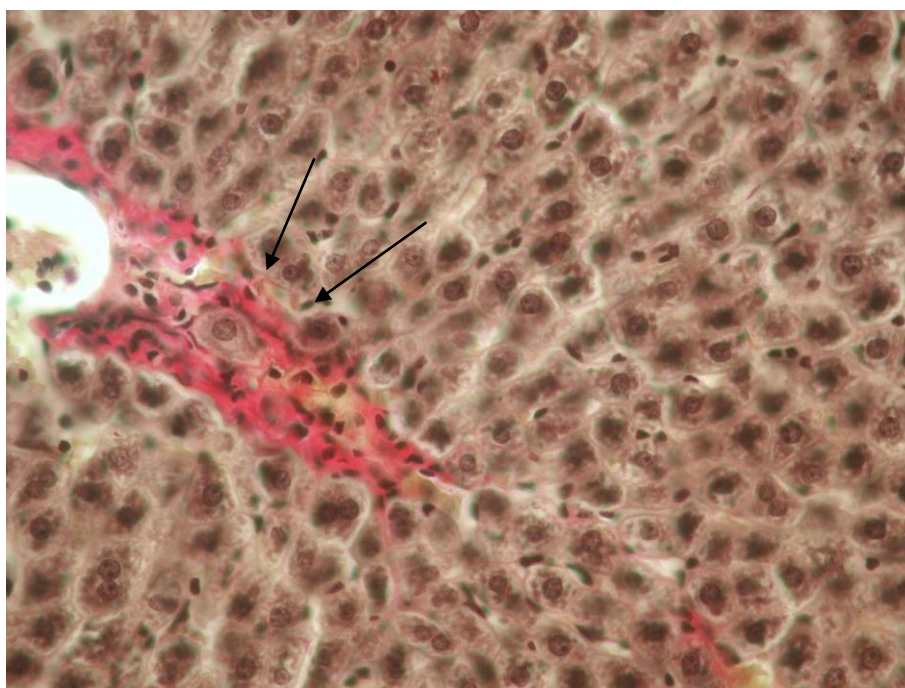


Рис. 5.11. Радіальна будова трабекул, сполучна тканина в периваскулярному просторі, одно- та двоядерні гепатоцити у печінці старого самця на фоні імплантації КФП. Забарвлення за Ван Гізон, $\times 400$.

Архітектоніка часточок мала типовий вид, їх вугли сформовано судинно-протоковими комплексами. Печінкові тріади розташовувались між часточками і визначалися чітко. У них візуалізувалися жовчний протік, артерія, вена, інколи – лімфатична судина. Судинне русло печінки, в тому числі синусоїдальні судини, було помірно повнокровним. Розміри і сполучення просторів Дісе і Моля

відновилися практично в повному обсязі. Печінкові трабекули склалися з радіально орієнтованих гепатоцитів. Гепатоцити мали великий розмір, містили одне–два округлих великих ядра. Зустрічались поліплоїдні клітини. Цитоплазма гепатоцитів світла, помірно еозинофільна, в окремих полях зору спостерігалися також клітини з слабкобазофільною цитоплазмою.

Інтенсивність реакції Фельгена-Россенбека на ДНП виявилася зниженою у порівнянні з групою 4. Оптична щільність ДНП у ядрах гепатоцитів зменшилася після імплантації КФП (табл. 5.4), що свідчило про перерозподіл хроматину зі зниженням кількості гетерохроматину. Інтенсивність реакції Браше була посилена у порівнянні з групою 4, відповідно оптична щільність РНП у цитоплазмі гепатоцитів була вище такої у групі 4 (табл. 5.4).

Ендотеліальна вистилка була представлена однорядним розташуванням клітин, здатних експресувати рецептори до ендотеліну-1 (рис. 5.12).

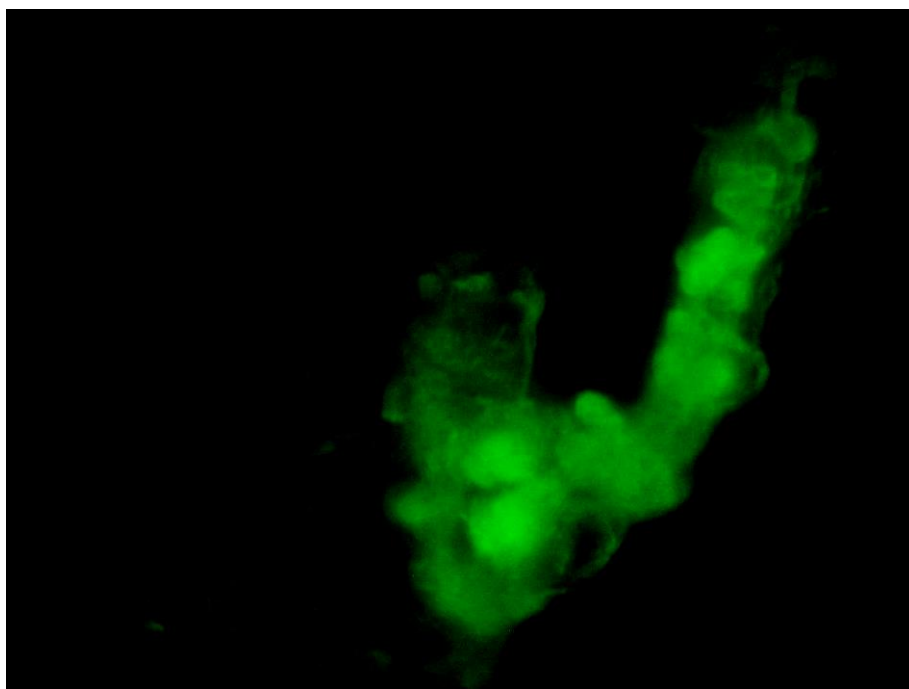


Рис. 5.12. Світіння ендотеліоцитів, що експресують рецептори до ендотеліну-1 в судині печінки старого самця на фоні імплантації КФП. Прямий метод Кунса з МКА до ендотеліну-1, $\times 900$.

При цьому оптична щільність інтенсивності світіння ендотеліну-1 виявилася вищою такої в групі старих інтактних тварин, але не сягала рівня, який було визначено у групі молодих самців (див. табл. 5.5).

Потовщення субендотеліальних базальних мембран, яке було виявлено у старих інтактних тварин, після імплантації КФП зменшилося, як і кількість колагену IV типу. Оптична щільність інтенсивності світіння колагену IV суттєво знизилася і в незначній мірі перевищувала такий показник у групі молодих тварин (табл. 5.5).

Індекс апоптозу клітинних елементів печінки в спостереженнях цієї групи знизився, але не до рівня, характерного для молодих самців (табл. 5.5).

Таким чином, у печінці старих самців після імплантації КФП виявлялись морфологічні ознаки, які свідчили про поліпшення метаболічних процесів у гепатоцитах, зокрема активацію обміну нуклеопротейдів, зменшення підвищеної інтенсивності апоптозу клітинних елементів печінки. З боку судинного компонента визначено зниження накопичення у базальних мембранах колагену IV типу і підвищення здатності ендотеліоцитів експресувати рецептори до ендотеліну. Подібні зміни морфологічних ознак свідчать про те, що негативна вікова внутрішньоклітинна альтерація набуває позитивної якості. Методологія даного розділу дослідження дозволяє інтерпретувати отримані результати як прояв відновлювально-реструктуризуючої дії біологічно активних складових імплантованих КФП.

5.1.4. Вплив імплантації кріоконсервованих фрагментів плаценти на статеву систему і репродуктивну функцію самців у період пізнього онтогенезу.

Проблема подовження репродуктивного віку обумовлена збільшенням кількості пізніх шлюбів, пов'язаних з бажанням самореалізації в суспільстві, що більш актуально для чоловіків, оскільки вони вступають до шлюбу пізніше жінок. Медичні репродуктивні технології, що допомагають вирішувати цю

проблему, вимагають аналогових попередніх експериментальних досліджень. Результати таких досліджень, а саме визначенню механізмів впливу введення КФП на генеративну функцію в експерименті наведені нижче.

У контрольній групі 5 молодих щурів чоловічої статі при мікроскопічному дослідженні сім'яних залоз виявлено, що каналці гонад тісно прилягали один до одного, мали овоїдну, нерідко округлу форму (при поперечному зрізі). У всіх каналцях спостерігалися просвіти. Базальна мембрана, на якій розташовувалися клітини сперматогенного епітелію була помірної товщини, в окремих випадках в ній виявлялися волокна ніжної сполучної тканини, зафарбованої за Ван Гізон у червонуватий колір. Сперматогенний епітелій каналців був представлений гоноцитами, клітинами Сертолі, а також сперматогоніями типу А і В. У адлюмінальній зоні первинні статеві клітини або гоноцити мали округлу форму, велике ядро, яке розташоване в центрі клітин і містить еухроматин. Цитоплазма гоноцитів – світла, еозинофільна. В просвіті каналців виявлялися сперматозоїди. У міжканальцевій стромі зустрічалися округлі Лейдігові клітини, основною функцією яких є секреція тестостерону.

Частина сперматогоній типу А зі світлим ядром, помірно насиченим хроматином з відповідною інтенсивністю реакції на ДНП (табл. 5.6.). У цитоплазмі клітин виявлялася помірно виражена піронінофілія, яка підтверджувалася інтенсивною гістохімічною реакцією (табл. 5.6.). Інша ж частина сперматогоній представлена темними клітинами типу А з помірно конденсованим ядром і інтенсивністю реакції на ДНП з піронінофілією цитоплазми. Зустрічалися сперматогонії типу В, ядро яких було насичене хроматином декілька більше, ніж в сперматогоніях типу А. Усі описані клітини сперматогенного епітелію у цитоплазмі містили поліморфні ШИК-позитивні гранули, дифузно розташовані по всій цитоплазмі з помірною інтенсивністю гістохімічної реакції (табл. 5.6.).

Цитоплазма Лейдігових клітин еозинофільна, зі слабкою піронінофілією навколо ядра, містить ШИК-позитивні гранули, що місцями зливалися між

собою, і досить високу інтенсивність реакції на глікоген. У клітинах виявлялися дрібні ядра округлої форми, насичені хроматином із помірною інтенсивністю реакції на ДНП і аналогічною інтенсивністю реакції на РНП. Полігональних Лейдігових клітин було менше, ніж округлих.

Таблиця 5.6

Інтенсивність гістохімічних реакцій у клітинах сперматогенного епітелію сім'яних залоз, Лейдігових клітинах на ДНП, РНП і глікоген (ум. од. оптичної щільності)

Клітини сім'яних залоз	ДНП	РНП	ШИК
група 5 (молоді самці)			
Світлі сперматогонії типу А	0,210±0,007	0,298 ± 0,011	0,285±0,011
Темні сперматогонії типу А	0,245±0,019	0,275± 0,010	0,244± 0,003*
Сперматогонії типу В	0,224±0,008	0,198±0,007	0,221±0,005
Лейдігові клітини	0,198±0,007	0,132±0,005	0,297±0,012
група 4 (старі самці)			
Світлі сперматогонії типу А	0,218±0,033	0,248 ± 0,031*	0,265±0,031
Темні сперматогонії типу А	0,265±0,021*	0,249± 0,033	0,234± 0,002
Сперматогонії типу В	0,234±0,008	0,198± 0,007	0,224±0,005
Лейдігові клітини	0,229±0,006	0,112±0,002*	0,278±0,012
група 3 (старі самці + введення КФП)			
Світлі сперматогонії типу А	0,214±0,008	0,318±0,011	0,328±0,012*
Темні сперматогонії типу А	0,235±0,008	0,296±0,010	0,271±0,010*
Сперматогонії типу В	0,202±0,009	0,221±0,007	0,243,008
Лейдігові клітини	0,179±0,007	0,154±0,006*	0,332±0,012

Примітка: * – вірогідність різниці з групою 5, $p < 0,05$.

При імуногістохімічному дослідженні з МКА до CD95 виявлено специфічне світіння клітин мікропрепаратів сім'яних залоз тварин групи 5.

При використанні МКА до колагену IV типу виявлено слабе, часткове світіння базальних мембран судин і епітелію (рис. 5.13).

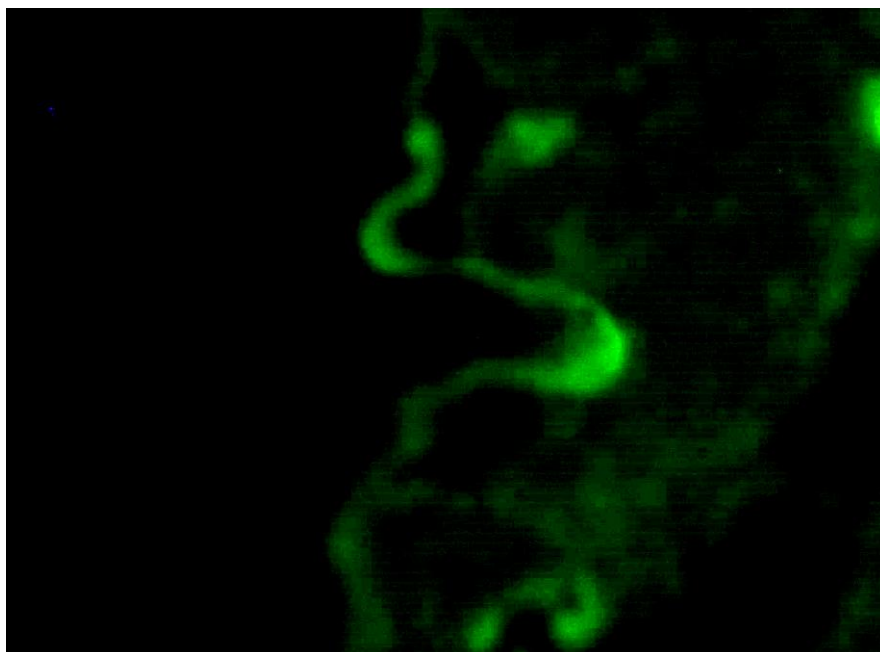


Рис. 5.13. Світіння колагену IV типу в епітеліальних і судинних базальних мембранах сім'яних залоз молодих самців. Прямий метод Кунса з МКА до колагену IV типу, $\times 600$.

Індекс апоптозу виявився невисоким (табл. 5.7). Оптична щільність інтенсивності світіння колагену IV типу представлена в табл. 5.7. У просвіті судин виявлялося подекуди інтенсивне, а частіше помірне світіння ендотеліоцитів, що експресували рецептори до ендотеліну-1. Оптична щільність світіння ендотеліну-1 представлена в табл. 5.7.

Таблиця 5.7.

Індекс апоптозу клітин сім'яників і оптична щільність світіння ендотеліну-1 і колагену IV типу в судинах сім'яних залоз самців

Показник	Молоді самці (5 група)	Старі самці (4 група)	Старі самці плацентою (3 група)
Індекс апоптозу	$3,8 \pm 0,2$	$6,8 \pm 0,4^*$	$5,0 \pm 0,2^* **$
Оптична щільність світіння ендотеліну – 1 (умовні одиниці)	$0,20 \pm 0,03$	$0,112 \pm 0,03^*$	$0,149 \pm 0,07^* **$
Оптична щільність світіння колагену IV типу (умовні одиниці)	$0,112 \pm 0,03$	$0,234 \pm 0,07^*$	$0,147 \pm 0,08^* **$

Примітки: * – вірогідність різниці з групою 5, $p < 0,05$;

** – вірогідність різниці з групою 4, $p < 0,05$.

При дослідженні рівень тестостерону у молодих самців дорівнював $20,5 \pm 1,3$ нМоль/л.

При дослідженні репродуктивних показників продемонстровано, що від самців групи 5 завагітніло 20 самок з 20, а середня кількість плодів – $9,3 \pm 2,3$, резорбції були знайдені у 10% самиць (рис. 5.14).

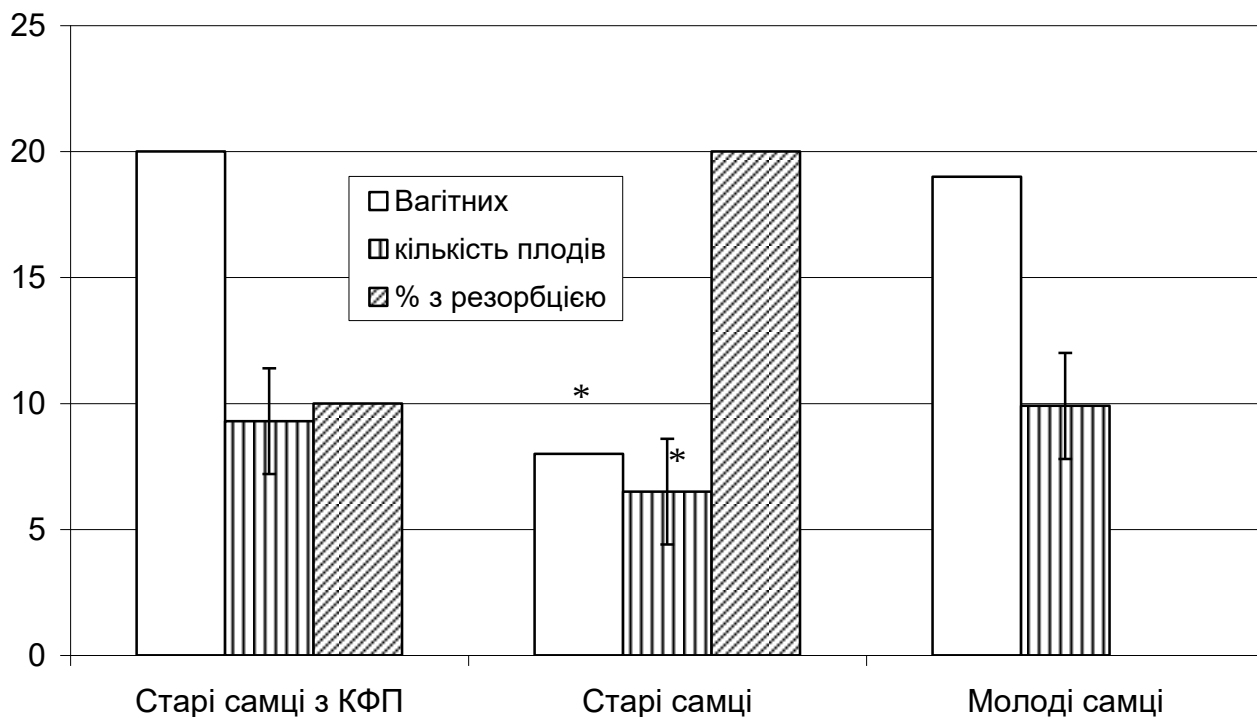


Рис. 5.14. Репродуктивні показники дослідних самців щурів після спаровування з молодими самицями (* – вірогідність різниці з групою 5, $p < 0,05$).

Мікроскопічно в гонадах виявлялося неупорядковане розташування каналців, що мали округлу, витягнуту, іноді деформовану форму (рис. 5.15). Базальна мембрана, на якій розташовуються клітини сперматогенного епітелію, дещо потовщена за рахунок збільшення кількості сполучної тканини. Епітелій каналців представлений переважно щільно розташованими темними сперматогоніями типу А, виявлялася незмінна кількість клітин Сертоллі з ознаками базофілії. Первинні статеві клітини або гоноцити мали округлу форму, в регіоні адлюмінальної зони спостерігалася їх помірна кількість. Вони мали велике

ядро в центрі клітин. У деяких гоноцитах ядра зміщені до мембрани клітин. Цитоплазма багатьох гоноцитів просвітлена, вакуолізована.

Виявлялися досить спустошені канальці, представлені переважно клітинами сперматогенного епітелію у вигляді сперматогоній типу В і одиничними гоноцитами, а також індіферентними статевими клітинами. Сперматозоїди виявлялися між клітинами сперматогенного епітелію і в просвіті канальців, проте кількість їх незначна і не у всіх каналцях.

У щурів-самців групи 4 при макроскопічному дослідженні гонад виявлено зменшення їх розміру, потовщення оболонок, на розрізі спостерігалися мікрокрововиливи.

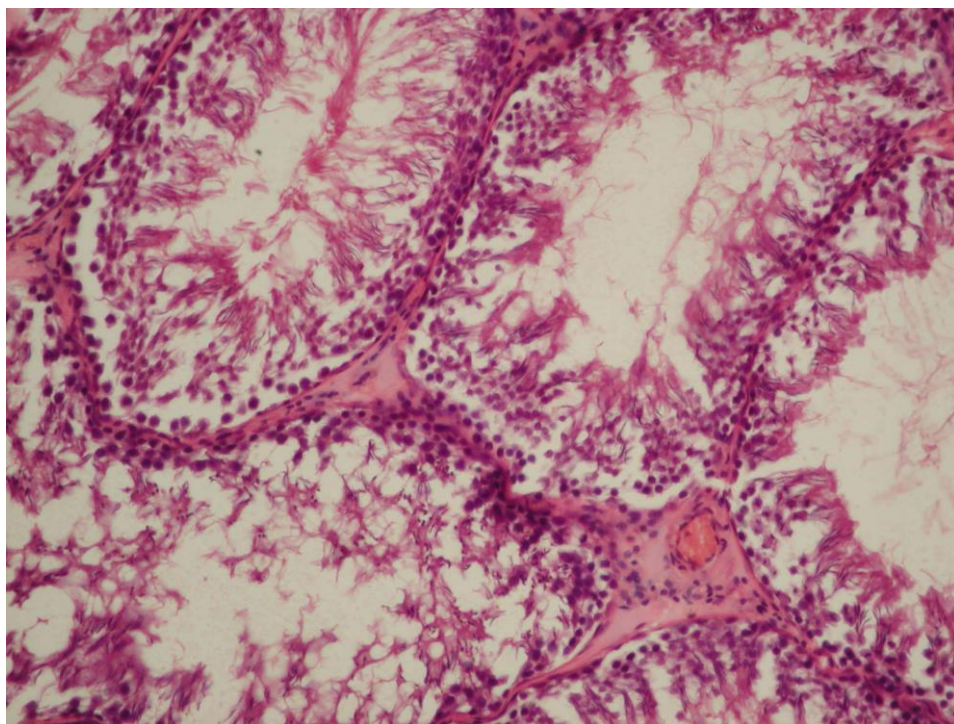


Рис. 5.15. Сім'яники старого самця. Тісно розташовані канальці на базальній мембрані, клітини сперматогенного епітелію і поодинокі сперматозоїди. У міжканалцевій стромі спостерігалися полігональні Лейдігові клітини, забарвлення гематоксіліном-еозином. $\times 200$.

У міжканалцевій стромі виявлялися поодинокі полігональні Лейдігові клітини. Цитоплазма Лейдігових клітин еозинофільна з слабковираженою

піронінофілією і малою інтенсивністю оптичної щільності гістохімічних реакцій, ядра мали округлу форму, помірно насичені хроматином з одиничними ядерцями та слабковиражену інтенсивність реакції на РНП (табл. 5.6). Овальних Лейдігових клітин також небагато. Просвіти судин розширені, переповнені еритроцитами. Виявлено дрібні периваскулярні крововиливи, нерівномірно виражений набряк інтерстиціальної тканини. У гонадах спостерігався склероз стінок судин, розташованих в міжканальцевій стромі і базальних мембран каналців (рис. 5.16).



Рис. 5.16. Деформовані каналці гонад старого самця. Склероз стінок судин міжканальцевої стромі сім'яних залоз. Забарвлення за Ван Гізон, $\times 100$.

Ядра клітин сім'яників мали більш інтенсивне забарвлення на ДНП, ніж у контрольній групі і відповідну інтенсивність гістохімічної реакції (див. табл. 5.6). У той же час інтенсивність реакції на РНП у цитоплазмі була знижена порівняно з контрольною групою (див. табл. 5.6). Також знижена інтенсивність реакції і відповідної оптичної щільності при визначенні ШИК-реакції.

При імуногістохімічному дослідженні з МКА до CD95 виявлено специфічне світіння клітин мікропрепаратів сім'яних залоз цих тварин (рис. 5.17). Звертало на себе увагу достовірне збільшення індексу апоптозу клітинних елементів сім'яників (див. табл. 5.7).

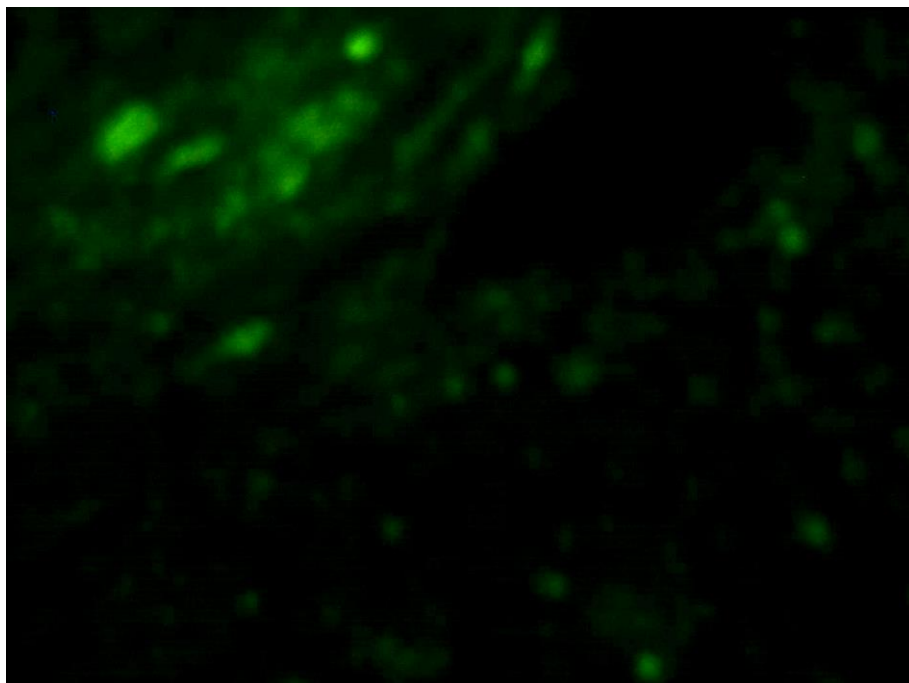


Рис. 5.17. Численні апоптоззмінені клітини в сім'яниках старих щурів. Прямий метод Кунса з МКА до CD95, $\times 400$.

При використанні МКА до колагену IV типу виявлено, в порівнянні з молодими тваринами, більш яскраве світіння базальних мембран судин і епітелію. При цьому оптична щільність інтенсивності світіння колагену IV типу достовірно вище порівняно з аналогічним показником 5-місячних тварин (див. табл. 5.7).

Спостерігали зниження інтенсивності світіння ендотеліоцитів, що експресують рецептори до ендотеліну-1, порівняно з групою молодих самців, про що свідчив показник оптичної щільності світіння ендотеліну-1 (див. табл. 5.7).

При дослідженні рівень тестостерону у крові старих самців дорівнював $4,5 \pm 1,1$ нМоль/л.

Репродуктивна функція щурів була зниженою. Так, від самців групи 4 завагітніло 8 з 20-ти самиць молодого репродуктивного віку, середня кількість плодів у них була $6,5 \pm 3,1$, резорбції місць імплантації знаходили у 20% самиць (див. рис. 5.14).

У результаті експериментального дослідження виявлено, що в періоді пізнього онтогенезу у статевій системі щурів чоловічої статі спостерігаються дистрофічні явища, які охоплюють, в першу чергу, структури, багаті на сполучну тканину, з її розростанням і зміною виду колагену. Перерозподіл у генетичній матриці гонадоцитів хроматину зі збільшенням гетерохроматину призводить до різкого уповільнення програми сперматогенезу. Аналогічні зміни в гландулоцитах, уповільнення білоксинтезуючих процесів на фоні підвищення апоптозу і порушення у регуляції мікроциркуляції посилюють сенільно-інволютивні процеси в гонадах. Відповідно відбувається кількісне й якісне зниження генеративної функції.

Після імплантації КФП починаючи з 7–10 доби у старих щурів-самців спостерігалось відновлення статевої активності.

При макроскопічному дослідженні гонад експериментальних тварин цієї дослідної групи сім'яники мали овоїдну форму на розрізі мозгоподібної консистенції, сірувато-білястого виду.

При дослідженні морфологічних препаратів сім'яників (рис.5.18–5.19) виявлялася наявність щільно розташованих каналців округлої форми (на поперечному розрізі) з розширеним просвітом, заповненим репродуктивними клітинами. У базальній мембрані виявлялася ніжна сполучна тканина, на якій розташовувалося багато суспендоцитів. Ці соматичні клітини шляхом сертолі-сертолових сполук разом із базальною мембраною формували гематотестикулярний бар'єр. Одночасно вони виступають у якості клітин, що забезпечують підтримуючу і трофічну функцію формують біоболонку для сперматогоніїв типу А і В, та сперматид.

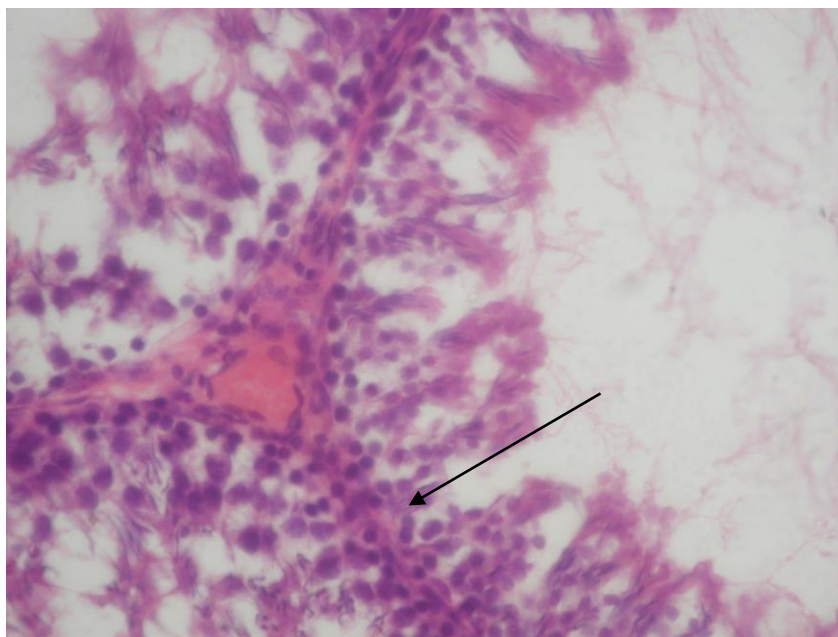


Рис. 5.18. Сім'яники старого самця після імплантації КФП. На базальній мембрані каналців – велика кількість темних сперматогонії типу А. Забарвлення гематоксиліном і еозином, $\times 100$.

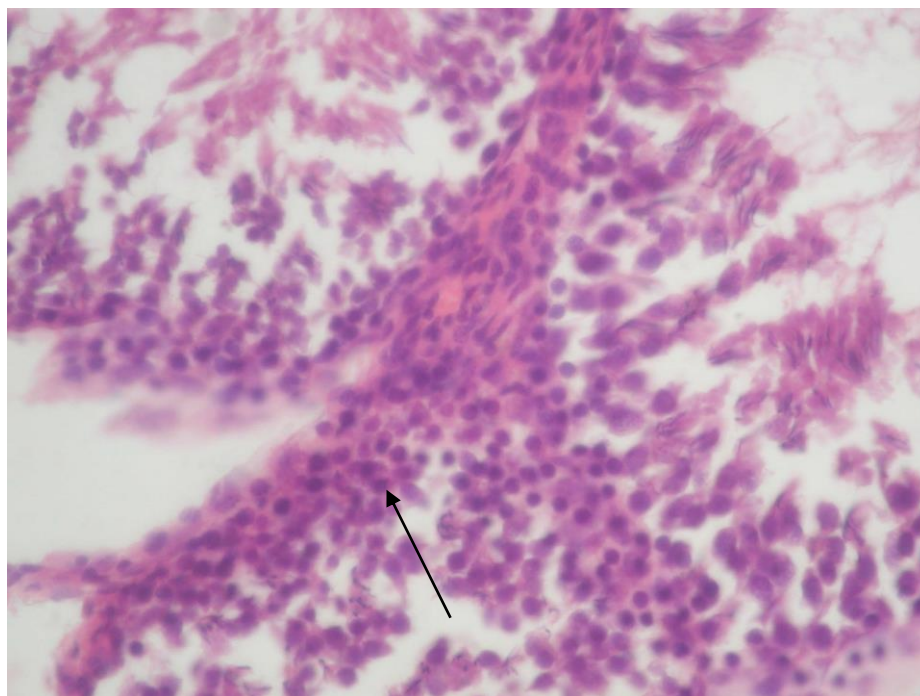


Рис. 5.19. Сім'яники тварин групи 4 після імплантації КФП. Поліцитоз сперматогоній типу В на базальній мембрані сім'яних каналців. Забарвлення гематоксиліном-еозином, $\times 100$.

Звертала на себе увагу значно більша кількість рядів сперматогенного епітелію на фоні імплантації КФП. Візуалізувалися сперматоцити у різних фазах мейозу: лептотени та пахітени. Між клітинами епітелію та в просвіті каналців виявлялися сперматиди, сперматоцити, а також значна кількість сперматозоїдів. Поряд з останніми стадіями дозрівання сперматогенного епітелію спостерігалися окремі сперматиди ранніх етапів розвитку.

У сперматогоніях після імплантації тваринам КФП виявлялися зміни вмісту і структури нуклеопротейдів відносно даних попередньої групи (див. табл. 5.6). Світлі сперматогонії типу А виявляли помірне насичення хроматином, ядро мало таку ж інтенсивність реакції на ДНП (див. табл. 5.6), підвищену інтенсивність реакції на РНП у цитоплазмі, а також ШИК-реакції, про що свідчила висока оптична щільність (рис. 5.20).

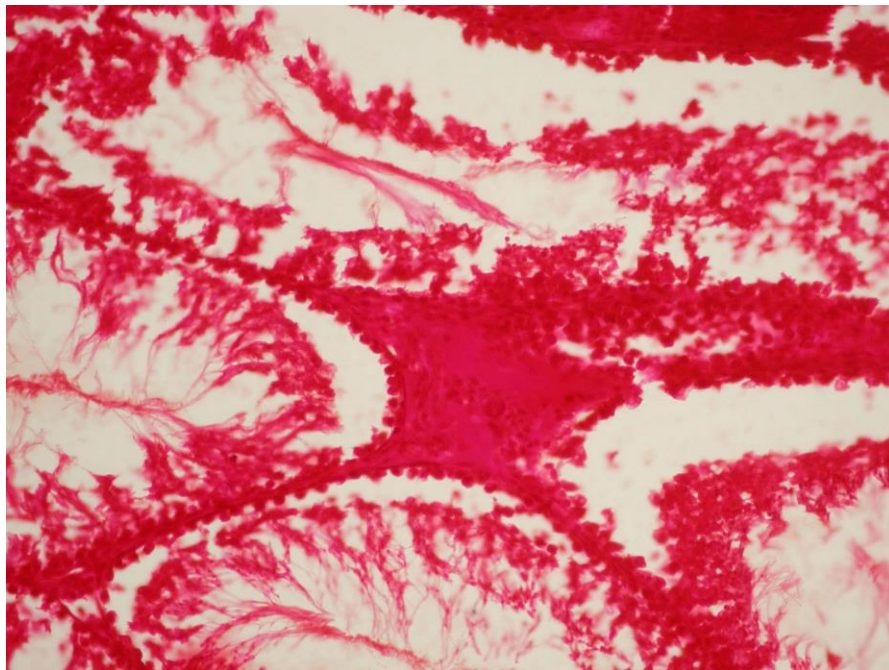


Рис. 5.20. Сім'яники старого самця після імплантації КФП. Інтенсивна піронінофілія цитоплазми клітин сперматогенного епітелію при реакції на РНП. Забарвлення по Браше (РНП, контроль – кристалічна рибонуклеаза), $\times 200$.

Сперматогонії типу В були декілька крупнішими, хроматин ядер характеризувався помірною реакцією на ДНП, цитоплазма – більш інтенсивною реакцією на РНП (див. табл. 5.6).

У міжканальцевій стромі навколо повнокровних з розширеним просвітом судин виявлялася невелика кількість дрібних незрілих Лейдігових клітин при основній кількості зрілих ендокриноцитів. У останніх були декілька підвищені інтенсивність реакції на РНП у цитоплазмі й оптична щільність при визначенні глікогену, тобто ШИК-реакції.

Імуногістохімічне дослідження з МКА до CD95 виявило специфічне світіння клітин мікропрепаратів сім'яних залоз цих тварин. Звертало на себе увагу зниження апоптозного індекса клітинних елементів сім'яників порівняно з попередньою групою (див. табл. 5.7). При цьому оптична щільність інтенсивності світіння рецепторів до колагену IV типу також знижувалася, а інтенсивність світіння ендотеліоцитів, що експресують рецептори до ендотеліну-1, підвищувалася порівняно з групою старих тварин, яким терапію КФП не проводили (рис. 5. 21).

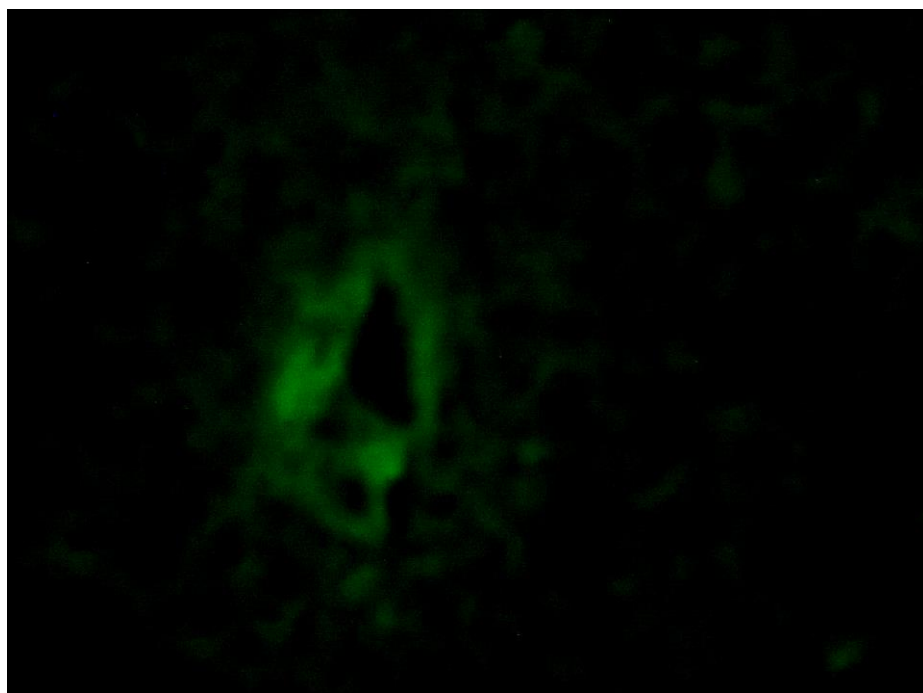


Рис. 5.21. Світіння ендотеліоцитів, що експресують рецептори до ендотеліну-1 в судині сім'яника старого самця основної групи. Прямий метод Кунса з МКА до ендотеліну-1, $\times 600$.

Рівень тестостерону на початку дослідження відповідав показнику

тестостерону групи 3, після імплантації КФП він підвищився майже вдвічі і залишався на такому ж рівні протягом 90 днів спостереження (рис. 5. 22).

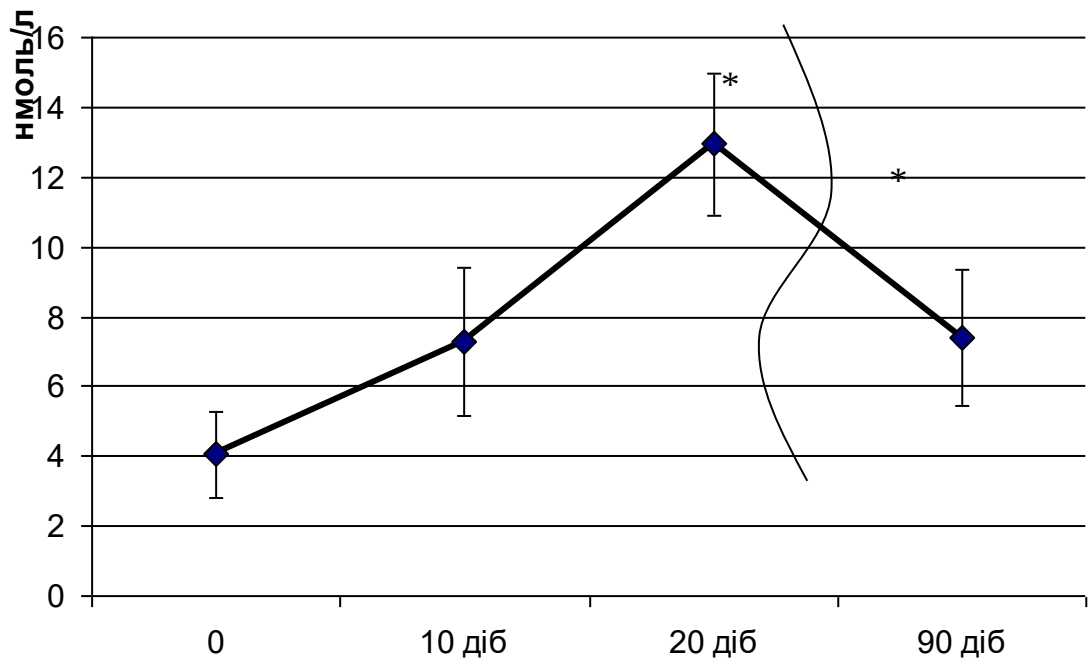


Рис. 5.22. Рівень тестостерону у тварин пізнього онтогенезу після імплантації КФП, нМоль/л (* - вірогідність різниці з контролем (0 діб), $p < 0,05$).

Генеративна функція дослідних тварин даної групи була достатньою. При дослідженні репродуктивних показників продемонстровано, що від самців групи 5 завагітніло 19 з 20-ти самиць, середня кількість плодів була $9,9 \pm 2,1$ резорбцій не було знайдено у жодної самиці. Тобто знижена фертильність старих самців практично відновилась як якісно, так і кількісно; число вагітностей у молодих самиць від самців після імплантації КФП збільшилось практично в 2 рази, також збільшилася кількість життєздатних новонароджених плодів, оскільки зменшилося число резорбцій внутрішньоутробних зародків.

Вцілому, після підшкірної імплантації КФП старим щурам-самцям відбувалися репаративні зміни у гонадах, що виявлялося відновленням повноцінних клонів різних стадій розвитку сперматогенного епітелію й ефективного сперматогенезу, активізацією функції ендокриноцитів. Виявлені позитивні зміни детермінувалися відновленням складу ДНП через збільшення

потенціалу регуляції мікрогемодинаміки, білково-синтетичної функції клітин, зниження апоптотичних процесів, підвищення тестостеронпродукуючої здатності гонад. У результаті активізувалася статеві поведінка самців, що призвело до суттєвого покращення генеративної функції експериментальних тварин у періоді пізнього онтогенезу на фоні імплантації КФП.

5.2. Вплив імплантації кріоконсервованих фрагментів плаценти на самиць пізнього онтогенезу

5.2.1. Загальна характеристика тварин.

Молоді щури-самиці групи 6 (контрольної), репродуктивного віку (5 місяців) мали середню вагу $320 \pm 11,3$ г, активну поведінку, щільний шерстяний покрив, не мали видимих ознак хвороб (абсцеси, пухлини, виразки).

Самиці пізнього онтогенезу групи 2 (18-місячні) – група порівняння, хибно оперовані, мали середню вагу $351 \pm 18,3$ г, менш активні (малорухомі), шерстяний покрив у деяких тварин мав дефекти, ознак хвороб тварини не мали. Дві тварини, що мали на початок дослідження пухлини молочних залоз, були виключені з групи.

Самиці пізнього онтогенезу групи 1 (18-місячні) – основна група, з застосуванням КФП, мали середню вагу $348 \pm 19,1$ г, на початок експерименту були малорухливі, шерстяний покрив був середньої щільності, видимих ознак хвороб не мали (абсцеси, пухлини, виразки).

5.2.2. Стан серцево-судинної системи самиць експериментальних тварин у групах спостереження.

Серце і судини самиць групи 6 мали розміри, колір і пружність характерні для молодих щурів. Томічне дослідження не виявило ознак дистрофічних процесів. Гістологічна картина міокарда (рис. 5.23) була представлена упорядковано розташованими міокардіоцитами з характерною поперечною

смугастістю, наявністю одного—двох центрально розташованих, частіше базофільних ядер. Цитоплазма клітин – помірно еозинофільна. Сарколема і вставочні диски добре визначалися при значному збільшенні. Коронарна мікроваскулярна мережа добре розвинена, при мікроскопічному дослідженні між кардіоміоцитами позначалися довгасті гіперхромні ядра ендотелію капілярів.

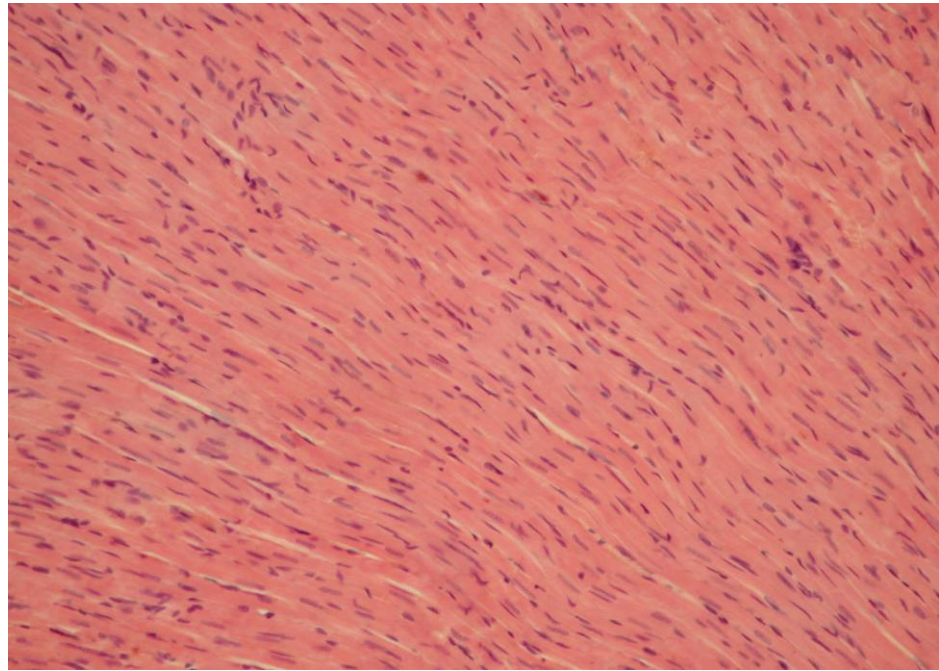


Рис. 5.23. Міокард молоді самиці. Забарвлення гематоксиліном-еозином, $\times 100$.

Співвідношення основних структурних компонентів міокарда у тварин групи 6 представлені в табл. 5.8.

Таблиця 5.8

Відносні об'єми основних структурних компонентів міокарда самиць, %

Структурні компоненти	Молоді самиці (група 6)	Старі самиці (група 2)	Старі самиці з введенням КФП (група 1)
Сполучна тканина	$7,0 \pm 0,5$	$12,4 \pm 0,8^*$	$9,2 \pm 0,7^{*,**}$
Судини	$6,0 \pm 0,02$	$7,6 \pm 0,04^*$	$7,0 \pm 0,12^{*,**}$
Кардіоміоцити	$87,0 \pm 3,5$	$80,0 \pm 2,0^*$	$83,8 \pm 3,2^{*,**}$

Примітки: * – вірогідність різниці з групою 6, $p < 0,05$.

** – вірогідність різниці з групою 2, $p < 0,05$.

При реакції Браше в цитоплазмі кардіоміоцитів виявлено накопичення РНП. Переважали клітини з помірно-позитивною реакцією. При цьому зустрічалися кардіоміоцити з високим рівнем накопичення РНП. Оптична щільність РНП у цитоплазмі кардіоміоцитів представлена в табл. 5.9. Інтенсивність реакції Фельгена-Россенбека на ДНП виявилася неоднорідною у різних ядрах. Оптична щільність ДНП в ядрах кардіоміоцитів представлена в табл. 5.9.

Таблиця 5.9

Оптична щільність РНП та ДНП в кардіоміоцитах міокарда самиць

Оптична щільність	Молоді самиці (група 6)	Самиці 18 міс (група 2)	Самиці 18 міс з введенням КФП (група 1)
РНП в цитоплазмі	0,334±0,02	0,211±0,05*	0,311±0,06*,**
ДНП в ядрі	0,124±0,03	0,199±0,04*	0,134±0,03*,**

Примітки: * – вірогідність різниці з групою 6, $p < 0,05$.

** – вірогідність різниці з групою 2, $p < 0,05$.

Індекс апоптозу клітинних елементів міокарда представлено в табл. 5.10, експресія CD 95 була незначною (рис. 5.24).

Таблиця 5.10

Індекс апоптозу клітин міокарда і оптична щільність світіння ендотеліну-1 і колагену IV типу в судинах міокарда самиць

Показник	Молоді самиці (група 6)	Старі самиці (група 2)	Старі самиці з введенням КФП (група 1)
Індекс апоптозу	3,2±0,2	6,4±0,7*	4,5±0,6*,**
Оптична щільність світіння ендотеліну – 1 (ум. од.)	0,236±0,07	0,114±0,08*	0,175±0,09*,**
Оптична щільність світіння колагену IV типу (ум. од.)	0,433±0,09	0,564±0,07*	0,458±0,05*,**

Примітки: * – вірогідність різниці з групою 6, $p < 0,05$.

** – вірогідність різниці з групою 2, $p < 0,05$.

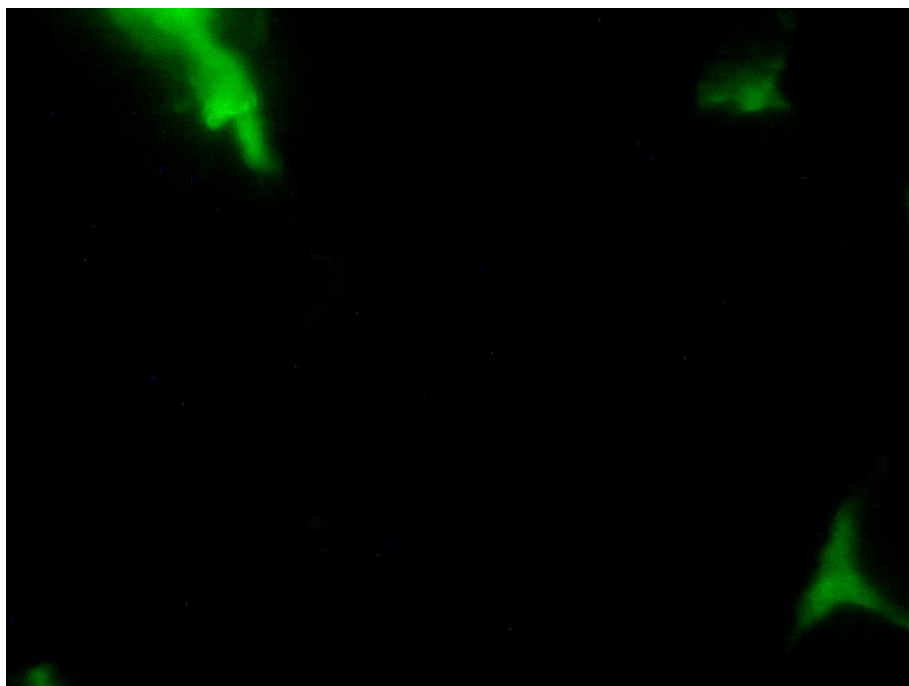


Рис. 5.24. Експресія CD95 у міокарді молоді самці. Прямий метод Кунса з МКА до CD95, $\times 600$.

Судини у тварин групи 6 були помірно кровонаповнені, ендотеліюцити розташовані в один ряд, виявляли нерівномірне світіння у препаратах, оброблених МКА до ендотеліну-1. Оптична щільність інтенсивності світіння ендотеліну-1 представлена в табл. 5.10. Субендотеліальні базальні мембрани тонкі, містили колаген IV типу. Оптична щільність інтенсивності світіння колагену IV типу віддзеркалювала його середньофізіологічний рівень (табл. 5.10).

Макроскопічно серце і судини самиць пізнього онтогенезу (група 2) мали декілька змінений вигляд. Спостерігалися деформації за рахунок склерозування або компенсаторної гіпертрофії. Розміри і вага коливалися в межах групи. При мікроскопічному дослідженні міокарда звертало на себе увагу порушення упорядкування міокардіоцитів, збільшення сполучнотканинного компонента. При цьому сполучна тканина розросталася як між кардіоміоцитами, так і периваскулярно (рис. 5.25). У більшості спостережень відзначався інтерстиціальний набряк.

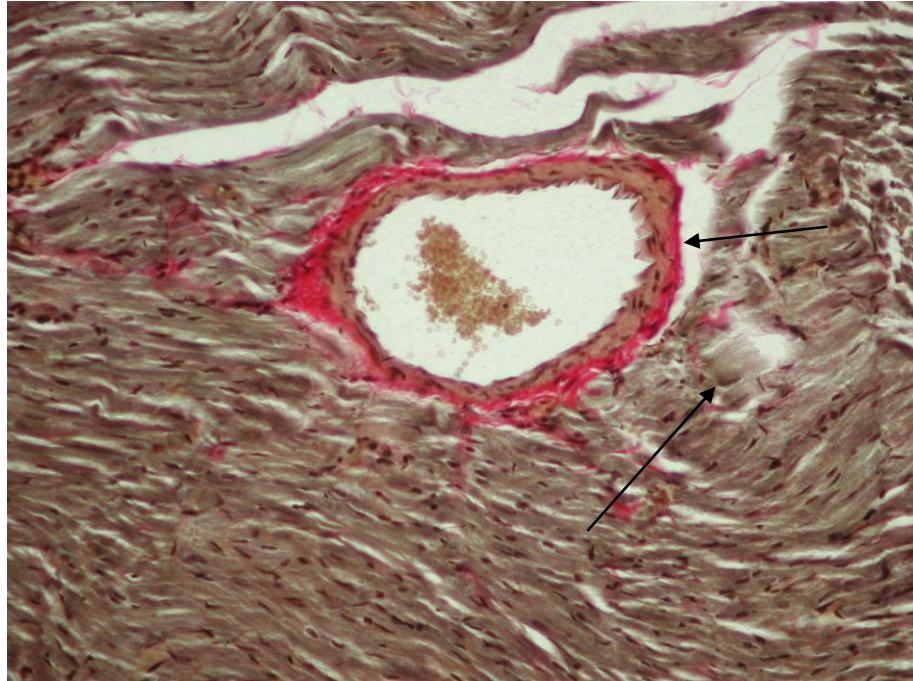


Рис. 5.25. Периваскулярний склероз і помірно виражений інтерстиціальний набряк у міокарді старої самиці. Забарвлення за Ван Гізон, $\times 100$.

Поперечна смугастість м'язових волокон була виражена помірно, місцями дуже слабо. Цитоплазма клітин нерівномірно забарвлена еозином – переважали зони помірної еозинофілії, однак частіше ніж в групі 6 спостерігалися скупчення кардіоміоцитів зі слабо еозинофільною цитоплазмою. Чітко визначалося нерівномірне фарбування цитоплазми кардіоміоцитів при забарвленні за Ван Гізон (рис. 5.26).

Відносний обсяг строми у тварин цієї групи достовірно перевищував показник групи 6. Відносний обсяг м'язових волокон виявився достовірно зниженим (див. табл. 5.8).

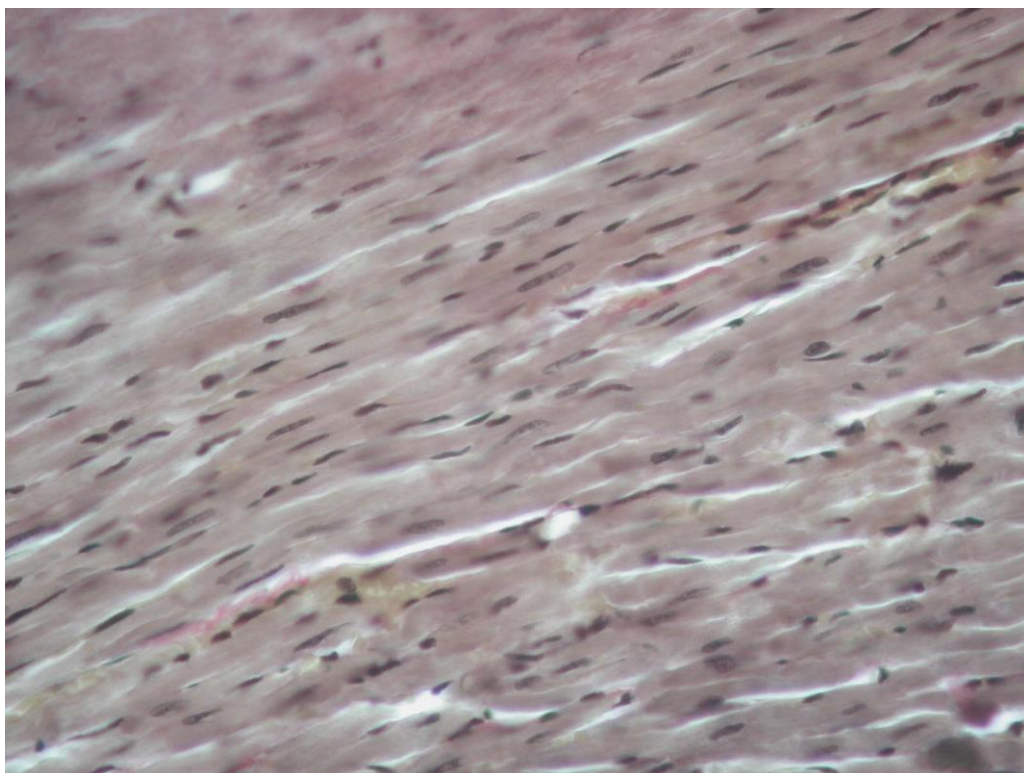


Рис. 5.26. Нерівномірне забарвлення цитоплазми кардіоміоцитів пікринової кислотою в міокарді старих самиць. Забарвлення за Ван Гізоном, х200.

Інтенсивність реакції Браше на РНП у цитоплазмі кардіоміоцитів старих самиць виявилася нерівномірною і в середньому нижче такої в групі 6 (табл. 5.9). Оптична щільність РНП у цитоплазмі кардіоміоцитів представлена в таблиці свідчить про достовірне зниження вмісту РНП у цитоплазмі цих клітин. Ядра клітин кілька витягнутої форми, помірно базофільні, частіше ніж в групі 6 відзначалися гіперхромні ядра. Як наслідок – інтенсивність реакції Фельгена-Россенбека на ДНП перевищила показник групи 6. Оптична щільність ДНП в ядрах кардіоміоцитів свідчила про достовірне збільшення вмісту в ядрах гетерохроматину.

Імуногістохімічне дослідження з МКА до CD95 (рис. 5.27) виявило більшу, в порівнянні з групою 6, кількість клітин, що експресують рецептори до CD95 (табл. 5.10).

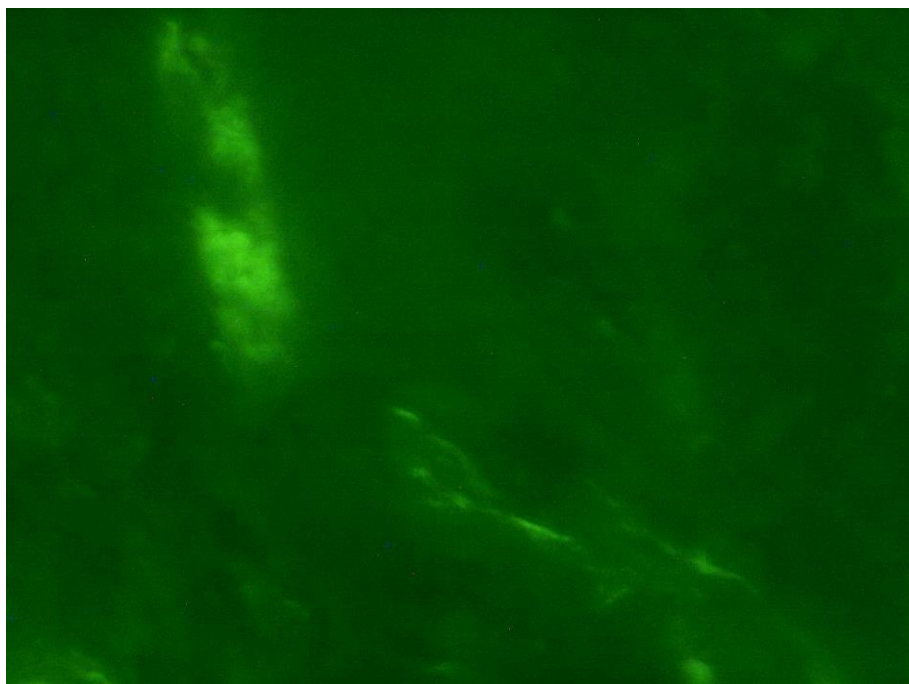


Рис. 5.27. Апоптозно змінені кардіоміоцити у міокарді старої самиці. Прямий метод Кунса з МКА до CD95, $\times 600$.

У результаті індекс апоптозу клітинних елементів міокарда перевищив подібний показник групи 6. З боку судинного компонента міокарда також виявлено суттєві зміни. Відносний обсяг судинного компонента був збільшений внаслідок потовщення та склерозування судинних стінок, що підтверджувалося при забарвленні препаратів пікрофуксином по Ван Гізон. У стінках судин при цьому виявлялося інтенсивне фуксинофільне фарбування. Судини були помірно кровенаповнені, ендотеліоцити розташовані в один ряд, місцями спостерігалася десквамація, виявлялося нерівномірне світіння у препаратах, оброблених МКА до ендотеліну-1. Оптична щільність інтенсивності світіння ендотеліну-1 у порівнянні з показниками тварин групи 6 була достовірно знижена (табл. 5.10). Субендотеліальні базальні мембрани мали нерівномірну товщину, містили колаген IV типу. Оптична щільність інтенсивності світіння колагену IV типу достовірно перевищила показник групи 6 (табл. 5.10).

Таким чином, у міокарді старих тварин, порівняно з молодими, виявлені морфологічні особливості з боку усіх основних структурних компонентів. У

стромальному компоненті спостерігалися ознаки розвитку склеротичних змін в інтерстиції й периваскулярних просторах, у м'язовому компоненті – зниження інтенсивності метаболічних процесів нуклеїнових кислот у кардіоміоцитах, а також посилення апоптозу клітинних елементів міокарда. З боку судинного компонента виявлено склероз судинних стінок, потовщення базальних мембран, підвищене накопичення у них колагену IV типу, зниження здатності ендотеліоцитів експресувати рецептори до ендотеліну-1. Усі вищевказані зміни можна розцінювати як вікові атрофічні ознаки.

При мікроскопічному вивченні міокарда самиць основної групи після імплантації КФП (група 1) виявлено потовщені м'язові волокна з помірно вираженою поперечною смугастістю, з одним–двома гіперхромними ядрами, що були розташовані центрально. При цьому в цитоплазмі кардіоміоцитів при забарвленні еозином переважали зони помірної еозинофілії, спостерігалися кардіоміоцити зі слабкоеозинофільною цитоплазмою. В однорядному шарі ендотеліоцитів коронарних капілярів визначено довгасті гіперхромні ядра.

Стромальний компонент був помірно розвинений, фуксинофільні сполучнотканинні волокна відзначалися між кардіоміоцитами і периваскулярно. Інтерстиціальний набряк не виражений (рис. 5.28).

Визначено принципову зміну співвідношення структур міокарда: збільшення частини кардіоміоцитів, зниження стромальної складової. Динаміка відносного обсягу судинного компонента віддзеркалювала виявлені розширені і повнокровні судини мікроциркуляторного русла, водночас як достовірний може розглядатися ангіогенез *de novo*, що відбувався під дією васкулопоетичних ростових плацентарних факторів (табл. 5.8).

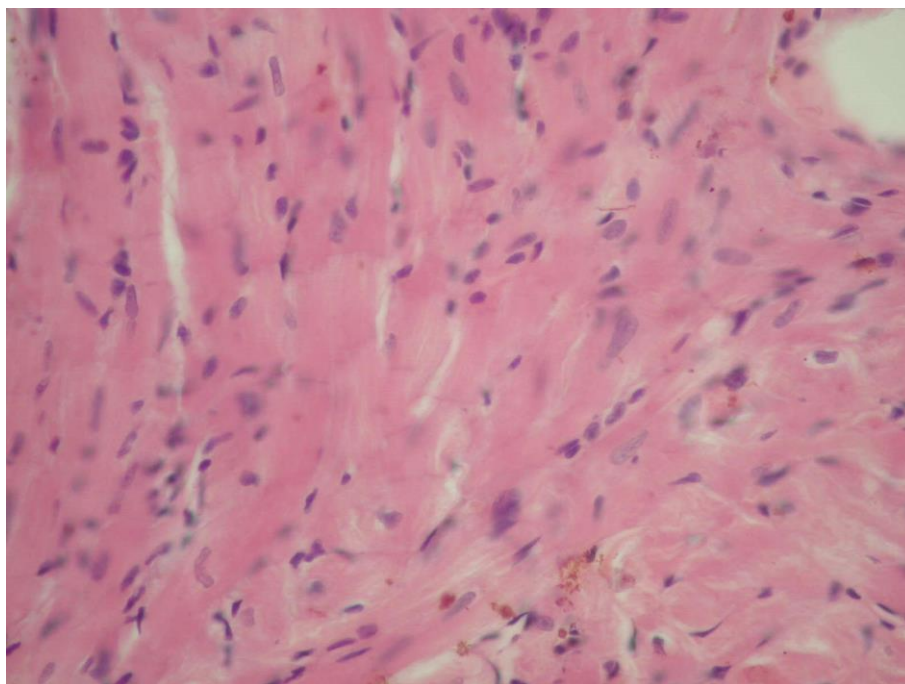


Рис. 5.28. Міокард самиці основної групи після імплантації КФП. Забарвлення гематоксиліном-еозином, $\times 400$.

Істотні зміни виявлено при гістохімічному дослідженні потенціалу генетичної детермінації у самиць після введення КФП. Так, оптична щільність РНП у цитоплазмі кардіоміоцитів достовірно підвищилася порівняно з такою у групі 2, а інтенсивність реакції Фельгена-Россенбека на ДНП, навпаки, достовірно знизилася, що вказує на більш високу функціональну активність клітини (табл. 5.9). Вірогідніше за все, це пов'язано зі зниженням інтенсивності апоптозних змін у клітинах міокарда тварин цієї групи. Як видно з табл. 5.10, апоптозний індекс клітинних елементів міокарда був достовірно знижений. Вміст колагену IV типу в базальних мембранах судин знизився, а інтенсивність експресії рецепторів до ендотеліну-1 підвищилася (рис. 5.29).

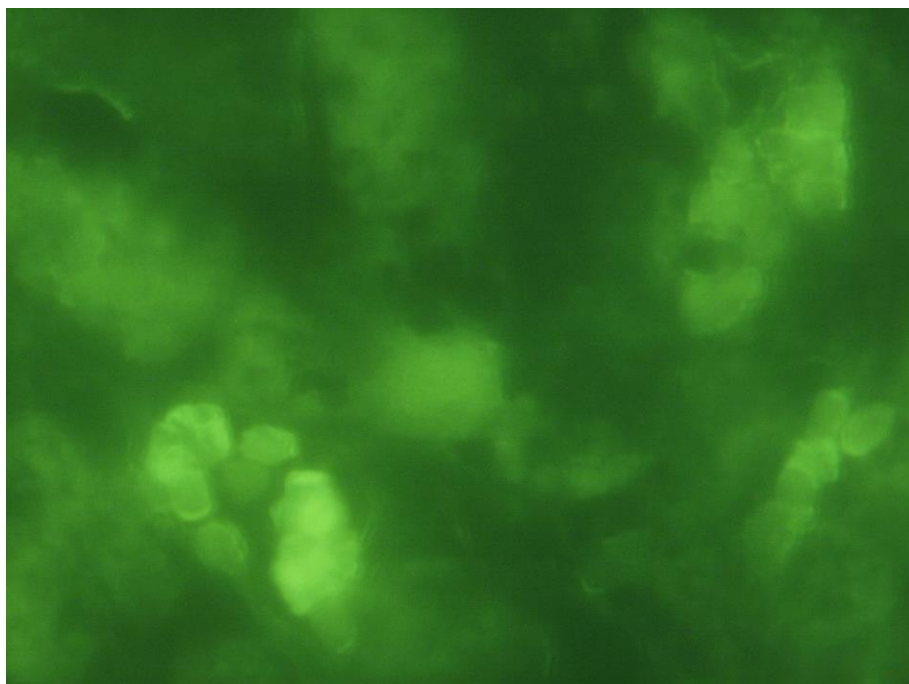


Рис. 5.29. Яскраве світіння ендотеліоцитів, які експресують рецептори до ендотеліну-1 у міокарді старих самиць на фоні імплантації КФП. Прямий метод Кунса з МКА до ендотеліну-1, $\times 600$.

Таким чином, в міокарді старих самиць після імплантації кріоконсервованих фрагментів плаценти виявляються морфологічні ознаки, які свідчать про поліпшення метаболічних процесів у кардіоміоцитах, зокрема активізується обмін нуклеопротеїдів. Можливо, з цим пов'язане виявлене зменшення інтенсивності апоптозу клітинних елементів міокарда. До сприятливих ознак слід віднести також зниження інтенсивності накопичення у базальних мембранах судин колагену IV типу, і можливо, як наслідок цього – підвищення здатності ендотеліоцитів експресувати рецептори до ендотеліну-1, що є структурно-функціональною складовою поліпшення мікрогемодинаміки у серцевому м'язі, відповідно активації його оксигенації і трофіки. Все це може бути пояснено модулюючою дією біологічно активних складових плаценти.

5.2.3. Морфофункціональний стан печінки самиць експериментальних тварин.

При мікроскопії (рис. 5.30) печінки молодих самиць (група 6) чітко виявлялась часточкова будова паренхіми. Міжчасточкова сполучна тканина не виражена. Центральні вени частіше були вільними від крові, а синусоїдні капіляри – помірно повнокровними. Між часточками чітко візуалізувалися тріади, представлені печінковою артерією, портальною веною і жовчним протоком. Печінкові трабекули, що склалися з радіально орієнтованих гепатоцитів, були чітко представлені. Між трабекул розташовувалися синусоїди. Гепатоцити мали типову неправильну форму, частіше містили одне, рідше – два ядра. Ядра клітин округлі, великі. Спостерігалися клітини з більш великими поліплоїдними ядрами. Цитоплазма більшості гепатоцитів була помірно еозинофільною.

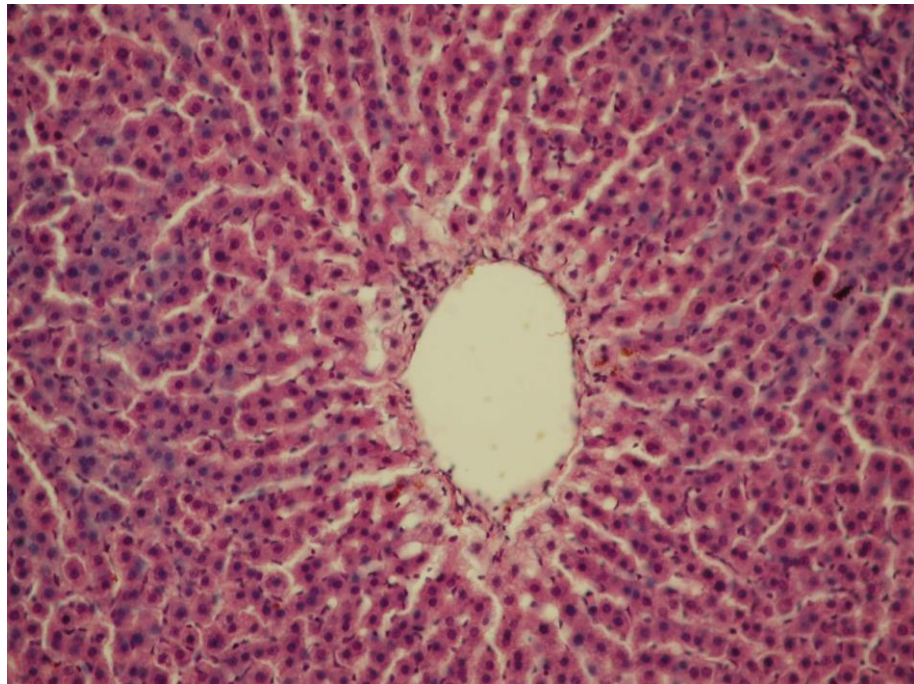


Рис 5.30. Вільна від крові центральна вена часточки, радіальна будова трабекул, забарвлена еозином цитоплазма гепатоцитів у печінці молоді самиці. Забарвлення гематоксиліном-еозином, $\times 120$.

Оптична щільність РНП та ДНП у гепатоцитах самиць контрольної групи відповідала показникам молодого віку експериментальних тварин (табл. 5.11).

Таблиця 5.11

Оптична щільність РНП та ДНП в гепатоцитах самиць

Оптична щільність	Молоді самиці (група 6)	Старі самиці (група 2)	Старі самиці з введенням КФП (група 1)
РНП у цитоплазмі	0,222±0,04	0,156±0,04*	0,198±0,05*,**
ДНП в ядрі	0,113±0,04	0,146±0,07*	0,123±0,06*,**

Примітки: * – вірогідність різниці з групою 6, $p < 0,05$;

** – вірогідність різниці з групою 2, $p < 0,05$

Ендотеліоцити були розташовані в один ряд, виявляли нерівномірне світіння у препаратах, оброблених МКА до ендотеліну-1. Оптична щільність інтенсивності світіння ендотеліну-1 представлена в табл. 5.12. Субендотеліальні базальні мембрани тонкі, містили невелику кількість колагену IV типу. Оптична щільність інтенсивності світіння колагену IV типу, апоптозний індекс представлені в табл. 5.12.

Таблиця 5.12

Індекс апоптозу клітин і оптична щільність світіння ендотеліну-1 і колагену IV типу в судинах печінки самиць основної групи

Показник	Молоді самиці (група 6)	Старі самиці (група 2)	Старі самиці з введенням КФП (група 1)
Індекс апоптозу	6,4±0,9	12,4±1,5*	9,0±0,9**
Оптична щільність світіння ендотеліну – 1 (ум. од.)	0,213±0,05	0,135±0,05*	0,169±0,04*
Оптична щільність світіння колагену IV типу (ум. од.)	0,398±0,07	0,411±0,08	0,400±0,07

Примітки: * – вірогідність різниці з групою 6, $p < 0,05$;

** – вірогідність різниці з групою 2, $p < 0,05$.

Печінка старих самиць мала декілька змінений вигляд з ознаками деформації і дистрофії. Мікроскопічна картина відрізнялась від такої у молодих самиць. Часточкова будова паренхіми печінки була представлена чітко. Однак міжчасточкова сполучна тканина була більш розвинена, що добре визначалося при фарбуванні пікрофуксином за Ван Гізон. Судини помірно повнокровні.

Тріади, представлені печінковою артерією, порталною веною і жовчним протоком, визначалися між часточками досить чітко. Печінкові трабекули склалися з радіально орієнтованих гепатоцитів. При цьому виявлено зони, в яких була порушена трабекулярна будова органа (рис. 5.31) Гепатоцити мали неправильну форму, частіше містили одне, рідше – два ядра. Ядра клітин округлі, великі. Інтенсивність реакції Фельгена-Россенбека на ДНП виявилася більш вираженою порівняно з групою 6, як наслідок – оптична щільність ДНП в ядрах гепатоцитів достовірно збільшилася (див. табл. 5.11). Цитоплазма клітин була помірно еозинофільною, зустрічалися клітини з слабкоеозинофільною і слабкобазофільною цитоплазмою. Як відомо, така різноманітність забарвлення цитоплазми гепатоцитів обумовлена нерівномірним накопиченням у ній глікогену, РНП, ліпідів. При реакції Браше у цитоплазмі гепатоцитів виявлена більш слабка в порівнянні з контрольною групою накопичення РНП, на що вказує і показник оптичної щільності РНП у цитоплазмі гепатоцитів (табл. 5.11). Серед гепатоцитів спостерігалися клітини, в цитоплазмі яких при фарбуванні гематоксиліном і еозином виявлялися порожнечі, які відповідали локалізації внутрішньоклітинних ліпідів. У цитоплазмі гепатоцитів старих тварин виявлялися ознаки гіаліново-крапельної та жирової дистрофії (рис. 5.31).

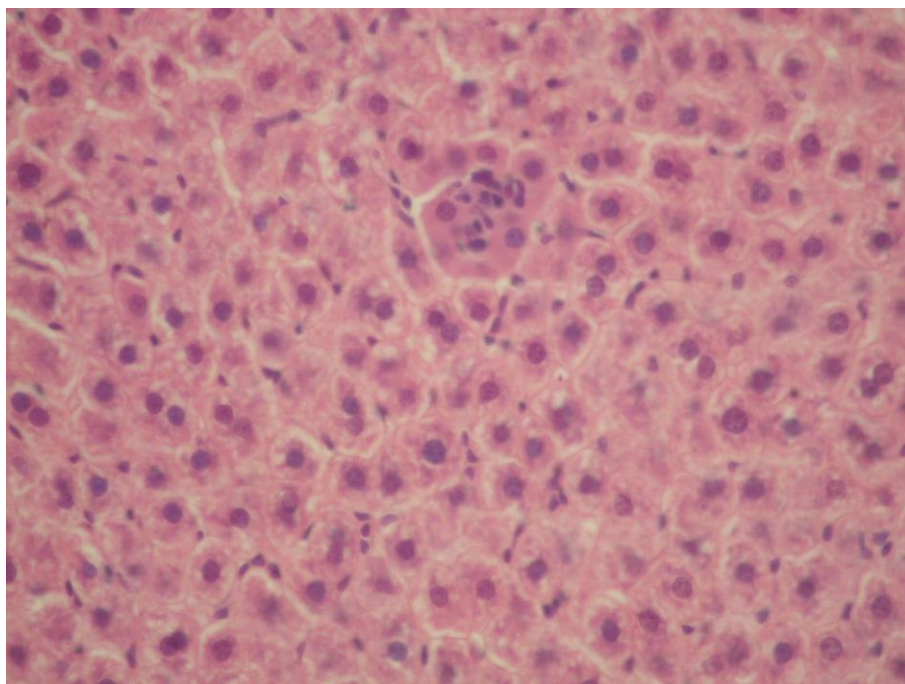


Рис. 5.31. Дрібнокрапельна жирова дистрофія у цитоплазмі гепатоцитів старої самиці. Порушення трабекулярної будови частки. Забарвлення гематоксиліном і еозином, $\times 200$.

Якщо у молодих самиць дистрофічні зміни визначалися дуже рідко і переважно у цитоплазмі гепатоцитів, прилеглих до центральних вен, то у старих самиць ознаки альтерації виявлялися по всій часточці.

Індекс апоптозу клітинних елементів печінки в даній групі достовірно перевищив показник тварин з групи 6 (табл. 5.12). Ендотеліоцити були розташовані в один ряд, виявляли більш слабе світіння у препаратах, оброблених МКА до ендотеліну-1. Оптична щільність інтенсивності світіння ендотеліну-1 виявилася нижчою, ніж у самиць групи 6 (табл. 5.12). Базальні мембрани були нерівномірної товщини, переважно тонкі, містили колаген IV типу (рис. 5.32). При цьому оптична щільність інтенсивності світіння колагену IV перевищувала такий показник у молодих самиць.

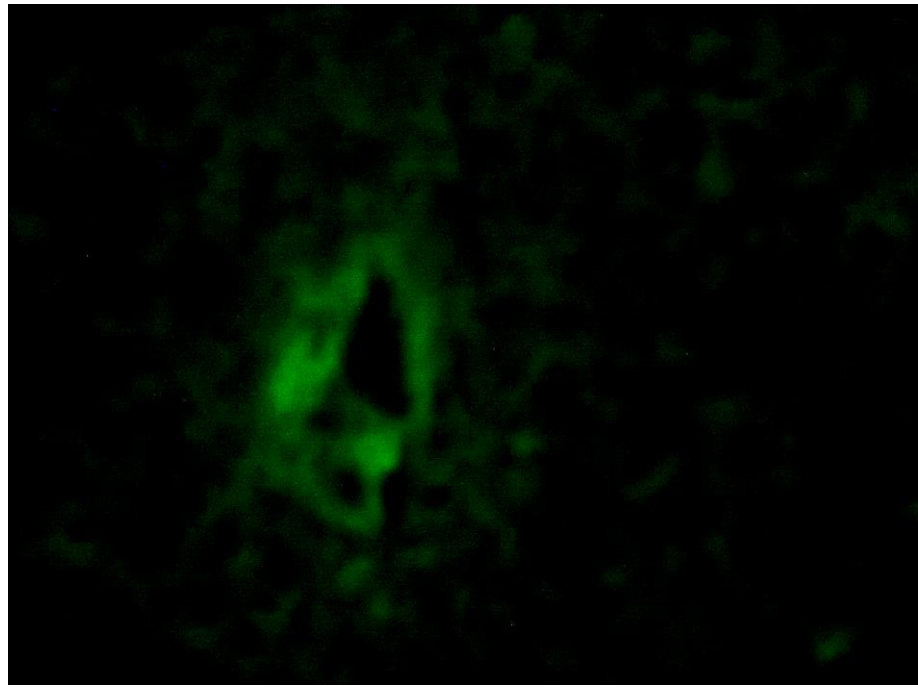


Рис. 5.32. Нерівномірне, місцями яскраве світіння колагену IV типу в судинах тріади печінки старої самиці. Прямий метод Кунса з МКА до колагену IV типу, $\times 600$.

Таким чином, у печінці старих щурів-самиць, порівняно з молодими, виявлено морфологічні особливості, які свідчили про розвиток склеротичних процесів посилення внутрішньоклітинної альтерації на фоні помірно виражених компенсаторно-приспосувальних процесів у вигляді проліферації гепатоцитів із порушенням трабекулярної будови часточок. У гепатоцитах визначено ознаки зниження інтенсивності метаболічних процесів нуклеїнових кислот, а також посилення апоптозу клітинних елементів печінки. З боку судинного компонента виявлено підвищене накопичення колагену IV типу, зниження здатності ендотеліоцитів експресувати рецептори до ендотеліну-1. Всі вищевказані зміни свідчать про дистрофічно-інволютивне старіння печінки тварин даної експериментальної групи.

Проведення імплантації КФП змінило морфофункціональний стан печінки старих самиць щурів. Печінка мала декілька збільшений розмір, правильний обрис. Мікроскопічно визначалась збереженість часточкової будови паренхіми

печінки, об'єм міжчасточкової сполучної тканини був менший, ніж у тварин попередньої групи. Центральна вена і синусоїди помірно повнокровні. Печінкові триади визначалися між часточками чітко. Більшість печінкових трабекул склалися з радіально орієнтованих гепатоцитів, водночас відзначалися зони, в яких порушено трабекулярну будову часточок печінки, що було обумовлено попередніми віковими змінами і посиленими репаративними процесами (рис. 5.33).

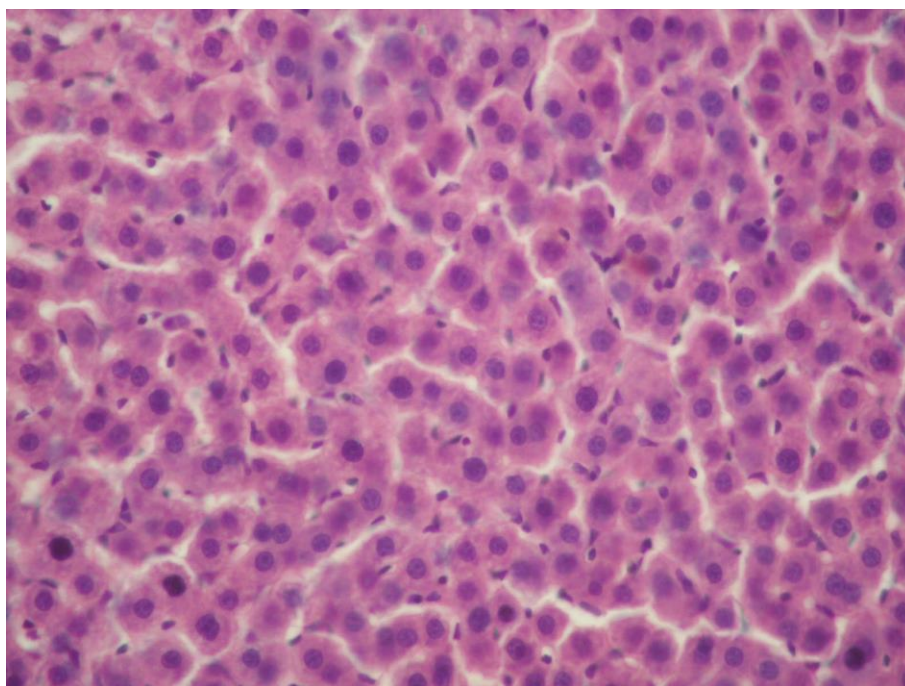


Рис. 5.33. Мікроскопія печінки самиці щура на фоні імплантації КФП. Забарвлення гематоксиліном і еозином, $\times 400$.

Гепатоцити мали типову форму, частіше збільшений розмір, містили одне-два великих ядра. Нерідко спостерігалися поліплоїдні клітини з гіперхромними ядрами. Інтенсивність реакції Фельгена-Россенбека на ДНП виявилася зниженою у порівнянні з групою 2, в результаті чого оптична щільність ДНП в ядрах гепатоцитів дещо зменшилася (див. табл. 5.11). Інтенсивність реакції Браше була посиленою в порівнянні з спостереженнями 2-ої групи, на що вказує показник оптичної щільності РНП в цитоплазмі гепатоцитів, представлений в таблиці 5.17.

Цитоплазма клітин помірно еозинофільна, зустрічалися клітини з яскравоеозинофільною цитоплазмою. Зрідка, переважно у цитоплазмі гепатоцитів, прилеглих до центральних вен, виявлялися ознаки гіаліново-крапельної дистрофії, окремі вакуолі і порожнечі, що свідчило про попередні інволютивні процеси. Гепатоцити периферичних відділів часточок виявлялися декілька збільшеними. Це відбувалося за рахунок активації однієї з основних їх функцій – накопичення енергетичних сполук.

Оптична щільність РНП, що віддзеркалює вміст нуклепротеїда, який детермінує анаболічну активність у цитоплазмі гепатоцитів, після введення старим самицям щурів КФП підвищилася.

Частіше, ніж у молодих самиць, однак рідше, ніж в групі 2, у цитоплазмі гепатоцитів тварин групи 1 виявлялися, клітини з ознаками альтерації, які локалізувалися переважно в зонах, прилеглих до центральних вен, що свідчило про напруження функцій цих клітин, у першу чергу – екскреції продуктів метаболізму, що активувався. Додатковим підтвердженням цього стало виявлення збільшення перисинусоїдальних просторів Дісе.

Ендотеліоцити були розташовані в один ряд, експресували рецептори до ендотеліну-1. При цьому оптична щільність інтенсивності світіння ендотеліну-1 виявилася вищою, ніж у старих самиць, яким не проводили імплантацію КФП (табл. 5.12).

Базальні мембрани тонкі, містили знижену (відносно хибнооперованих тварин) кількість колагену IV типу. Оптична щільність інтенсивності світіння колагену IV перевищувала показник групи 2 (табл. 5.12).

Визначено зниження індексу апоптозу за рівнем CD95 – мембранного рецептора, який ініціює апоптоз (табл. 5.12, рис. 5.34).



Рис. 5.34. Гепатоцит з експресією рецепторів до CD95 у печінці самиці щура основної групи на фоні імплантації КФП. Непрямий метод Кунса з МКА до CD95, $\times 600$.

Таким чином, у печінці старих самиць після імплантації КФП відбувається суттєве відновлення паренхіми за рахунок зменшення виявленого раніше значного дифузного фіброзу до перипортального фіброзу, нівелювалися явища жирової дистрофії.

Водночас виявлено морфологічні ознаки, що свідчили про поліпшення метаболічних процесів у гепатоцитах, зокрема про активізацію обміну нуклеопротейдів. Одночасне відновлення ефективної мікрогемодинаміки обумовило зниження інтенсивності внутрішньоклітинної альтерації, а також зменшення інтенсивності апоптозу клітинних елементів печінки.

Інтеграція отриманих даних дозволяє інтерпретувати їх як результат активних репаративних процесів у печінці самиць в період пізнього онтогенезу на фоні введення КФП.

5.2.4. Вплив імплантації кріоконсервованих фрагментів плаценти на статеву систему і репродуктивну функцію самиць в період пізнього онтогенезу.

При дослідженні естрального циклу у всіх молодих самиць щурів (група 6) спостерігали 4–5-денний регулярний цикл за результатами вагінальних мазків. Після спарювання з самцями усі тварини завагітніли та народили здоровий приплід.

При макроскопічному дослідженні яєчників їх форма була округлою, білочна оболонка – тонкою або трохи потовщеною, іноді виявлялося більш виражене потовщення. Поверхня яєчників – дрібнозерниста. На розрізі – тканина яєчників сірувато-рожевого кольору, нерідко з наявністю дрібних або середніх розмірів порожнин округлої форми, наповнених прозорою або бурою рідиною. Масові коефіцієнти яєчників у середньому складали $0,043 \pm 0,0041$ (табл. 5.13).

Таблиця 5.13

Масові коефіцієнти статевих органів самиць щурів досліджуваних груп, (г/100г маси тварини) $M \pm m$

Показник	Молоді самиці (група 6)	Старі самиці (група 2)	Старі самиці з імплантацією КФП (група 1)
Масові коефіцієнти яєчників	$0,043 \pm 0,0041$	$0,035 \pm 0,0032$	$0,040 \pm 0,002^{**}$
Масові коефіцієнти матки	$0,234 \pm 0,032$	$0,150 \pm 0,018^{*}$	$0,220 \pm 0,019^{**}$

Примітки: * – вірогідність різниці з групою 6, $p < 0,05$;

** – вірогідність різниці з групою, 2 $p < 0,05$.

При мікроскопічному дослідженні в яєчниках виявлялися усі типові генеративні елементи яєчника на різних стадіях розвитку (рис. 5.35), співвідношення генеративних елементів відповідало фізіологічній нормі (табл. 5.14). У яєчниках зустрічалися ніжні колагенові волокна, які забарвлювалися

пікрофуксином за Ван Гізон. Ріст і дозрівання фолікулів у даній групі були достатніми.

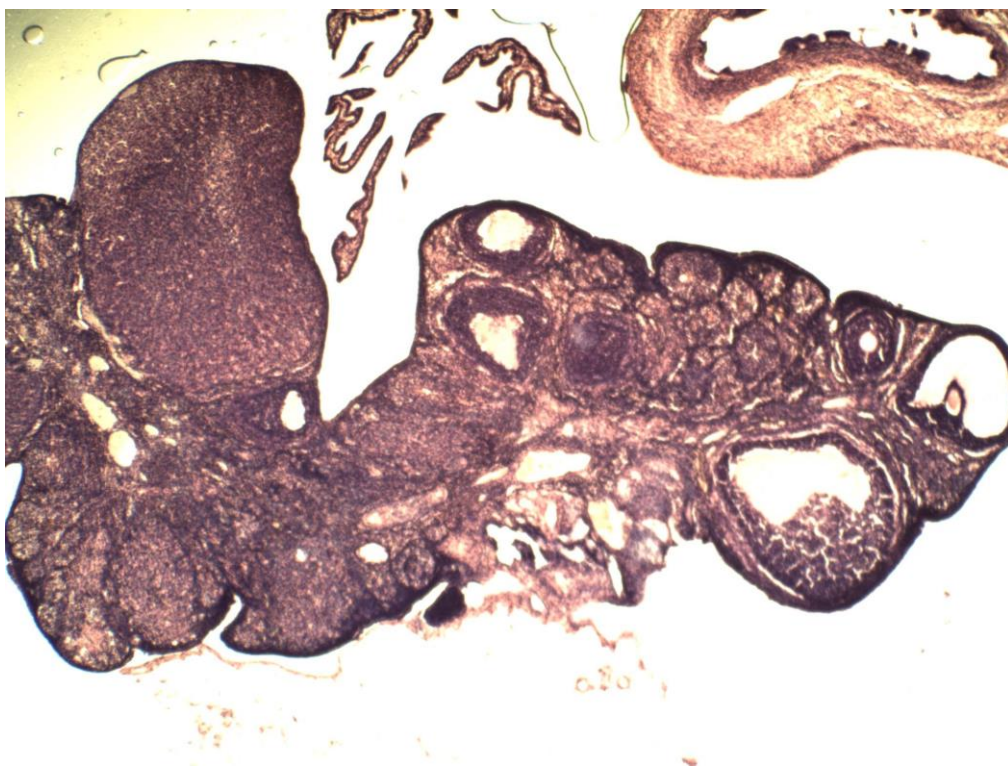


Рисунок 5.35. Яєчник молоді самки щура, присутні всі генеративні елементи, гематоксілін –еозин x 100.

Таблиця 5.14

Кількість генеративних елементів в яєчниках самок щурів досліджуваних груп, $M \pm m$

Показники	Молоді самки (група 6)	Старі самки (група 2)	Старі самки з імплантацією КФП (група 1)
Примордіальні фолікули	851,5±56,8	212,4±28,3*	223,1±32,1*
Фолікули, які ростуть	52,3±1,3	21,2±2,1*	42,2±3,5*,**
Зрілі фолікули	6,1±1,2	2,3±0,3*	5,1±0,5*,**
Атретичні фолікули	853,5±61,1	1383±125,2*	1311,5±98,4*
Жовті тіла	8,7±0,6	4,2±1,5*	7,5±0,8**
Загальна кількість генеративних елементів	1777,2±123	1621,2±145,3	1589,2±176,8

Примітки: * – вірогідність різниці з групою 6, $p < 0,05$;

** – вірогідність різниці з групою 2, $p < 0,05$.

Проведені гістохімічні дослідження яєчників даної групи тварин дозволили встановити найбільш інтенсивне світіння при реакції на ДНП серед усіх груп спостережень. При зростанні та дозріванні фолікула інтенсивність реакції на ДНП у ядрах клітин гранульози зростаючих, дозріваючих і атлетичних фолікулів, а також кист знижується, відповідно зменшується оптична щільність (табл. 5.15).

Таблиця 5.15

Оптична щільність РНП та ДНП у клітинах яєчників самиць досліджуваних груп, $M \pm m$

Оптична щільність (ум.од.)	Молоді самиці (група 6)	Старі самиці (група 2)	Старі самиці з імплантацією КФП (група 1)
ДНП	$0,193 \pm 0,007$	$0,233 \pm 0,003^*$	$0,189 \pm 0,006^{**}$
РНП	$0,261 \pm 0,009$	$0,153 \pm 0,008^*$	$0,241 \pm 0,005^{**}$

Примітки: * – вірогідність різниці з групою 6, $p < 0,05$;

** – вірогідність різниці з групою 2, $p < 0,05$.

При імуногістохімічному дослідженні з МКА до CD95 виявлено специфічне світіння окремих клітин мікропрепаратів яєчників цих тварин (рис.5.36). Значення апоптозного індексу віддзеркалювало органоспецифічні циклічні процеси, що відбувалися в яєчнику. Використання МКА до колагену IV типу виявило слабе осередкове світіння базальних мембран судин і ендотелію. Оптична щільність інтенсивності світіння колагену IV типу представлена в табл. 5.16. У деяких полях зору в просвіті судин яєчників виявлено світіння ендотеліоцитів помірної інтенсивності, які експресують рецептори до ендотеліну-1. Оптична щільність світіння ендотеліну-1 наведена в табл. 5.16.

Таблиця 5.16

Індекс апоптозу клітин яєчників і оптична щільність світіння ендотеліну-1 і колагену IV типу в судинах яєчників самиць досліджуваних груп, $M \pm m$

Показники	Молоді самиці (група 6)	Старі самиці (група 2)	Старі самиці з імплантацією КФП (група 1)
Індекс апоптозу	$4,0 \pm 0,1$	$6,9 \pm 0,3^*$	$4,7 \pm 0,6^{**}$
Оптична щільність світіння ендотеліну-1 (ум.од.)	$0,234 \pm 0,08$	$0,211 \pm 0,04^*$	$0,222 \pm 0,05$
Оптична щільність світіння колагену IV типу (ум.од.)	$0,156 \pm 0,07$	$0,198 \pm 0,03^*$	$0,165 \pm 0,02^{**}$

Примітки: * – вірогідність різниці з групою 6, $p < 0,05$;

** – вірогідність різниці з групою 2, $p < 0,05$.

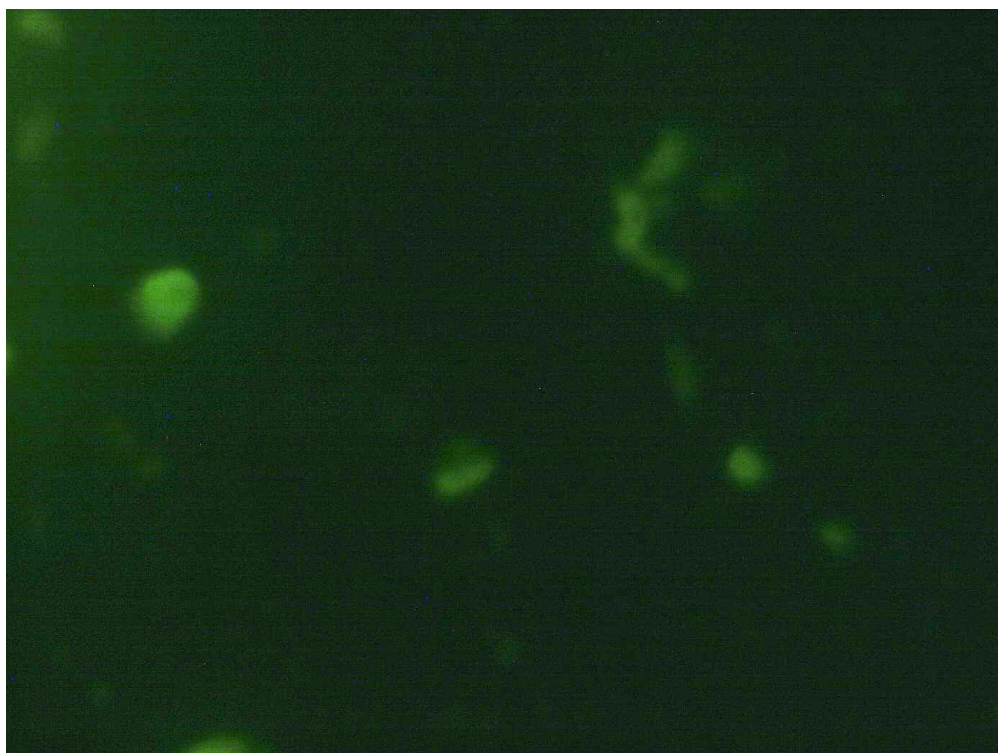


Рис. 5.36. Апоптозмінені клітини в яєчнику 5-місячної самиці. Прямий метод Кунса з МКА до CD95, $\times 400$.

Стан матки у експериментальних тварин є біологічним тестом для визначення функціональної активності яєчників, оскільки їх гормони впливають на ступінь проліферативних процесів у ній. Морфологічна будова матки тварин групи 6 відповідала фазам проєструсу і еструсу. Макроскопічно роги матки були помірно потовщені, повнокровні. На розрізі виявлялася виражена складчастість слизової оболонки. Масові коефіцієнти матки наведені у таблиці 5.13.

При вивченні мікроскопічної картини маток (рис. 5.37) спостерігали виражений потовщений ендометрій, в стромі якого виявлено як поодинокі, так і групи залоз, характерні для репродуктивного віку (табл. 5.17).

Таблиця 5.17

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

Показники	Молоді самиці (група 6)	Старі самиці (група 2)	Старі самиці з імплантацією КФП (група 1)
Кількість поодиноких залоз ендометрія на зрізі	$5,2 \pm 0,45$	$4,0 \pm 0,3^*$	$5,0 \pm 0,35^{**}$
Кількість груп залоз на зрізі	$6,3 \pm 0,4$	$1,2 \pm 0,1^*$	$4,2 \pm 0,34^* **$
Діаметр залози, мкм	$32,1 \pm 2,4$	$12,3 \pm 1,2^*$	$28,3 \pm 2,5^{**}$
Товщина стромы ендометрія, мкм	$55,5 \pm 4,3$	$10,3 \pm 1,2^*$	$48,5 \pm 4,6^{**}$
Товщина ендометрія, мкм	$253,3 \pm 20,5$	$149,2 \pm 12,2^*$	$230,5 \pm 23,4^{**}$
Товщина міометрія, мкм	$72,2 \pm 7,2$	$40,5 \pm 5,7^*$	$52,5 \pm 5,4^{**}$

Примітки: * – вірогідність різниці з групою 6, $p < 0,05$;

** – вірогідність різниці з групою 2, $p < 0,05$.



Рис. 5.37. Матка молоді самиці: велика кількість залоз, потовщений ендометрій, строма ендометрія. Забарвлення за гематоксиліном-еозином, $\times 40$.

Отримані дані оптичної щільності ДНП та РНП в матках молодих самиць (табл. 5.18) свідчать про достатньо високий рівень активності нуклеопротеїдів щодо детермінації специфічного циклічного відновлення структури і функціонування органа репродукції.

Таблиця 5.18

Оптична щільність РНП та ДНП у клітинах матки самиць досліджуваних груп, $M \pm m$.

Оптична щільність (ум.од.)	Молоді самиці (група 6)	Старі самиці (група 2)	Старі самиці з імплантацією КФП (група 1)
ДНП	$0,131 \pm 0,01$	$0,172 \pm 0,01^*$	$0,152 \pm 0,005^{* **}$
РНП	$0,161 \pm 0,023$	$0,139 \pm 0,002^*$	$0,151 \pm 0,01^{**}$

Примітки: * – вірогідність різниці з групою 6, $p < 0,05$;

** – вірогідність різниці з групою 2, $p < 0,05$.

При дослідженні статевого циклу старих тварин (група 2) спостерігали подовження циклу до 6–7 днів, дві самиці знаходилися у фазі дієструсу протягом всього періоду спостереження. Жодна з самок не завагітніла після спарювання з молодими самцями (репродуктивного віку).

Макроскопічно яєчники самиць групи 2 відрізнялися від яєчників

молодих тварин за рахунок зон склеротичних деформацій, масові коефіцієнти гонад були нижчими, що пов'язано зі зменшенням розмірів яєчників і збільшенням маси самок (див. табл. 5.13).

Мікроскопічно спостерігали зменшення кількості фолікулів на всіх стадіях розвитку (рис. 5.38). Спостерігалися поодинокі зрілі фолікули, при збільшенні кількості жовтих тіл та атретичних фолікулів (табл. 5.14).



Рис. 5.38. Яєчник старої самиці щура, превалюють атретичні елементи, Забарвлення гематоксиліном і еозином, $\times 40$.

При гістохімічному забарвленні в клітинах яєчника спостерігали підвищення оптичної щільності ДНП та зниження – РНП (див. табл. 5.15). Імуногістохімічне дослідження виявило специфічне світіння клітин у мікропрепаратах яєчників цих тварин. Відмічено достовірне збільшення апоптозного індексу клітинних елементів яєчників (табл. 5.16). У базальних мембранах судин і епітелію порівняно з молодими тваринами виявлено більш яскраве світіння колагену IV типу. Інтенсивність світіння (табл. 5.16) ендотеліоцитів, що експресують рецептори до ендотеліну-1, в порівнянні з

групою молодих самок була зниженою (рис. 5.39), про що свідчив показник оптичної щільності світіння ендотеліну-1 (табл. 5.16).

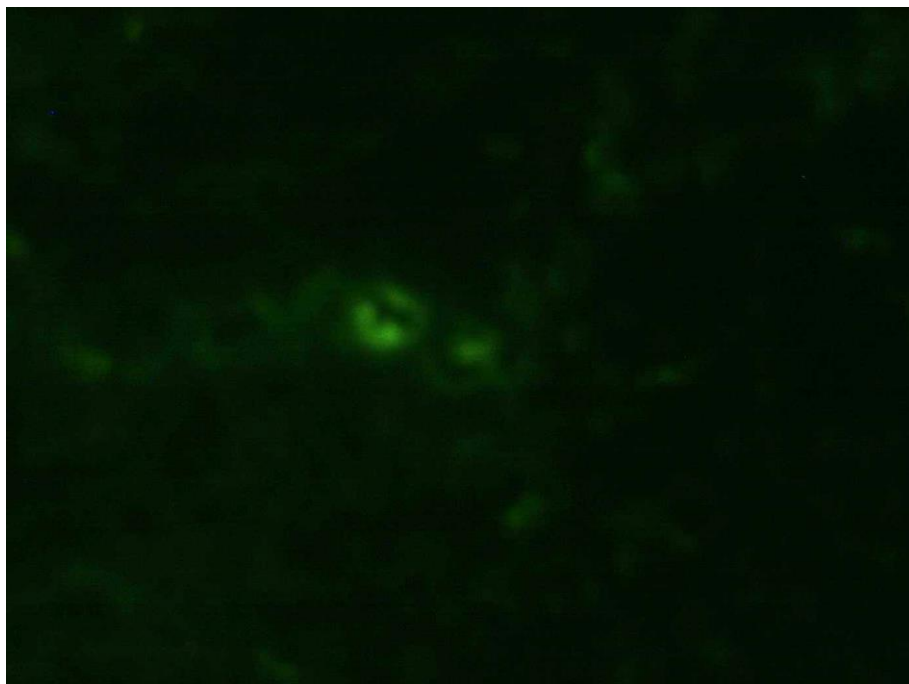


Рис. 5.39. Поодинокі ендотеліоцити, що експресують рецептори до ендотеліну-1 у судинах яєчника старої самиці. Прямий метод Кунса з МКА до ендотеліну-1, $\times 400$.

Макроскопічно роги матки у старих самиць щурів були атрофічними, потоншеними, масові коефіцієнти – достовірно знижені (див. табл. 5.13). На розрізі складчастість слизової оболонки – згладжена. При мікроскопічному дослідженні ендометрія виявлялася помірна гіпоплазія, сплющення і дифузний розвиток сполучної тканини (рис. 5.40.), групові залози практично не виявлялися, поодинокі мали меншій діаметр, ніж у молодих самок. Строма ендометрія, міометрій також були достовірно стоншені (див. табл. 5.17). Показник оптичної щільності ДНП був підвищеним, що свідчило про збільшення гетерохроматину, а РНП, як показника потенціалу анаболічних процесів, – знижено у порівнянні з молодими самицями (див. табл. 5.15).

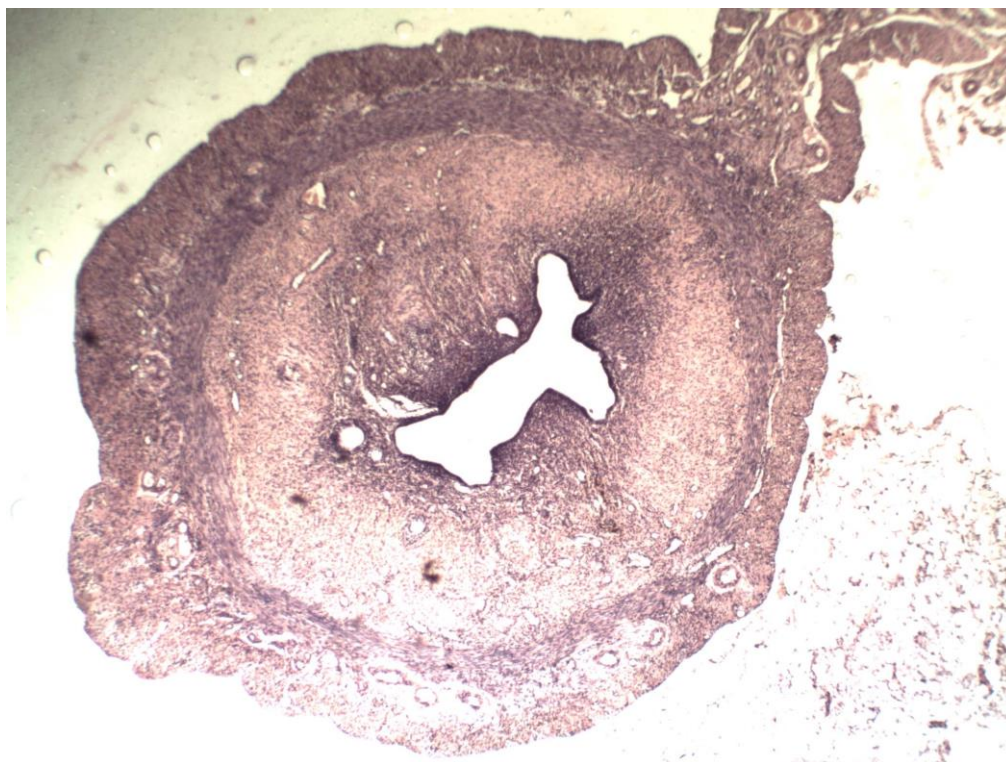


Рис. 5.40. Матка старої самиці щура, атрофічні зміни, зменшення кількості залоз, групових залоз немає. Забарвлення гематоксиліном і еозином, $\times 40$.

Після спарювання з самцями репродуктивного віку жодна самиця групи 2 не завагітніла.

Після імплантації КФП, починаючи з 10-ї доби щури-самиці основної групи 1, ставали рухливіші, у них підвищувався апетит і спостерігалось відновлення статевої активності. При дослідженні естрального циклу цих тварин після імплантації КФП середня тривалість циклу відновилась до 4–5 діб, проте одна самиця постійно знаходилась у дієструсі.

При макроскопічному дослідженні яєчників виявлено: при наявності ознак деякої фіброзної деформації за масовим коефіцієнтом вони достовірно не відрізнялися від яєчників молодих самок (див. табл. 5.13). При мікроскопічному дослідженні виявлено, що при невеликій кількості примордіальних фолікулів та збільшенні третичних у порівнянні з молодими самицями звертало на себе увагу те, що кількість зростаючих фолікулів та жовтих тіл значно перевищувала цей показник у старих хибнооперованих самиць (без імплантації КФП) (табл. 5.14,

рис. 5.41).

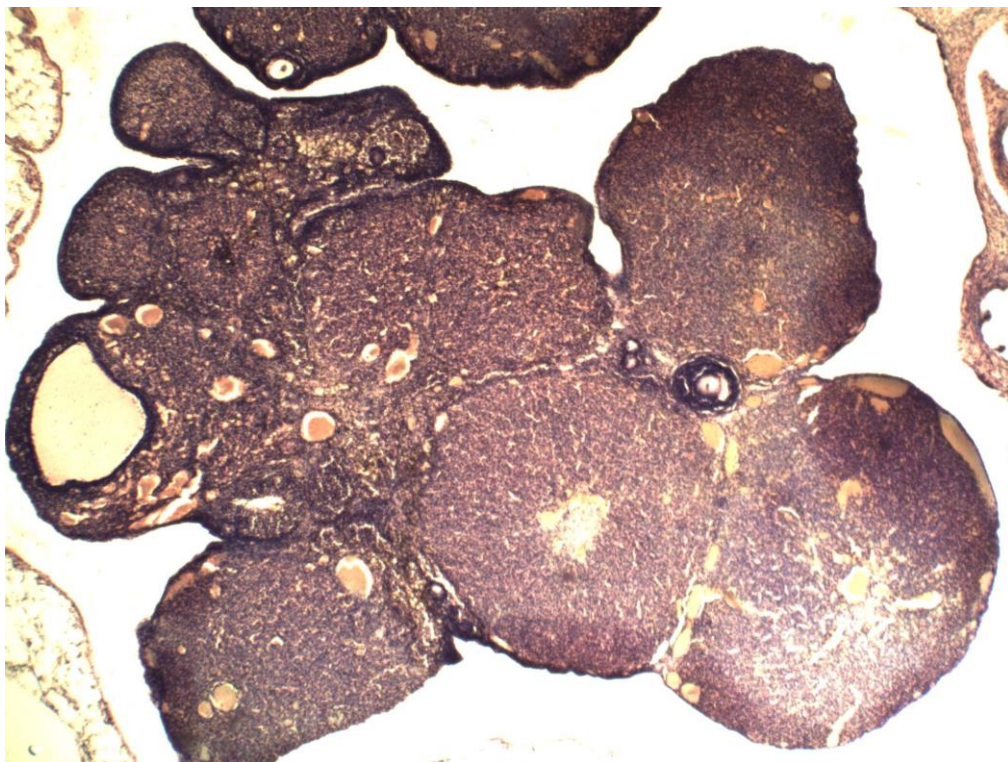


Рис. 5.41. Яєчник старої самиці щура після імплантації КФП, наявність генеративних елементів різних стадій. Забарвлення гематоксиліном і еозином, $\times 40$.

При проведенні гістохімічного дослідження виявлено зниження оптичної щільності і підвищення РНП у порівнянні зі старими самицями без імплантації КФП (див. табл. 5.15).

Імуногістохімічне дослідження з МКА до CD95 виявило специфічне світіння клітин мікропрепаратів яєчників у тварин цієї групи. Звертало на себе увагу зниження апоптозного індекса клітинних елементів яєчників у порівнянні з попередньою групою (табл. 5.16). При цьому оптична щільність інтенсивності світіння колагену IV типу знизилася (рис. 5.42), а інтенсивність світіння ендотеліоцитів, що експресують рецептори до ендотеліну-1, підвищилася порівняно з групою старих хібнооперованих самиць (див. табл. 5.16).

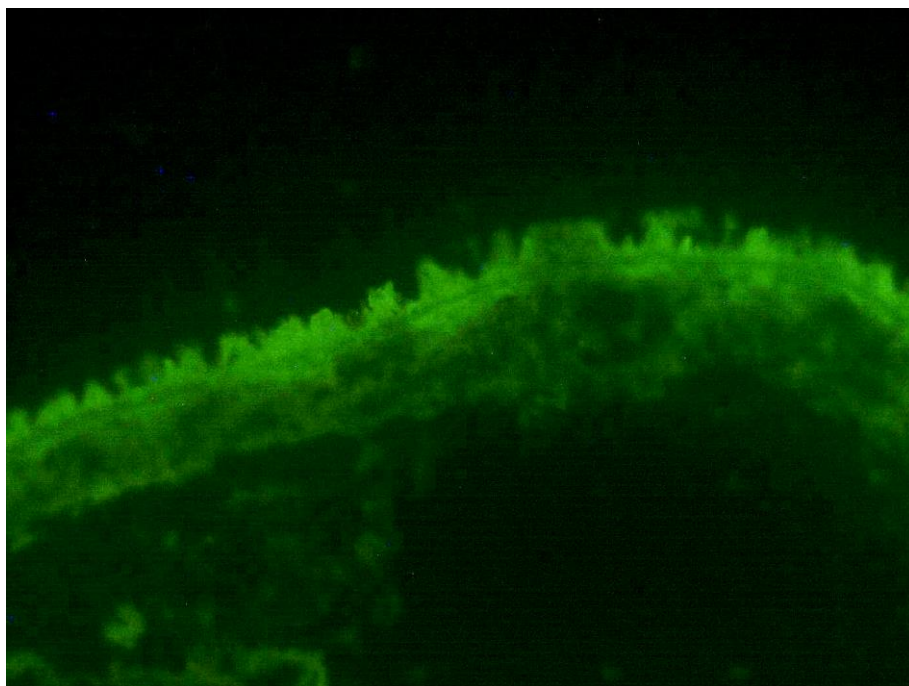


Рис. 5.42. Помірне накопичення колагену IV типу в епітеліальній базальній мембрані яєчника старих тварини на фоні імплантації КФП. Прямий метод Кунса з МКА до колагену IV типу, $\times 900$.

Макроскопічне дослідження маток 18-місячних тварин після імплантації КФП виявило, що матки гіпертрофовані, повнокровні, за масовим коефіцієнтом практично дорівнювали таким у молодих самиць (табл. 5.13).

При мікроскопічному дослідженні спостерігалось потовщення у вигляді фізіологічної проліферації ендометрія та його строми, збільшення розмірів поодиноких залоз. Подекуди зустрічалися групові залози. Міометрій також мав потовщений вигляд (рис. 5.43).

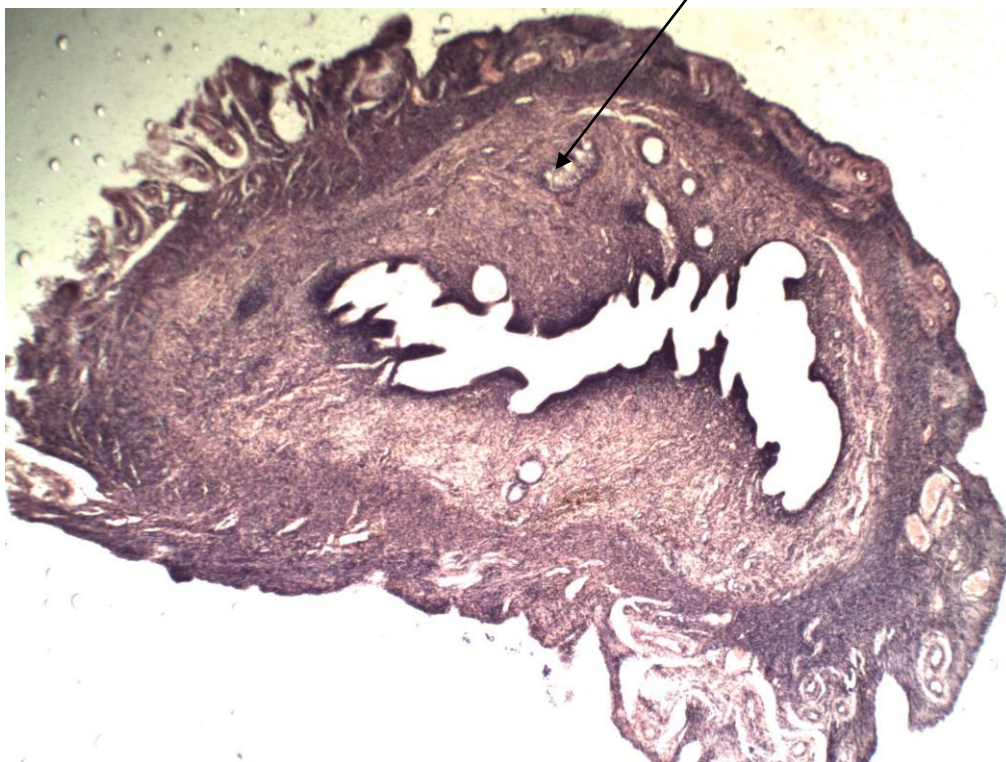


Рис. 5.43. Яєчник старої самиці щура після імплантації КФП: потовщений ендометрій, строма, групові залози. Забарвлення гематоксиліном і еозином, $\times 40$.

При проведенні гістохімічного дослідження продемонстровано зміну рівней оптичної щільності як ДНП, так і РНП, значення яких наближалося до таких у молодих самиць (див. табл. 5.15).

Після спарювання з самцями репродуктивного віку жодна самиця цієї групи спостереження не завагітніла.

Отримані дані інтерпретуються як процес ремоделювання тканин репродуктивної системи шляхом активізації обміну нуклеопротейдів, мікрогемодинаміки, зниження апоптотичних процесів, зменшення фіброзу, гіперплазії залоз, проліферації раніш атрофованого ендометрія.

Таким чином, проведені дослідження демонструють, що застосування кріоконсервованих фрагментів плаценти самицям пізнього онтогенезу дозволяє відновити стан серця та печінки за рахунок відновлення структурної організації, активізації синтезу білка, судинних реакцій, пригнічення процесів апоптозу.

При дослідженні статеві системи спостерігалися активізація синтезу в яєчниках та матці, фолікулогенезу, проліферативні зміни в ендометрії, тобто відновлювалися циклічні зміни в репродуктивній системі, але такий ступінь саногенезу виявився недостатнім для настання вагітності.

5.3. Вплив імплантації кріоконсервованих фрагментів плаценти на стан про- та антиоксидантної системи експериментальних тварин пізнього онтогенезу

Відповідно до вільнорадикальної теорії старіння з віком суттєво змінюється інтенсивність процесів вільнорадикального окислення (ВРО) і функціональна активність антиоксидантної системи (АОС). Водночас, існуючі дані щодо різноспрямованого впливу БПП на ВРО/АОС обумовлюють актуальність дослідження цієї системи при дії КБПП на організм у період пізнього онтогенезу. Вирішальну роль при цьому відіграють особливості перебігу і регуляції ВРО у різних системах і рівнях організації. Отримані дані дозволяють не тільки констатувати зміни, що виявляються, а й інтерпретувати їх в сенсі механізмів і рівней регуляторної дії.

При дослідженні показників прооксидантної системи у сироватці експериментальних щурів (табл. 5.19) виявлено, що рівні гідроперекисів ліпідів та інтенсивність аскорбат- Fe^{2+} індукованого ПОЛ у сироватці тварин пізнього онтогенезу мали тенденцію до підвищення порівняно з відповідними показниками в молодому віці. Імплантація КФП старим тваринам достовірно не змінювала кожний окремий показник в групах, проте слід зазначити, що ми спостерігали деяку тенденцію до наближення показників прооксидантної системи у старих тварин з імплантацією КФП до показників молодих щурів. При цьому динаміка ВРО була синхронною у групах самців і самиць, а коливання показників було більш значним у тварин пізнього онтогенезу.

Таблиця 5.19

Вміст гідроперекисів ліпідів та інтенсивність аскорбат-Fe²⁺ індукованого ПОЛ у сироватці крові молодих та старих щурів у контролі та при введенні КФП

Групи тварин	Гідроперекиси ліпідів, нМоль МДА на 1 мл сироватки	Інтенсивність аскорбат-Fe ²⁺ індукованого ПОЛ, нМоль МДА на 1 мл сироватки за 20 хв
5 (молоді самці)	2,73±0,07	8,19±0,38
4 (старі хибнооперовані самці)	3,03±0,18	10,42±0,23
3 (старі самці з імплантацією КФП)	2,82±0,68	9,95±0,32
6 (молоді самиці)	2,69±0,05	9,01±0,09
2 (старі хибнооперовані самиці)	2,98±0,29	10,79±0,63
1 (старі самиці з імплантацією КФП)	2,80±0,25	9,47±0,12

При вивченні активності АОС тварин досліджуваних груп було виявлено достовірне зменшення активності ГП та вмісту ферментативно активного ЦП у сироватці крові зі старінням тварин. Після введення КФП ці показники вірогідно зростали, але не досягали рівней молодих тварин (табл. 5.20).

При дослідженні показників прооксидантної системи в печінці експериментальних тварин виявлено, що рівні первинних продуктів ПОЛ – гідроперекисів ліпідів і кінцевих продуктів – ШО, достовірно збільшувалися з віком. Застосування КФП призводило до деякого зниження рівней гідроперекисів ліпідів і достовірного – ШО (табл. 5.21).

Таблиця 5.20

Se-залежна глутатіонпероксидазна активність та вміст ферментативно-активного церулоплазмину в сироватці крові молодих та старих щурів у контролі та при дії КФП

Групи тварин	ГП, нМоль NADPH/хв × мл сироватки	ЦП, нМоль/мл сироватки
5 (молоді самці)	843,1±36,5	2,09±0,12
4 (старі хибнооперовані самці)	446,1±84,2*	0,82±0,08*
3 (старі самці з імплантацією КФП)	727,9±88,8*,**	1,17±0,05* **
6 (молоді самиці)	859,1±30,0	2,36±0,09
2 (старі хибнооперовані самиці)	440,5±46,6*	0,95±0,07*
1 (старі самиці з імплантацією КФП)	789,7±33,5*,**	1,19±0,12*,**

Примітка: * – вірогідність різниці з показниками груп молодих тварин, $p < 0,05$;

** – вірогідність різниці з показниками груп старих тварин $p < 0,05$.

Таблиця 5.21

Вміст гідроперекисів ліпідів та Шифових основань в пост'ядерній фракції гомогенатів печінки молодих та старих щурів

Групи тварин	Гідроперекиси ліпідів, нМоль МДА на мл сироватки	ШО, УО/мг білка
5 (молоді самці)	0,758±0,044	12,80±0,23
4 (старі хибнооперовані самці)	0,898±0,046*	17,31±1,52*
3 (старі самці з імплантацією КФП)	0,809±0,054	14,52±1,33**
6 (молоді самиці)	0,749±0,032	12,01±0,13
2 (старі хибнооперовані самиці)	0,892±0,055*	17,93±1,25*
1 (старі самиці з імплантацією КФП)	0,798±0,074	13,59±1,54* **

Примітки: * – вірогідність різниці з показниками груп молодих тварин, $p < 0,05$;

** – вірогідність різниці з показниками в групах старих тварин, $p < 0,05$

При визначенні активності антиоксидантних ферментів у пост'ядерній фракції печінки досліджуваних груп встановлено, що активність каталази, ГП та глутатіонтрансферази у тварин пізнього онтогенезу достовірно зменшувалася. Виявленим зростанням вільнорадикальної агресії при зменшенні антиоксидантного потенціалу пояснюється ушкодження біологічних мембран гепатоцитів, гіпоксія органа, його деструктуризація, що було продемонстровано у попередній серії експериментів. На фоні введення старим щурам КФП спостерігалось відновлення протидії АОС, практично до рівня для молодих тварин (табл. 5.22).

Таблиця 5.22

Активність антиоксидантних ферментів у пост'ядерній фракції клітин печінки у тварин в групах спостереження

Групи тварин	Каталаза, мкмоль $\text{H}_2\text{O}_2/\text{мин} \times \text{мг}$ білка	ГП, нМоль $\text{NADPH}/\text{хв} \times$ мг білка	Глутатіон S трансфераза, нМоль $\text{ХДНБ}/\text{хв} \times$ мг білка	Глутатіон- редуктаза, нМоль $\text{NADPH}/\text{хв}$ $\times \text{мг білка}$
5 (молоді самці)	387,4±10,2	228,6±6,6	769,9±12,1	97,3±3,1
4 (старі хибнооперовані самці)	329,3±13,2*	178,0±13,8*	736,3±27,2*	84,5±8,7*
3 (старі самці з імплантацією КФП)	422,2±16,89**	219,4±14,8**	746,2±58,9	92,4±3,9
6 (молоді самиці)	390,0±13,4	238,6±4,5	755,0±12,9	103,9±4,1
2 (старі хибнооперовані самиці)	321,3±17,5*	149,0±23,7*	714,7±26,3*	78,2±9,0*
1 (старі самиці з імплантацією КФП)	419,8±14,68**	227,4±16,7**	750,2±98,9	96,4±3,4

Примітки: * – вірогідність різниці з показниками груп молодих тварин, $p < 0,05$;

** – вірогідність різниці з показниками груп старих хибнооперованих тварин, $p < 0,05$.

При дослідженні показників прооксидантної системи у статевих залозах (сім'яниках і яєчниках) тварин продемонстровано, що рівень гідроперекисів ліпідів мало відрізнявся в усіх групах тварин. У той час, як рівень ШО у групі щурів пізнього онтогенезу був вірогідно підвищений, а після застосування КФП знижувався до рівня молодих тварин (табл. 5.23).

Таблиця 5.23

Вміст гідроперекисів ліпідів та Шифових основань у пост'ядерній фракції гомогенатів статевих залоз у тварин у групах спостереження

Групи тварин	Гідроперекиси ліпідів, нМоль МДА на 1 мл сироватки	ШО УО/мг білка
5 (молоді самці)	1,61±0,29	15,54±0,71
4 (старі хибнооперовані самці)	2,43±0,43	19,89±1,82*
3 (старі самці з імплантацією КФП)	2,06±0,34	15,85±1,36**
6 (молоді самиці)	1,48±0,16	16,95±0,07
2 (старі хибнооперовані самиці)	2,46 ±0,53	20,08±1,98*
1 (старі самиці з імплантацією КФП)	2,08 ±0,29	17,87±1,75**

Примітки: * – вірогідність різниці з показниками груп молодих тварин, $p < 0,05$;

** – вірогідність різниці з показниками груп старих хибнооперованих тварин, $p < 0,05$.

При дослідженні активності антиоксидантних ферментів у пост'ядерній фракції клітин статевих залоз досліджуваних груп суттєвого коливання активності глутатіонредуктази не виявлено. Активність каталази, ГП та глутатіонтрансферази у тварин пізнього онтогенезу достовірно зменшується, а

після застосування КФП відновлюються практично до рівня контрольної групи тварин (табл. 5.24).

Таблиця 5.24

Активність антиоксидантних ферментів у пост'ядерній фракції клітин статевих залоз у тварин в групах спостереження

Групи тварин	Каталаза, мкмоль $\text{H}_2\text{O}_2/\text{мин} \times \text{мг}$ білка	ГП, нМоль $\text{NADPH}/\text{хв} \times$ мг білка	Глутатіон S трансфераза, нМоль $\text{ХДНБ}/\text{хв} \times \text{мг}$ білка	Глутатіон- редуктаза, нМоль $\text{NADPH}/\text{хв}$ $\times \text{мг білка}$
5 (молоді самці)	392,4±8,3	230,6±7,5	767,8±11,2	98,4±2,1
4 (старі хибнооперовані самці)	311,2±14,2*	186,5±18,1*	730,5±23,9*	85,6±8,7*
3 (старі самці з імплантацією КФП)	382,2±15,90**	217,9±11,8**	756,2±18,5	92,8±4,1
6 (молоді самиці)	391,6±11,1	233,4±6,5	759,2±11,9	100,6±3,3
2 (старі хибнооперовані самиці)	331,4±18,5*	177,0±23,7*	719,6±22,1*	88,2±9,1*
1 (старі самиці з імплантацією КФП)	389,7±13,78**	225,7±11,2**	750,0±14,5	93,5±2,2

Примітки: * – вірогідність різниці з показниками груп молодих тварин, $p < 0,05$;

** – вірогідність різниці з показниками в групах старих хибнооперованих тварин, $p < 0,05$.

Таким чином, при дослідженні показників про- та антиоксидантної системи в сироватці крові, печінці та сім'яниках виявлено, що з віком спостерігається зсув системи в бік прооксидантних процесів, а після застосування КФП частково відновлюється активність основних антиоксидантних ферментів. Визначені зміни в системі ВРО/АОС корелюють з

динамікою морфофункціонального стану досліджуваних органів та систем в організмі та були наведені у попередніх розділах дисертаційної роботи.

Результати, які були наведені в даному розділі, опубліковані в наступних роботах:

Грищенко В.И. Терапия криоконсервированной плацентарной тканью и медикаментами раннего и патологического климакса у женщин /

В.И. Грищенко, О.С. Прокопюк, О.В. Прибылова, В.И. Строна // Международный медицинский журнал. – 2000. – № 1. – С. 54–57.

Грищенко В.І. Використання кріоконсервованої плаценти в лікувальній практиці / В.І. Грищенко, О.С. Прокопюк, В.І. Шепітько, В.І. Строна, Т.М. Юрченко, Л.Є. Бобирєва, В.В. Рязанцев // Трансплантологія. – 2002. – Т. 3, № 2. – С. 32–37.

Юрченко Т.М. Обґрунтування використання тканин фетоплацентарного комплексу в лікувальній практиці / Т.М. Юрченко, В.І. Строна, О.С. Прокопюк, В.В. Рязанцев, Т.П. Говоруха, О.М. Цупиков // Трансплантологія. – 2003. – Т. 4, № 1. – С. 202–203.

Прокопюк О.С. Влияние криоконсервированного экстракта плаценты на интенсивность ПОЛ и содержание гидроперекисей липидов в тканях крыс в норме и после общего острого охлаждения / О.С. Прокопюк, А.К. Черемской, Ю.В. Никитченко, В.В. Чижевский // Проблемы криобиологии. – 2005. – Т. 15, № 4. – С. 681–687.

Грищенко В.И. Использование криоконсервированной плацентарной ткани при нарушениях сперматогенеза у мужчин / В.И. Грищенко, А.Г. Геродес, Ю.В. Никитченко, Н.Г. Грищенко, Л.И. Луцкая, О.С. Прокопюк // Здоровье мужчины. – 2007. – № 2 (21). – С. 168–171.

Прокопюк О.С. Про можливість корекції геріатричних змін за допомогою кріоконсервованих плацентарних біопрепаратів / О.С. Прокопюк, В.В. Чижевський, І.Б. Мусатова // Практична медицина. – 2008. – Т. 14, № 3. – С. 250.

Прокопюк О.С. Вплив імплантації кріоконсервованої хоріальної тканини на морфофункціональний стан міокарда старих щурів / О.С. Прокопюк, В.В. Чижевський, В.Ю. Прокопюк // Медицина сьогодні і завтра. – 2011. – Т. 50–51, № 1–2. – С. 242–245.

Шевченко Л.А. Об эффективности сочетанного применения антиоксидантной и клеточной терапии в реабилитации постинсультных больных с синдромом «motor-neglect» / Л.А. Шевченко, В.І. Грищенко, А.Ю. Петренко, О.С. Прокопюк // НейроNEWS (психоневрология и нейропсихиатрия). – 2009. – № 7 (18). – С. 57–62.

Пат. №39614А Україна, МПК А 61K35/50. Спосіб корекції функціонального стану міокарда у лабораторних тварин пізнього онтогенезу / Грищенко В.І., Прокопюк О.С., Чижевський В.В., Прокопюк В.Ю.; заявник та патентовласник Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України. – № 20000116284; заявл. 07.11.00; опубл. 15.06.01. Бюл. № 5.

Пат. №70686 Україна, МПК7 А61K35/50. Спосіб лікування уrogenітальних розладів в клімактеричному періоді / Грищенко В.І., Прокопюк О.С., Перчик О.А., Строна В.І.; заявник і патентовласник Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України. – № 20031212133; заявл. 23.12.03; опубл. 15.10.04. Бюл. № 10.

Пат. №46493 Україна, МПК7 А 61K35/50, А 61P15/08. Спосіб корекції порушень сперматогенезу у чоловіків / Грищенко В.І., Геродес Г.Г., Аліпова О.К., Прокопюк О.С.; заявник та патентовласник Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України. – №2001075342; заявл. 25.10.01; опубл. 15.10.04. Бюл. № 10.

Пат. №72117 Україна, МПК А 61B17/00, А61P15/00. Спосіб корекції вікових порушень репродуктивної функції / Прокопюк В.Ю., Прокопюк О.С., Карпенко В.Г., Пасієшвілі Н.М., Фалько О.В.; заявник і патентовласник Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України. – № 201200310; заявл. 10.01.12; опубл. 10.08.12, Бюл. № 15.

Результати роботи також доповідалися та обговорювалися на 34-th Annual Meeting of Society for Cryobiology “Cryo’97”; VI-th Meeting of the European Placenta Group, 1995; 2nd World Congress on Tissue Banking and 8-th International Conference of EATB, 1999; 36-th Annual Meeting of Society for Cryobiology “Cryo’99”; II-й науково-практичній конференції з міжнародною участю «Прискорене старіння та шляхи його профілактики», 2001; науково-практичній конференції з міжнародною участю «Інноваційні аспекти технологій в урології», 2012; V Всеросійський симпозіум з міжнародною участю „Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии”, 2012; конференції, присвяченій пам’яті В.В. Фролькіса, „Актуальні питання геронтології та геріатрії”, 2013; Міжнародній науково-практичній конференції „Практико-ориентированные биотехнологические исследования в растениеводстве, животноводстве, медицине”, 2013.

РОЗДІЛ 6

НАУКОВО-ОРГАНІЗАЦІЙНІ ПРИНЦИПИ СТВОРЕННЯ І ФУНКЦІОНУВАННЯ НИЗЬКОТЕМПЕРАТУРНИХ БАНКІВ БІООБ'ЄКТІВ ПЛАЦЕНТАРНОГО ПОХОДЖЕННЯ

Експериментальне або клінічне використання клітин, тканин та інших біологічних об'єктів для наукових досліджень, біотехнологій і медицини визначає актуальність створення НТБ. Сучасні досягнення медико-біологічних галузей науки можуть бути реалізовані у клінічній практиці завдяки інформаційному, організаційному, інженерно-технічному і нормативно-правовому забезпеченню всіх етапів роботи. Визначення таких позицій відповідно до кріобанків є необхідною передумовою їх ефективної діяльності.

Проведений контент-аналіз наукової інформації доводить, що проблема створення НТБ має першочергове значення при обговоренні світовою науковою спільнотою на фахових форумах. Завдяки визначенню даного напрямку пріоритетним на рівні міжнародних об'єднань, державній підтримці і ґрунтовним науковим дослідженням функціонують і активно розвиваються кріобанки, що спеціалізуються на роботі з традиційними біооб'єктами: банки крові; тканин ока; репродуктивного матеріалу – сперматозоїдів, яйцеклітин, ембріонів; абіотичних матеріалів опорно-рухової системи, коронарних клапанів, судинних алографтів [15, 55, 128, 131, 153, 170, 179, 199, 312, 238, 243]. НТБ колекцій клітинних ліній, мікроорганізмів, генетичного матеріалу рослин, тварин диких, селекційних, рідких чи зникаючих видів мають певні вимоги й умови діяльності [5, 44, 166, 241, 253, 269].

НТБ біооб'єктів з плаценти є структурами, що з'являються лише зараз. Їхня організація обумовлена специфічністю самого матеріалу, методів його

дослідження та сфер використання і базується на емпірично знайдених конструктивних рішеннях. Визначення принципів діяльності кріобанків БПП є нагальною потребою, вони можуть бути сформульовані при ґрунтовному науковому аналізі історії розвитку тканинних банків, сучасного стану проблеми, варіантів її вирішення з урахуванням особливостей плацентарних медико-біологічних технологій.

Вивчаючи історію виникнення кріобанків, становлення принципів і системи їх функціонування, можна визначити, що беззаперечною умовою для цього стали результати кріобіологічних досліджень. Використання низьких температур забезпечує зупинку біохімічних процесів у клітинах, обміну речовин і енергії з зовнішнім середовищем, завдяки чому живі об'єкти потенційно можуть зберігатися як завгодно довго [6, 214, 228, 232, 268].

У даний час розроблені й успішно застосовуються методи кріоконсервування клітинних культур, тканин, ранніх (передімплантаційних) ембріонів та інш. у медицині, сільському господарстві та науковому експерименті. На базі фундаментальних наукових положень шляхом експериментальних досліджень створюються програми кріоконсервування біологічних об'єктів: розробляються методики підготовки матеріалу, захисту від кріоушкоджень, підбираються температурні режими заморожування і зберігання, вибираються з готових або створюються нові кріопротектори та багато інших питань, якими займається кріобіологія [1, 154, 275]. Після проведення усіх необхідних процедур заморожений біологічний матеріал розташовують у спеціальні низькотемпературні сховища. Етап довгострокового зберігання кріоконсервованого матеріалу є також досить наукоємним, потребує поточного цілодобового моніторингу станів і процесів в НТБ, експлікації і наукового аналізу отриманих даних. За наявності цього, можлива реалізація довгострокового низькотемпературного зберігання біологічних матеріалів, створення їх запасів в умовах низьких і ультранизьких температур. Що й обумовлює реальність створення НТБ біологічних об'єктів.

Слід відзначити, що НТБ БПП – це продукт розвитку цивілізації останніх років. Отже саме науково-дослідна складова проблеми становлення таких банків є провідною поряд з гармонізацією основних положень діяльності НТБ іншої спеціалізації, що мають історичний досвід виникнення і розвитку.

Вперше НТБ почали з'являтися при дослідних центрах, згодом, після розробки технологій кріоконсервування, появи спеціальних (під конкретні задачі) посудин Дьюара, заморожувачів та підготовки фахівців подібні банки почали відкриватись і в наукових інститутах, сільськогосподарських підприємствах та комерційних організаціях.

Потребу в подібних банках у першу чергу відчували наукові інститути біологічного та медичного спрямування, в таких банках зберігалися різні тканини і клітини людей, тварин, рослин, компоненти крові і т.д. Широке поширення отримали банки у сільському господарстві як для селекції, так і для відновлення популяції тварин, риб і птахів. У даному випадку в азоті зберігають сперму, іноді ембріони тварин [166].

Одним з найважливіших питань у світовій практиці є збереження генетичного матеріалу планети, її багатой флори і фауни. У 70-ті роки професором Б.М. Вепрінцевим була висунута ідея використання температури рідкого азоту для збереження генетичних ресурсів з метою подальшого повернення збережених таким чином живих істот у природу. Швидкість зникнення видів з кожним роком тільки зростає і кріоконсервування генетичних ресурсів стало єдиним способом зберегти генотип ряду видів живих істот перед їх зникненням у природі. У зв'язку з цим, створення генетичних кріобанків для збереження рідкісних і зникаючих видів живих істот стає просто життєво необхідним заходом для збереження біологічного різноманіття зокрема та життя на планеті вцілому. Розуміння важливості цієї проблеми привело до того, що по всьому світу стали створюватися кріобанки, які спеціалізуються на збереженні видів тварин і рослин.

На базі Лабораторії кріоконсервації генетичних ресурсів Інституту біофізики клітини РАН організовано генетичний кріобанк, в якому створюються колекції репродуктивних та соматичних клітин рослин і тварин. Крім збереження власної колекції видів, банк також виконує роль центру колективного користування та зберігає кілька запасних кріоколекцій, які належать ряду інших науково-дослідних інститутів країни. У даний час в низькотемпературних сховищах містяться репродуктивні та соматичні клітини рослин і тварин, генетичні ресурси різноманітних аквакультур, рідкісних та зникаючих видів риб та інших гідробіонтів, частина з яких відноситься до кліматоутворюючих видів.

Питаннями збереження рідкісних видів тварин, деякі з яких знаходяться на межі вимирання, займається Всеросійський науково-дослідний інститут тваринництва. У цьому інституті застосовується технологія кріоконсервування еякулятивного і епідідимального матеріалу. Постійно ведеться робота по розробці та удосконаленню технологій отримання та кріоконсервації біоматеріалу. Колекція кріобанку складається зі зразків сільськогосподарських, диких і рідкісних тварин. НТБ працюють при наукових інститутах, ботанічних садах, університетах, селекційних станціях. У них зберігають: ембріони, органи, тканини, сперму, клітини різних ссавців, птахів, риб, рептилій; меристеми сільськогосподарських культур і рідкісних видів рослин, пилок плодових дерев та інший біологічний матеріал.

Кріобанк ембріонів тварин створено в Інституті цитології і генетики Сибірського відділення РАН (Новосибірськ). Результати кріобіологічних досліджень стали підґрунтям для ефективного кріоконсервування ембріонів ссавців – це відкриття ознаменувало собою початок «ери кріобанків ембріонів». Цей метод збереження генетичного матеріалу застосовується як для сільськогосподарських промислових видів тварин, так і для зникаючих диких видів ссавців. Науковці кріобанку намагаються відродити види давно не існуючих (вимерлих) тварин.

У глобальній задачі збереження генетичного матеріалу живих істот нашої планети принциповим є створення запасів генетичного матеріалу *Homo sapiens*. Безперечно біологічні структури плаценти людини є найбільш відповідним та придатним джерелом для створення колекцій генетичного різноманіття людства відносно статевої, національної, расової приналежності, стану здоров'я, часу, умов проживання та інше.

КБПІ, на нашу думку, становлять найбільш реальний і перспективний матеріал для використання генетичного матеріалу людини у майбутньому. Зтверджувати це дозволяє наявність у плаценті клітин-попередників практично усіх органів і систем людини, що несуть у собі генетично детерміновану програму розвитку відповідної анатомічної структури, а також клітин на різних стадіях диференціювання (від стовбурових до зрілих спеціалізованих) і есенціальних сполук – ініціаторів структуроутворення, регуляторів розвитку і функціонування клітин, органів і систем людини [42, 45, 64, 111, 136]. Тому, при створенні НТБ БПІ важливо передбачити формування відповідних колекцій КБПІ довготривалого зберігання, як складової генетичних запасів біосфери.

Не менш значна роль НТБ у розвитку економіки, зокрема її сільськогосподарських галузей. Провідні заклади аграрної науки, тваринництва, птахо- і рибоводства суттєву увагу приділяють банкуванню біологічного матеріалу.

Всеросійський науково-дослідний інститут експериментальної ветеринарії ім. Я.Р. Коваленка РАСГН проводить колекціонування клітинних культур сільськогосподарських і промислових видів тварин. У НТБ депоновані культури клітин, які були отримані (виділені) з нормальних (немалігнізованих) органів і тканин тварин (ембріони, молоді тварини). У колекції також представлені мутантні і гібридні культури клітин сільськогосподарських тварин. Інститут продовжує поповнення колекції новими штамами і лініями клітин. За набором немалігнізованих культур клітин дану колекцію можна порівняти з

Американською колекцією (ATCC) та Європейською колекцією (ECACC) клітинних культур.

Аналіз європейського досвіду низькотемпературного зберігання біологічного матеріалу тварин доцільно проводити на прикладі Французького національного кріобанку [166]. Для збереження видів і для їхнього захисту від генетичної мінливості, яка може проявитися з роками, у НТБ застосовуються кріогенні технології. Основними біологічними матеріалами, що зберігаються в кріобанку, є сперма, ембріони і фібробласти. Однією з задач кріобанку яка постає перед науковцями є створення колекції ДНК. Кріобанк допомагає фермерам у збереженні в чистому вигляді генетичного матеріалу порід тварин, що розводяться ними. Він також використовується для зберігання різних штамів і імбридінга. Національний кріобанк Франції був одним з перших банків такого роду, накопичений французами досвід пізніше був застосований у США, Нідерландах, Англії та інших країнах, де цей напрямок тільки починав розвиватися.

Вітчизняні НТБ такого профілю є досить потужними і відіграють суттєву роль у розвитку біологічної науки, економіці, зокрема у створенні і розведенні нових сортів рослин, видів тварин, птахів, гідробіонтів та інш. Таким чином, основними принципами та задачами діяльності таких НТБ є створення на базі наукових досліджень кріогенних біотехнологій для забезпечення вітальності зразків у біоколекціях, які використовуються в подальшому для потреб науки і сільського господарства. Такий досвід створення колекцій стандартизованих біооб'єктів за їх аутентичними властивостями доцільно запроваджувати при створенні НТБ КБПІ.

Перші тканинні банки біоматеріалів людини з'явились у США. У 1944 році там було створено банк рогівок, а в 1950 році для реконструктивної і пластичної хірургії було організовано Військово-морський банк органів і тканин. З 1961 року в Каліфорнії функціонує банк нервової тканини і спинномозкової рідини, що надає матеріали для клінік і дослідницьких цілей. При медичному центрі

Тафтського університету створено спеціалізовані банки біопсійного і аутопсійного матеріалу людини, що дозволяє проводити дослідження у галузі молекулярної патології. Міжнародний інститут новітніх медичних технологій у США поряд з власними науковими дослідженнями організовує запаси біологічного матеріалу періоду ембріонального розвитку, надає ці біооб'єкти науково-дослідним інститутам і лабораторіям. Колекції зразків клітин людини та ссавців з 1979 року зберігаються в National Biomonitoring Specimen Bank при Національному інституті стандартів і технологій США. Зараз у США існує понад 200 НТБ біологічних об'єктів різної спеціалізації відповідно до матеріалу, що зберігається і лабораторій, що проводять дослідну роботу, результати якої забезпечують максимальне збереження морфофункціональних характеристик кріоконсервованного біологічного матеріалу.

Водночас по іншому виглядає ситуація відносно проблеми, що розглядається у даному дослідженні, а саме НТБ БПП. При очевидній доступності вихідного біологічного матеріалу – плацент, що по суті є хірургічними залишками, банкування таких біооб'єктів знаходиться на стадії наукових досліджень у декількох лабораторіях при потужних науково-дослідних центрах (Україна, Німеччина, Росія та інші) [101, 118, 128, 143]. Поясненням цього може стати те, що тканинні банки створювалися на вимогу потреб певної галузі медицини, алгоритм організації і діяльності таких НТБ базувався на принципі органо- і гістівідповідності. Так, для медичної допомоги офтальмологічним хворим створювалися НТБ тканин ока. Банки тканин опорно-рухової системи функціонували для потреб відновлювальної хірургії у хворих з травмами та порушенням розвитку цієї системи. При ряді ендокринологічних медичних центрів існують НТБ гормонопродукуючих біоструктур.

Плацента використовувалася в якості вихідного матеріалу для створення фармпрепаратів, зокрема – біостимуляторів за методом В.П. Філатова. Дослідження останніх років доводять, що поліфункціональність цього провізорного органа, може бути задіяна шляхом використання

кріоконсервованих плацентарних структур при широкому спектрі хвороб, травм і порушень розвитку людини при наявності НТБ БПП. При розробці принципів діяльності НТБ БПП, ми аналізували особливості функціонування вищеназаних тканинних НТБ.

Найбільш поширеною є мережа НТБ тканин опорно-рухової системи. Практично при усіх науково-дослідних інститутах ортопедії і травматології існують відповідні банки. Притримуючись принципу базування на наукових дослідженнях, ці НТБ у своєму розвитку накопичили велику кількість матеріала. Починаючи з абіотичних матеріалів – аллографтів – демінералізованих кісток, фасцій, сухожиль різного ступеню подрібнення (цілі фрагменти, крихти, ліофілізований порошок), у теперішній час ці НТБ розвивають напрямок тканинної інженерії. Використовуються композиційні конструкції: абіотичні носії заселяються живими спеціалізованими клітинами різного ступеня диференціювання. В організм вводяться тканинноспецифічні субстанції, есенціальні сполуки, які ініціюють структуроутворення або запобігають патологічним процесам. З розвитком і впровадженням біотехнологічних досліджень у клінічну практику біооб'єкти НТБ з опорно-рухової системи застосовуються в інших галузях медицини – офтальмології, ендокринології, відновлювальній і пластичній хірургії, отолярингології, нейрохірургії та інш. Такі НТБ створюються і функціонують при закладах, що мають потужний науковий і медичний потенціал: НТБ в Центральному інституті травматології і ортопедії, м. Москва, в Самарському державному університеті, у Всеросійському центрі очної і пластичної хірургії, м.Уфа, в МНТК „Мікрохірургія ока” ім. академіка С.М. Федорова в Росії; в ДП „Біоімплант”, м. Київ, Центральному інституті травматології і ортопедії, м Київ, в Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків в Україні.

На нашу думку, саме такий сучасний формат діяльності НТБ є доцільним для роботи кріобанку БПП. Тобто орієнтування на розробку таких біотехнологій, що забезпечують наявність в КБПП вітальних структур,

програмування властивостей біоматеріалу відповідно до застосування у різних галузях медицини при конкретних патологічних станах. При цьому розширюється ефект позитивного впливу на саногенез. Замісна, реконструктивна тканинна чи клітинна хірургія\терапія становиться регенеративною. Така еволюція наукових поглядів на біологічну дію введення клітинно-тканинних об'єктів базується на аналізі масиву накопичених наукових фактів і була передбачена ще засновником першого в Європі тканинного банку R. Klen (1961). Численні експериментальні дослідження щодо визначення відповіді організму на імплантацію біоматеріалу проводяться з використанням ауто-, ало- і ксеносистем, застосовуючи ортотопічне і гетеротопічне введення, з різним рівнем васкуляризації та імунопривелізованості *locus implantatio* і *locus morbi*.

В останні десятиріччя дослідниками широко використовується методика сокультивування тканинних структур, які пов'язані в організмі взаєморегуляторними зв'язками [11, 56]. Результати цих досліджень призвели до нового розуміння проблеми. Концепція регенеративної клітинно-тканинної терапії доводить загальнобіологічну, системну дію біоматеріалу, що застосовується. При цьому місцеві реакції є вторинними і підпорядковуються системним. Спрямованість і динаміка локальних репаративних процесів залежать від гістохімічного складу та ступеня вітальності біоматеріалу, що вводиться. З іншої сторони, репаративний процес, забезпечується механізмами центрального порядку. У цій взаємодії приймають участь всі інтегративні системи організму: нервова, ендокринна, імунна. Таким чином, за допомогою біооб'єктів НТБ не лише протезується ушкоджена чи відсутня структура в організмі хворого, а й чиниться системний ініціюючий вплив на регенеративний потенціал пацієнта [69, 92].

Морфологічна гетерогенність і фізіологічна поліфункціональність біологічних об'єктів, які отримані з плаценти та її похідних значно розширюють можливість як замісної складової, так і системної дії клітинно-тканинної терапії.

Водночас кріотехнології забезпечують можливість отримання і довгострокового збереження БПП з високим ступенем вітальності, що принципово підвищує ефективність і різноплановість регенеративної медицини при її використанні у лікуванні хворих. Враховуючи вищенаведене, ми вважаємо концепцію регенеративної терапії такою, що відповідає меті діяльності НТБ БПП і може бути однією з принципів прогнозування перспективності такого кріобанку.

Сучасний стрімкий розвиток допоміжних репродуктивних технологій обумовив необхідність створення банків сперми, яйцеклітин, передімплантаційних ембріонів та інших репродуктивних матеріалів. У значній мірі ці НТБ працюють на принципі використання пацієнтами аутологічного матеріалу. Одноразове отримання і довгострокове низькотемпературне зберігання репродуктивних продуктів дозволяє пацієнткам уникнути повторних стимуляцій овуляції і медичних втручань для отримання яйцеклітин, що є досить фармакоагресивними та інвазивними медичними процедурами. Низькотемпературне зберігання сперми, яйцеклітин і ембріонів отриманих у молодому віці дозволяє використовувати їх впродовж життя в більш старшому віці, коли організм уже обтяжений хворобами, пернесеними травмами, операціями, інтоксикаціями і, як наслідок, зниженими показниками якості репродуктивного матеріалу. При неможливості використання власних генеративних клітин (за медичними показаннями) або за відсутності статевого партнера з'явилась можливість використання відповідного донорського матеріалу завдяки НТБ [170, 238]. З метою підвищення ефективності репродуктивних технологій в останні роки використовуються КБПП. Підґрунтям для такої оптимізації медичної допомоги пацієнтам, які страждають на безплідність, стала провідна роль плаценти у гестаційному процесі, імуноендокринних взаємовідносинах у системі мати-плацента-плід, а також у формуванні і розвитку статевої і ендокринної систем. Завдяки впровадженню спільних досліджень репродуктологів і дослідників кріобанків репродуктивних матеріалів і плацентарних біоб'єктів вдалося суттєво підвищити

результативність допоміжних репродуктивних технологій, покращити прогнози вагітності для матері і новонародженого. Відповідно до цього результату, вважаємо за необхідне у роботі НТБ КБПП планувати тісну взаємодію з науковими медичними закладами, у першу чергу, тими, що впроваджують сучасні медичні технології і ставлять завдання, рішення яких позитивно впливає на демографічну ситуацію.

Безперечно, таким напрямком на сьогоднішній день стало низькотемпературне зберігання компонентів плацентарної (пуповиної, кордової) крові з можливістю подальшого застосування за медичними показаннями. Банк пуповинної крові – це організація, або підрозділ, що займається тривалим низькотемпературним зберіганням пуповинної крові. Перший такий банк було створено у 1984 році в Україні співробітниками Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України на базі Харківської станції переливання крові. Це був перший світовий досвід кріозбереження пуповинної крові. Було розроблено ефективну методологію отримання, низькотемпературного консервування, довгострокового зберігання та клінічного застосування кріоконсервованих еритроцитів плацентарної крові у терапії постгеморагічних анемій в акушерсько-гінекологічній практиці. У подальшому перелік КБПП в НТБ було поповнено кріоконсервованною сироваткою кордовою крові в якості медичного імунобіологічного препарату. Клінічну ефективність препарату було доведено при лікуванні сальпінгофоритів, ускладнень цукрового діабету, панкреатиту, перитоніту, у прегравідарній підготовці жінок, що страждають на антифосфоліпідний синдром та інших захворюваннях і патологічних станах [27, 85, 117].

Наразі у світі налічуються сотні як державних, так і приватних НТБ плацентарної крові [143, 218, 260]. Практично всі ці банки спеціалізуються на кріоконсервуванні і зберіганні клітинних суспензій кордової крові людини. Ці суспензії є гетерогенними за складом і містять ядровмістні, імунокомпетентні, гемопоетичні, стовбурові клітини різного ступеня диференціювання. У таких

банках є можливість персонального (для аутологічного використання) зберігання крові, яка може бути застосована тільки для дитини та близьких родичів за згодою власника (батьків дитини). Банки персонального зберігання останнім часом набули значного поширення. Усього в світі налічується близько 200 банків пуповинної крові, з яких третина – у США. У них зберігаються сотні тисяч одиниць зразків пуповинної крові. У Росії діють 11 таких банків [118, 119]. Одним з найбільших є Гемобанк – ліцензований банк персонального зберігання стовбурових клітин пуповинної крові. Створений у 2003 році на базі Російського онкологічного наукового центру ім. М.М. Блохіна він є підрозділом російської біотехнологічної компанії «Інститут стовбурових клітин людини». У кріосховищах цього НТБ зібрано найбільшу кількість одиниць пуповинної крові серед усіх банків персонального зберігання Східної Європи і Росії. Цей НТБ у своїй діяльності значну увагу приділяє обміну тематичною науковою інформацією. За безпосередньою участю НТБ видається провідний науковий журнал з проблеми, організовуються конференції, міжнародні зустрічі фахівців, дослідників де визначаються принципові питання щодо досліджень, організації діяльності НТБ, перспективи біотехнологій і клінічного застосування компонентів плацентарної крові. Такий підхід до діяльності кріобанків є умовою перспективності розвитку НТБ кордової крові, що можливо екстраполювати і на діяльність банків КБПП.

В Україні функціонують кріобанки пуповинної крові: державні і приватні. Протягом останніх років активної діяльності банки пуповинної крові України, крім оптимізації методик збору, процесингу та кріозберігання стовбурових клітин пуповинної крові зробили істотний внесок у розвиток клітинних технологій [68, 101, 133]. Спільно з провідними медичними установами розроблені підходи до клінічного застосування компонентів пуповинної крові, проводяться наукові дослідження у цій галузі та міжнародне співробітництво. Практично всі українські кріобанки є багатoproфільними відносно біооб'єктів, які в них зберігаються.

Так, в Донецькому кріобанку – Міжнародному центрі біотехнологій «Біостем» розроблено та реалізовано авторські біотехнології отримання стовбурових клітин з плацентарної крові, кісткового мозку; ембріональних стовбурових клітин; мезенхімальних стовбурових клітин різного походження [92]. Дослідники цього закладу отримують біооб'єкти з запрограмованим диференціюванням для клінічного використання у лікуванні опіків, серцевої недостатності та інш. Одним з перспективних напрямків науково-практичної діяльності даного НТБ визначено тканинний інженеринг композиційних біоструктур на основі сокультивування з плацентарним матеріалом (клітинних суспензій, амніотичної оболонки, тощо).

Водночас поширюється кількість публічних НТБ плацентарної крові, де зберігається донорський (алогений) матеріал, який може використовуватися для лікування пацієнтів, виходячи з медичних показань. Кількість таких НТБ з початку ХХІ століття стала різко зростати, коли став зрозумілим потенціал використання стовбурових клітин плацентарної крові у лікуванні різних хвороб. Донорські НТБ широко поширені у США, Канаді, Іспанії, Італії, Франції, Німеччині, Японії. У різних країнах є особливості функціонування таких НТБ, що виходять з потреб суспільства і базуються на нормативно-правовій базі країни.

Багатопрофільним є НТБ біологічних об'єктів Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України. Фундаментальні наукові дослідження співробітників інституту в галузі кріобіології стали основою для розробки ефективних програм низькотемпературного консервування і формування стратегічних запасів методом довгострокового зберігання біоматеріалу різного походження: рослинного, тваринного, птахів, риб, мікроорганізмів, модифікованих клітинних ліній, субклітинних структур. Значне місце у НТБ інституту займають кріоконсервовані об'єкти людського походження, в першу чергу компоненти крові, в тому числі кордової, тканини ока, фібробласти, адипоцити, хондроцити, кістковий мозок, нейрональні, гемопоетичні,

імунокомпетентні клітини, фрагменти залоз внутрішньої секреції, генеративні клітини, репродуктивні матеріали – оваріальна, тестикулярна тканини, фолікулярна та цервікальна рідини. З 1990 року в інституті розробляються біотехнології створення КБПП. На тлі результатів власних наукових досліджень кріочутливості плаценти та їх похідних, а саме: плацентарної тканини, амніотичної і хоріальної оболонок посліду, компонентів кордової крові розробляються біотехнології з програмами кріоконсервування для кожного виду біоматеріалу [39, 100, 102, 139 5, 29, 77, 84, 109]. Створюються і закладаються на довгострокове низькотемпературне зберігання нові кріоконсервовані біопрепарати: синцитіотрофобластичні фрагменти, суспензії клітин, органотипові культури, кріоекстракти плаценти, фрагменти амніотичної і хоріальної оболонок посліду, сироватки плацентарної крові, суспензії ядровмісних клітин кордової крові і лейкоконцентрати з кордової крові в аутологічній плазмі кордової крові. У процесі експериментальних доклінічних випробувань була верифікована ефективність ряду КБПП в якості імунокоригуючих засобів, біопластичного матеріалу, стимуляторів репарації, сперматогенезу, овуляції, кровотворення. Доведено їх регуляторний вплив на нейроендокринні взаємодії, здатність купірувати негативні наслідки стресу, психофізичного виснаження, метаболічні порушення в організмі та інш. При цьому було визначено механізм дії КБПП на основні ланки патогенезу відповідних захворювань, уражень і патологічних станів. У теперішній час продовжується дослідження біологічних властивостей і потенціалу КБПП. Вони використовуються в експериментальних роботах, біотехнологіях, клітинно-тканинному інженерінгу. Проведена державна сертифікація ряду КБПП дозволяє їх застосування у клінічній практиці, як для власного, аутологічного, так і в якості донорського алогенного використання.

НТБ Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАНУ, як науковий об'єкт, має статус «Національного надбання держави». На базі інституту функціонує кафедра ЮНЕСКО з проблем кріобіології і кріомедицини.

Формування НТБ КБПП в інституті проводиться з урахуванням принципів діяльності цих структур: пріоритетним є науково-дослідна робота, проводиться довгострокове зберігання генетичного різноманіття біологічного матеріалу (в тому числі КБПП) з дотриманням державних і міжнародних стандартів.

Світова практика доводить необхідність тісного взаємозв'язку всіх низькотемпературних банків. Вони утворюють професійні об'єднання, асоціації та мережі, в яких розробляється матеріально-технічна документація та правила роботи. Якість роботи банків регулюється нормативними документами, постановами та законами. Завдяки цьому приймаються єдині стандарти за методиками забору, консервації, зберігання та обліку донорського матеріалу.

Вперше у світі було створено мережу спеціалізованих лабораторій по консервації, експериментальному та клінічному застосуванні біологічних тканин у СРСР у 1959 році. Це були перші банки тканин, які з моменту створення були об'єднані в єдину систему, їм належало займатися організацією НТБ, отриманням, розробкою найбільш раціональних способів кріоконсервування тканин і клітин, а також створенням необхідного обладнання і, в результаті, впровадженням цих біоматеріалів у медичну практику. Поставлені завдання у своїй більшості були вирішені. Накопичений досвід довів високу клінічну доцільність використання кріоконсервованих клітин і тканин в лікувальній практиці завдяки системі тканинних банків. У подальшому, в суспільстві спостерігався бурхливий розвиток наукових досліджень з цієї проблеми, але невирішеність нормативно-правових положень, відсутність належної гармонізації зі світовими банками і їх асоціаціями стали суттєвими перешкодами до впровадження наукових досягнень у практику охорони здоров'я. Наразі практично всі галузі медицини: хірургія, акушерство, кардіологія, офтальмологія, ортопедія, травматологія, геріатрія, нейрохірургія та інш. відчувають нагальну потребу у клітинних і тканинних біопрепаратах. Водночас відсутність належного регуляторно-правового інструмента їх застосування, а також визначених принципів створення і функціонування

спеціалізованих НТБ залишають пацієнтів без лікування за допомогою консервованих клітин і тканин.

Вважаємо, що аналіз досвіду світових асоціацій тканинних банків може стати в нагоді для організації і функціонування НТБ КБПП, їх об'єднання з метою успішної реалізації наукового потенціалу у практичній медицині.

Сьогодні діють світові асоціації тканинних банків, які об'єднують найбільшу їх кількість [202, 227, 231 284, 285]. В Європі – європейська асоціація тканинних банків (European Association for Tissue Banking), в Південній Америці – латиноамериканська (Latino-American Association of Tissue Banking), в Великобританії – британська (British Association of Tissue Banks), в США – американська (American Association for Tissue Banking), в Іспанії – іспанська асоціація тканинних банків (Spanish Association of Tissue Banks). Кріобанки Австралії та Нової Зеландії об'єднані в координаційну асоціацію (Australasian Transplant Coordinators Association), розвивається Азіатсько-Тихоокеанська асоціація тканинних банків. Існують асоціації вузької спеціалізації, наприклад, опорно-рухового апарату (European Association for Musculo-Skeletal Transplantation), тканин ока (European Eye Bank Association), кордової крові (Eurocord) та інші.

Україна є державою–членом Ради Європи (РЄ), відповідно до цього директиви, протоколи, рекомендації та стандарти РЄ з проблеми банкування біологічного матеріалу поширюються на алгоритми організації і принципи діяльності НТБ у нашій державі. Тому, на прикладі Європейської асоціації тканинних банків розглянемо суть і принцип роботи асоціацій тканинних банків. У Берліні, на першій Європейській конференції з тканинного банкування (1991 р.) 280 учасників з 18 європейських країн домовилися про створення європейської науково-професійної організації банків тканин. Організація об'єднала фахівців різних категорій: учених, клініцистів, інженерів-кріогенного устаткування, що працюють в області донорства, обробки та використання клітин і тканин. Ця організація отримала назву Європейська асоціація тканинних

банків (ЕАТВ), вона сприяє науковим дослідженням і розробкам в області тканинної та клітинної терапії. Метою ЕАТВ є міжнародна координація, співпраця, стандартизація, обмін досвідом у галузі біобанкінгу. ЕАТВ проводить наукові форуми для забезпечення можливості обговорення і вирішення наукових, етичних і клінічних питань діяльності НТБ, для презентації досліджень, співпраці та взаємодії з представниками національних керівних структур.

У ЕАТВ розроблено критерії, які включають усі аспекти її діяльності. НТБ біологічних об'єктів визначено як медико-технологічну структуру, організацію або підрозділ закладу де проводиться заготівля, тестування, обробка, зберігання та дистрибуція тканин, клітин і їх похідних [147, 153, 155, 189, 192, 219, 239].

Сучасні стандарти діяльності НТБ в ЕАТВ розроблено диверсифікованою групою досвідчених фахівців у галузі банкування біоматеріалу, що об'єднали свої зусилля для визначення загальних принципів і конкретизації алгоритмів діяльності відповідно певним видам тканин і клітин. Ці стандарти передбачають і забезпечують основу для функціонування НТБ; можливість безпечного і ефективного отримання потрібної кількості біологічного матеріалу; умови для попередження передачі хвороб через банківський біоматеріал і досягнення оптимальних клінічних результатів; створення програм для навчання фахівців даного профілю і підвищення їх кваліфікації; залучення співробітників НТБ до наукової діяльності на рівні сучасних технологічних досягнень; постійний контроль, координацію і регулювання діяльності НТБ, включаючи персонал; вимоги до вихідного біоматеріалу, документації, обробки, зберігання та використання матеріалу лікувальними або науково-дослідними закладами. Відповідно до ЕАТВ визначено необхідний перелік стандартних операційних процедур (СОП) щодо персоналу; системи управління якістю; організації приміщень, обладнання, матеріалів, документації; вилучення, дослідження і обробки органів, клітин і тканин; контролю якості та перевірки кваліфікації; легалізації всіх процесів. Ці стандарти базуються на положеннях міжнародної

організації стандартизації (ISO), а саме на Міжнародному стандарті серії ISO 9000, що охоплює систему управління якістю в цілому і застосовується спільно з принципами належної виробничої практики (GMP).

Відповідно до розвитку банківської справи відбувається постійна робота експертів-консультантів у рамках своїх та інших установ для навчання співробітників НТБ, що співпадає з вимогами Європейських директив (2004/23/ЕС і 2006/17/ЕС) щодо навчання, атестації та підвищення кваліфікації персоналу, який працює в галузі банкування клітин і тканин. Існують національні, регіональні та міжнародні навчальні курси. У форматі щорічних конференцій провідні вчені читають пленарні лекції щодо сучасних досягнень у проблемі тканинних банків, проводяться інтерактивні семінари, освітянські комунікаційні симпозиуми та стендові сесії. У 2012 році експерти з країн Європи та за її межами на конференції EATB в Австрії ділилися своїми знаннями і досвідом. Новітніми стали такі програми: підтримка інтернет-курса «Тканинні банки», Міжнародний он-лайн курс «Низькотемпературні банки. Клітинна терапія і регенеративна медицина». Відповідно до цього, на нашу думку, принциповим для перспективного розвитку НТБ КБПП є гармонізація його будови і діяльності з міжнародними і, в першу чергу, – Європейськими стандартами діяльності.

Аналіз структурно-функціональної організації і технічного обладнання провідних сучасних НТБ, а також концепцій, які визначено аналоговими, дозволяють визначити наступні положення у структуризації, взаємодії підрозділів та їх оснащення для створення і ефективної діяльності кріобанку КБПП.

Структурно НТБ являє собою науково-технологічний комплекс, який повинен включати біотехнологічні і біоаналітичні комплекси, кріогенні сховища з кріоконсервованими зразками біологічного матеріалу, заморожувачі, систему контролю температури, рівня рідкого азоту в сховищах, вологості і концентрації

газів у приміщенні, систему вентиляції, поточне інженерно-технічне забезпечення.

На рис. 6.1 представлено принципову схему організації НТБ БО, яка реалізована в основних своїх положеннях у кріобанку Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАНУ [32, 73] і, на нашу думку, є оптимальною для створення НТБ КБПП.

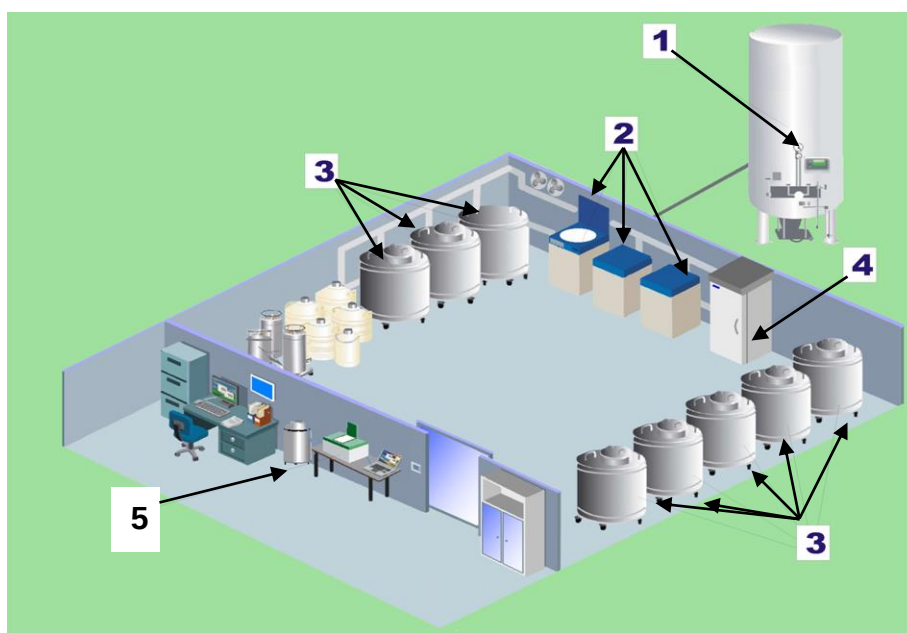


Рис.6.1. Принципова схема організації НТБ КБПП: 1 – система подачі холодоносія (рідкого азота); 2 – кріосховища біооб’єктів; 3 – кріосховища біооб’єктів ХБ-0,5; 4 – рефрижератор, $T = -80^{\circ}\text{C}$; 5 – програмний заморожувач.

Слід зазначити, що підготовка і збереження біоматеріалу в НТБ обумовлює унікальність більшості технічних засобів та приладів, за допомогою яких здійснюються основні операції, оскільки виготовляються під конкретну задачу роботи НТБ. Таким чином, обладнання НТБ розподіляється на 4 групи відповідно завданням банку.

Першу групу складає комплекс лабораторно-діагностичного обладнання, за допомогою якого проводиться тестування БПП на етапах біотехнологічних процесів кріоконсервування та зберігання. Функціональним завданням для

цього комплексу досліджень є визначення біопезпеки, відповідність сертифікаційним характеристикам та аутентичності біоматеріалу НТБ. Проводяться дослідження вхідного матеріалу на усіх етапах біотехнологічного процесінгу та кріоконсервування для одержання біооб'єктів у вигляді препаратів, які використовуються в експерименті чи в клініці. Склад приборів та обладнання лабораторно-діагностичного комплексу залежить від переліку характеристик біоматеріалу, що досліджується. Як правило це обладнання, яке дозволяє визначати стерильність, морфологічні, біохімічні, імунологічні, культуральні, генетичні, цитологічні параметри БПП НТБ, верифікувати їх біобезпеку та біологічну дію в модельних експериментах і у клінічних дослідженнях.

Друга група обладнання формується відповідно до переліку об'єктів, що отримують з плаценти (клітин, екстрактів, фрагментів та інш.) і забезпечує проведення протоколів біотехнологічного процесу обробки, культивування, сепарації, дезінтеграції, екстрагування, модифікації, масштабування, клітинно-тканинного інженерінгу, піготовки до кріоконсервування та інших. Цей блок приладів розташовується у стерильних боксових приміщеннях, які оснащені ламінарами, CO₂ інкубаторами, гомогенізаторами, центрифугами, сепараторами клітин, сублімаційними установками, магнітними термозмішувачами, витяжними шафами, холодильниками, приладами, що герметизують контейнери, при потребі – стерилізаторами біоматеріалу.

Важливими приладами у НТБ є заморожувачі біооб'єктів. Програмні заморожувачі це комплексні електронні пристрої, призначені для забезпечення планомірного і точного охолодження різних біологічних об'єктів до низьких і наднизьких температур. Мета роботи заморожувача – кріоконсервування з можливістю призупинення прижиттєвих функцій біооб'єктів.

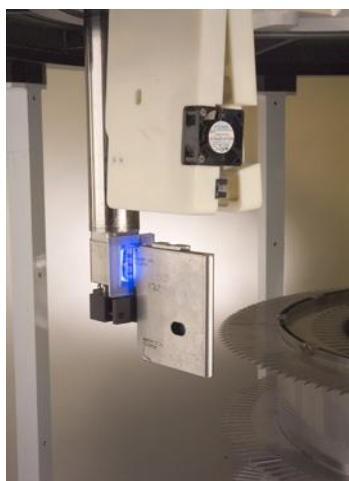
Сучасні програмні заморожувачі біоматеріалу підрозділяються на класи: портативні (DB1 Embryo Freeze), стаціонарні (Cryo 560-16, FREEZE CONTROL CL8000, CryoCell 1200, ЗП-10) (рис. 6.2) і ті, що є модулями кріогенного

програмного технокомплексу (Bio Archive System) (рис.6.3) або роботизованого кріобанку.

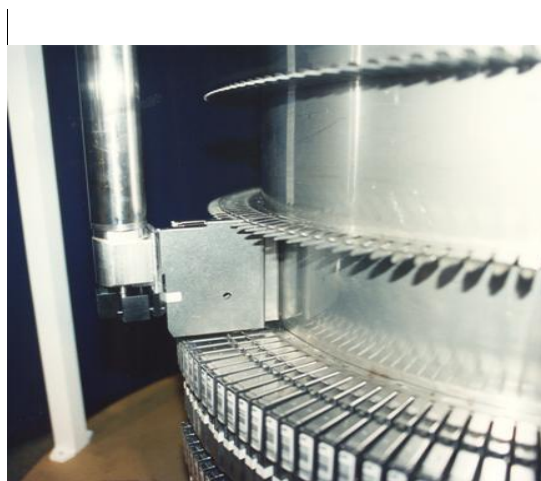


Рис. 6.2. Програмний заморозувач.

Принципово заморозувачі складаються з трьох технічних модулів: комп'ютера з програмним забезпеченням, камери охолодження і системи забезпечення холодоагентом. У якості холодоагента у заморозувачах використовуються пари рідкого азоту. Заморозувачі реалізують програмне охолодження, заморожування біоб'єктів з можливістю стабілізації температури, відтворення або зміни швидкості охолодження, ініціації кристалоутворення. Деякі моделі також можуть підтримувати функцію програмного розморожування кріоконсервованих матеріалів.



а



б

Рис. 6.3. Модулі кріогенного програмного технокомплексу Bio Archive System: а – заморозувач, б – адресне розташування.

Портативні моделі фризерів можуть мати власні азотні резервуари і батареї живлення, вони, як правило, мають кріокамери розраховані на фіксовану тару для біоматеріалів.

Стаціонарні лабораторні та виробничі фризери працюють від електроживлення і вимагають подачі рідкого азоту під тиском зі звичайної посудини Дьюара (відкритого типу) через спеціальний насос або з балона (цистерни). Такі заморозувачі, як правило, за потреби оснащуються системами розподілу біоматеріалу у кріокамері (рис. 6.3).

Заморозувачі працюють відповідно до заданої програми, при цьому протокол процесу може зберігатися, відтворюватися і виводитися на комп'ютер для обробки. Програмне забезпечення дозволяє вводити і фіксувати параметри в числовому і графічному вигляді у реальному часі зі збереженням даних в оперативній пам'яті заморозувача. Це дає можливість мати інформацію про поточний стан експерименту чи етапу кріотехнологічного процесу, проводити порівняльний аналіз із іншими протоколами при оцінюванні ефективності кріопрограм. По завершенню програми кріоконсервування об'єкт розташовують у кріосховищах (рис.6.4).



Рисунок 6.4. Внутрішній об'єм низькотемпературного сховища з комірками для автоматичного роботизованого розташування холдерів з кріоконсервованим біоматеріалом.

Кріосховища складають третю групу обладнання НТБ. Види сховищ залежать від умов зберігання біооб'єктів, що обумовлені їх характеристиками. Для абіотичних матеріалів: біоімплантів, алографтів, стерилізованих екстрактів, сублімованих форм препаратів потребуються шафи, холодильники з температурою від 4 до 18°C. Відносно зразків-сателітів для тестування основного матеріалу та біооб'єктів, що не містять клітин (сироватка, плазма крові, кріоекстракти) температура зберігання визначена в межах $-20\ldots -80^{\circ}\text{C}$. Термін зберігання КБПП при цьому не повинен перевищувати 6 місяців. Для забезпечення такого режиму зберігання НТБ обладнують морозильними камерами.

У якості низькотемпературних сховищ використовуються посудини Дьюара, які призначені для ефективного зберігання зразків у рідкому азоті (-196°C), або його парах (-150°C) протягом тривалого часу. Для зберігання біоматеріалу у карантинний період з метою тестування використовують кріосховища з парами азоту. Найбільш поширеними є посудини Дьюара – сховища біопродуктів типу ХБ-0,5 (рис.6.5).

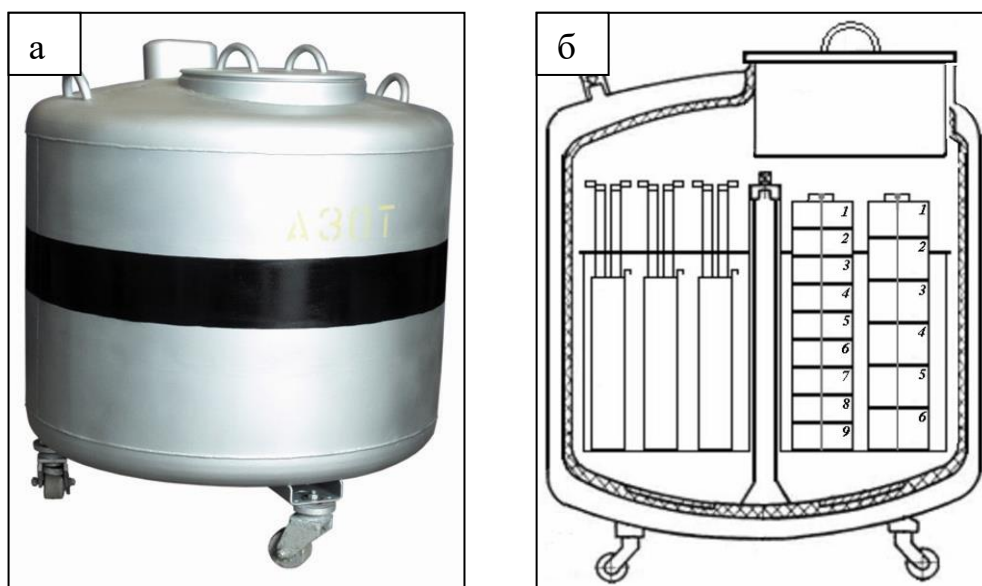


Рис. 6.5. Кріосховище ХБ-0,5: а) загальний вигляд, б) схема розміщення кріохолдерів.

Враховуючи перспективність НТБ КБПП та алгоритм довготривалого низькотемпературного зберігання КБПП для оснащення таких кріобанків доцільним є використання низькотемпературних сховищ з встановленою системою контролю рівня холодоагента і температури. Наприклад виробництва фірм Taylor Wharton і Air Liquide.

Четверта група обладнання НТБ представлена допоміжними і контрольно-реєструючими пристроями. До допоміжного обладнання відносять резервні і накопичувальні резервуари кріосховища (для тимчасового переносу біозразків у випадках ушкодження, санобробки, чи ревізії основних сховищ), накопичувальні резервуари та кріогенні цистерни (для запасів азоту; для наявності певної кількості азоту при поточних експериментальних і технологічних потребах), система заправки і дозаправки холодоносієм сховищ або установки для виробництва рідкого азоту.

З розвитком науки і техніки обладнання кріобанків становиться більш комплексним і автоматизованим, мінімізується антропогенна складова. Система BioArchive System об'єднує усе кріогенне обладнання в один комплекс, яким дистанційно керує співробітник банку через комп'ютерну програму. Існують кріобанки, в яких процеси роботизовано практично на 90%. Таким прикладом є кріобанк Deutsche Zellbank für Wildtiere в Інституті Фраунгофера «Біомедична інженерія» – IBMT Fraunhofer (Німеччина), де проводяться дослідження у галузі стовбурових клітин різноманітних організмів і органів, а також створено і поповнюються колекції клітин диких і рідкісних істот.

Аналіз діяльності світових НТБ доводить, що обов'язковим при організації і функціонуванні НТБ КБПП є існування бази даних кріоконсервованих матеріалів для отримання оперативної та найбільш повної інформації про наявність у банках інших міст і країн необхідних клітин, тканин, а також інших біооб'єктів [180, 182]. У рамках асоціації НТБ відбувається надання і обмін кріоконсервованими біооб'єктами з науково-дослідною та лікувальною метою, що також є доцільним і перспективним при створенні НТБ

КБПП. До переліку даних такої бази відносяться: адрес у кріосховищі, дата отримання і тестування КБПП з визначенням їх аутентичності, відповідності параметрам якості, а також наявність або адрес видачі матеріалу.

Для роботи в НТБ КБПП залучається персонал у відповідності затвердженим протоколам операційних процедур для виконання наукових, технологічних і технічних завдань. У теперішній час кваліфікаційні вимоги до співробітників НТБ дещо змінилися. Якщо раніше умовою для роботи в НТБ були фахові освіта і досвід (у галузі кріогенної техніки і технологій), то зараз відбулося зміщення пріоритетів у медико-біологічний бік. На перше місце виходить наукова компетенція співробітника–дослідника, водночас, вимоги до рівня його фахової кваліфікації не знижуються.

Специфіка банкування тканин та клітин людського походження, у тому числі БПП, їх дослідження і клінічне використання робить питання біоетики в діяльності таких НТБ принципово суттєвим [15, 235, 260].

Окрім фахових аспектів, НТБ КБПП несе відповідальність за додержання принципів прав і свобод людини (у даному контексті – донора, реципієнта, пацієнта, персоналу НТБ) відносно банкування і застосування тканин і клітин, виходячи з парадигми, що діяльність НТБ є привілегією, яка надається суспільством, а не внутрішнім правом медичної професії. Біоетика в цілому, і відносно роботи НТБ зокрема, обумовлює вирішення з позицій моралі питань, які стосуються досліджень людини та на людині, проблем взаємовідносин лікаря, дослідника і пацієнта, відношення суспільства до хворої людини, до досліджень, які проводяться на біоматеріалах людського походження, до лабораторних тварин, які використовуються в експериментах, а також питання екологічної безпеки відносно антропогенного впливу. Необхідною умовою етичності роботи з використанням тканин і клітин людини, їх досліджень, обробки для подальшого застосування у клініці є наукова обґрунтованість, коректність виконання, чітке додержання затверджених стандартів діяльності,

свідома добровільна участь пацієнтів у дослідженнях, належна кваліфікація персоналу НТБ КБПП, конфіденційність.

Основним документом, який забезпечує урегулювання етичних питань досліджень за участю людини, стандартом для діяльності НТБ КБПП у цьому напрямку є Хельсинська декларація прав людини (2000), а також Додатковий протокол до Конвенції з прав людини та біомедицини, трансплантології органів і тканин людського походження і Резолюції Ради Європи про гармонізацію законодавства країн-членів ЄС з питань вилучення, пересадки і трансплантації людських субстанцій з метою забезпечення відповідності стандартам етики усіх аспектів трансплантації, а також створення НТБ. Ці документи є імперативними міжнародними гарантми здоров'я, прав і гідності учасників банкінгу біоматеріалів і водночас – кодексом етичних принципів персоналу НТБ КБПП.

Динамічний розвиток банкування біоматеріалів обумовив потребу суспільства у системному аналізі сучасного стану даного напрямку з визначенням найважливіших досягнень, проблем і варіантів їх вирішення. З цією метою в 2011 році міждисциплінарною групою експертів було розроблено і виконано VII Європейську рамочну програму (FP 7) міжнародних досліджень. У звіті про виконання цієї Програми (2012р.) експерти ЄС позиціонували стратегію ЕАТБ на тісну співпрацю і доцільність гармонізації діяльності Європейських НТБ, що не є членами ЕАТБ. Відповідно до цього адаптація основних організаційних принципів і стандартів НТБ КБПП до європейських дозволить суттєво розширити їх можливості, і стане підґрунтям для сучасних наукових досліджень та більш ефективної допомоги населенню в охороні здоров'я.

Таким чином, проведений аналіз виникнення і розвитку банків біологічних об'єктів, систематизація та узагальнення даних сучасного стану проблеми біобанків в Україні, Європі, світі, а також власні дослідження та досвід Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, дозволили

сформулювати науково-організаційні принципи створення і функціонування НТБ КБПП.

Такими принципами, визначеними у результаті дисертаційного дослідження, є:

- 1) пріоритетність фундаментальних і експериментальних досліджень у галузі кріобіології і кріомедицини;
- 2) орієнтування на збереженість морфофункціональних характеристик кріоконсервованих біологічних об'єктів – основний методичний підхід НТБ КБПП;
- 3) спеціалізація банку – формування колекцій клітин, тканин, органних культур та біосубстанцій плаценти ауто-, ало- та ксеногенного походження в якості експериментального матеріалу, а також для біології, медицини та інш;
- 4) інформаційна і технічна оптимізація всіх структур та етапів роботи НТБ КБПП відповідно до сучасних вимог і стандартів;
- 5) науково-інформаційне співробітництво з фаховими медико-біологічними науковими установами України і світу з метою гармонізації взаємодій.

Створення НТБ КБПП ініціює новий виток наукових медико-біологічних досліджень. Подальшого прогреса у цій галузі можна досягти шляхом поширення мережі таких НТБ на основі визначених принципів їх організації і діяльності з залученням сучасних інноваційних програм. Безсумнівно, це необхідно для вирішення нагальних національних задач щодо охорони здоров'я людини, а також для підтримки пріоритету вітчизняної науки.

Наведені у розділі результати були опубліковані в наступних друкованих працях:

Чижевский В.В. Низкотемпературный банк биологических объектов: научно-методические основы и перспективы развития / В.В. Чижевский, О.С. Прокопюк, М.И. Грошевой, О.В. Липина, В.Ю. Прокопюк // Актуальные

проблемы криобиологии и криомедицины / Под. ред. акад. НАН Украины А.Н. Гольцева. – Харьков: издательский дом „Райдер”, 2012. – С. 469–486.

Грищенко В.И. Низкотемпературное хранение эмбриональных и фетоплацентарных тканей в Украинском банке биологических объектов / В.И. Грищенко, Т.Н. Юрченко, В.И. Страна, А.С. Снурников, О.С. Прокопюк // Международный медицинский журнал. – 1999. – № 2. – С. 113–115.

Грищенко В.И. Организационные формы работы Украинского банка биологических объектов / В.И. Грищенко, Т.Н. Юрченко, А.С. Снурников, О.С. Прокопюк, В.И. Страна // Експериментальна і клінічна медицина. – 2000. – № 4. – С. 124–126.

Грищенко В.І. Основні принципи та напрямки роботи низькотемпературного банку біологічних об'єктів / В.І. Грищенко, О.С. Прокопюк, Т.М. Юрченко // Трансплантологія. – 2003. – Т. 4, № 1. – С. 23–25.

Чижевский В.В. Особенности использования низкотемпературного хранилища для долгосрочного хранения биологического материала в парах жидкого азота / В.В. Чижевский, М.И. Грошевой, О.С. Прокопюк // Проблемы криобиологии. – 2007. – Т. 17, № 3. – С. 305–311.

Чижевский В.В. Криогенное хранилище: геометрия температурного поля и оптимизация условий хранения биоматериалов / В.В. Чижевский, М.И. Грошевой, О.С. Прокопюк, А.А. Беспалов // Цитология. – 2004. – Т. 46, № 9. – С. 831–882.

Пат. №69041А Україна, МПК7 А 01N01/02. Спосіб роботи низькотемпературного банку біологічних об'єктів / Грищенко В.І., Прокопюк О.С., Ліпіна О.В., Чижевський В.В., Ліннік Т.П., Висеканцев І.П., Грошевий М.І.; заявник та патентовласник Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України. – № 20031110797; заявл. 28.11.03; опубл. 16.08.04. Бюл. № 8.

Пат. №70805 Україна, МПК7 А 01N1/02. Контейнер для

низькотемпературного консервування біологічних об'єктів / Грищенко В.І., Ходько О.Т., Прокопюк О.С., Прокопюк В.Ю.; заявник і патентовласник Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України. – № 20031212856; заявл. 29.12.03; опубл. 15.10.04. Бюл. № 10.

Обладнання низькотемпературного банку біологічних об'єктів та умови довгострокового зберігання біологічних об'єктів у низькотемпературному банку: метод. рекомендації. / [В.І. Грищенко, І.П. Висеканцев, О.С. Прокопюк, О.В. Кудокоцева, Т.П. Петренко, С.В. Кошій, В.П. Марценюк, Т.М. Гуріна, М.І. Грошевий]. – Харків, 2004. – 14 с.

Наведені у розділі результати доповідалися та обговорювалися на International Conference «Cryopreservation and Safe Keeping of Cells and Tissues», 2002; III- та IV-му Всеросійських симпозиумах з міжнародною участю «Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии», 2007, 2010; IV-му Національному конгресі з біоетики, 2010; Всеросійській науковій школі-конференції «Стволовые клетки и регенеративная медицина», 2010.

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

Пріоритетним напрямком розвитку сучасної медицині є медико-біологічні наукові дослідження, які сприяють збереженню здоров'я та подовженню життя людини. Актуальна проблема цих досліджень – фундаментальне та експериментальне обґрунтування кріобіологічної біоінженерії та клітинно-тканинної терапії з використанням кріоконсервованих біоструктур раннього онтогенезу, в першу чергу – плацентарного походження. Увага вчених та клініцистів до плаценти та її похідних зумовлена унікальним потенціалом її розвитку, здатністю до біокорекції інволютивно-дистофічних процесів, репарації морфофункціональних ушкоджень, та тих, які розвиваються в організмі з віком [42, 45, 64, 114, 136].

Еволюційно обумовлена роль плаценти в організації та розвитку всіх органів і систем плода, а також її регуляторно-адаптивна функція у відношенні до ушкоджуючих факторів під час гестації і пологів реалізується через генетично детерміновані механізми [136]. У процесі гістогенезу суттєво змінюються структура, фізіологія та молекулярна біологія плаценти, що зумовлює специфічність методів її консервування і використання [42].

У попередніх дослідженнях отримано дані щодо кріоконсервування плаценти в ембріональному періоді – хоріона 6–12 тижнів гестації [81, 86], а також післяпологової плаценти – 40–41 тижнів вагітності [39, 139, 187]. Водночас відомо, що у цей період (40–41 тиждень гестації) практично завершується функція плаценти. У ній відбуваються еволюційно обумовлені інволютивні зміни, які потрібні для її відділення від організму жінки. Розвивається редукція судинного русла ворсин, у клітинах зменшується кількість глікогену, ліпідів, відбувається декомпозиція глікопротеїнових комплексів [114].

Морфологічно у післяпологовій плаценті 40–41 тижнів відбувається заміщення функціонуючих структур на дистрофічні (тромби, петрифікати, білі інфаркти). З цих причин виникає проблема нестабільності результатів її кріоконсервування і біологічної дії.

На нашу думку, для кріомедичних технологій доцільно використання плаценти пізньофетального періоду – 36–38 тижнів гестації. У цей період плацента характеризується структурною зрілістю, відсутністю ознак старіння і максимальною функціональною активністю, забезпечує органо- та системогенез, а також компенсаторні можливості плода під час пологів. Склад плаценти характеризується максимальною для організму гетерогенністю видів клітин і ступенем їх диференціювання – від стовбурових до зрілих. У плаценті містяться клітини цитотрофобласта, екстра- та ендovasкулярного гемопоезу, ендотеліоцити, МСК, моноцитарно-макрофагальні клітини, гістіоцити, клітини Кашценка-Гофбауера, прогеніторні, мезенхімальні, стовбурові клітини та інші [42, 111, 127].

У плаценті здійснюються процеси синтезу, секреції, перетворення і депонування практично всього спектра гормонів, імуномодуляторів, факторів росту і антипроліферативних сполук, вітамінів, регуляторів гемостазу, вуглеводного, ліпідного та білкового обмінів, газообміну. У цей час у тканинах плаценти синтезується клас пептидів – структурних аналогів нейропептидів головного мозку. В плаценті містяться інтерлейкіни, що індукують гуморальні фактори неспецифічної резистентності, стимулюють репарацію за рахунок активації мезенхімальних клітин і процесів неоваскуляризації. Крім того, плацента є слабоімуногенним органом, водночас вона реалізує імунорегуляторну функцію [136].

В основному, завдяки БАР, які продукує плацента у цей період розвитку, плід має високий ступінь толерантності до гіпоксичних, компресійних, стресорних впливів, до лабільності серцевої діяльності, травматичних ушкоджень, порушень кровообігу, мікроциркуляції та т.п. [64]. Таким чином,

використання біоструктур плаценти 36–38 тижнів гестації повинно позитивно впливати на відновлення і стабілізацію основних показників гомеостазу. Проте у літературі не наведено даних щодо визначення кріочутливості і відповідно результатів кріоконсервування та дослідження біологічної дії кріоконсервованих структур плаценти означеного терміну гестації.

Морфологічні та експериментальні дані дозволяють констатувати, що при застосуванні БПП відбувається стимуляція функцій ряду органів, підвищується репаративна здатність тканин організму. Крім того, вони впливають на організми, підвищуючи неспецифічну резистентність організму до несприятливих факторів зовнішнього середовища та стресових ситуацій [27, 79, 96, 98, 134, 188].

У результаті попередніх експериментальних та доклінічних досліджень отримано позитивні результати застосування БПП при ряді патологічних станів: цукровий діабет і його ускладнення, атеросклероз, постгеморагічні анемії, ендометріоз, чоловіче і жіноче безпліддя ендокринного та імунологічного генезу, невиношування вагітності, внутрішньоутробне інфікування плода, хронічні запальні процеси, наслідки гострого загального охолодження, серцево-судинна недостатність та інші [33, 34, 48, 80, 91, 129, 135].

Водночас не визначено механізми реалізації цих терапевтичних ефектів, а також роль складових КБПП при їх застосуванні. Тобто, на теперішній час не відомо, завдяки яким компонентам і структурам кріоконсервована плацента здійснює терапевтичний вплив, а саме: біологічно активним сполукам, абіотичній частині чи плацентарній тканині, яка зберігла вітальність. Не з'ясовано особливості біологічної дії БПП різного ступеня дезінтеграції – фрагментів, суспензії клітин, екстрактів, які містять есенціальні сполуки плаценти.

Сучасна демографічна ситуація характеризується суттєвим збільшенням частини населення похилого віку. Водночас спостерігається стійка тенденція до активного способу життя цієї вікової групи, що пов'язано з подовжуючими

життя фізичним навантаженням, творчою активністю, визначенням репродуктивних прогнозів. Природне бажання людей похилого віку продовжити активне фізичне та творче життя, сексуальну і репродуктивну функції, а також зменшити тяжкість хвороб, пов'язаних з віком, зумовлює розвиток медичних технологій у геріатрії. Існуючі профілактично-терапевтичні програми корекції геріатричної патології є мультикомпонентними, фармакологічна складова котрих представлена багатьма класами лікарських препаратів, вживання яких може призвести до ускладнень від фармакологічної агресії [40, 41]. Водночас, недостатня ефективність існуючих геропротекторів ініціює активний пошук природних комплексних біорегуляторів для відновлення порушених з віком функцій організму.

Враховуючи властивості плаценти як об'єкта клітинно-тканинної терапії можна очікувати корегуючого впливу на патогенетичні механізми старіння і пов'язаного з ним широкого спектра нозологічних форм. Питанням вивчення і застосування препаратів фетоплацентарного комплексу у геронтології присвячено поодинокі роботи, в яких не повністю розкрита дана проблема [50, 82, 95, 261].

При включенні плацентарних структур до терапевтичних програм пацієнтів старшого віку є підстави припустити, що функції плаценти трансформуються у процеси ремоделювання органів і відновлення функцій при лікуванні інволютивно-сенільних дегенеративних процесів, імунологічних, метаболічних порушень, для потенціювання репарації, збільшення адаптаційних властивостей організму пацієнтів старшого віку до несприятливих чинників. Актуальною науковою проблемою є верифікація цих процесів, визначення механізмів дії КБПП у геріатрії.

Потужний біологічний потенціал плаценти, а також її морфофункціональні зміни під впливом кріотехнологій обумовлюють проведення досліджень щодо можливих негативних реакцій і ускладнень терапії з використанням БПП, які необхідно визначити з метою забезпечення

біобезпеки пацієнта та його нащадків. Враховуючи певну нестабільність гомеостазу в період пізнього онтогенезу, важливим є дослідження впливу плацентарних факторів на усі рівні організації – клітини, тканини, органи і організм в цілому – з метою вибору для призначення БПП та визначення обмежень і протипоказань їх застосування у похилому віці.

Фундаментальні дослідження і експериментальна робота щодо теоретичного обґрунтування практичного впровадження клітинно-тканинної терапії, зокрема використання плаценти, можливі тільки при наявності відповідного кріобіологічного забезпечення. Розробка методів кріоконсервування дозволить зберегти морфофункціональні характеристики БПП, довгостроково зберігати їх у стабільному стані та всебічно досліджувати біологічний матеріал на відповідність заданим характеристикам, а також на можливу контамінацію патогенною флорою. Це дозволяє створювати необхідні запаси кріоконсервованого біологічного матеріалу, зокрема плацентарного.

Терапія з використанням клітин, тканин або есенціальних сполук плаценти у геріатричній практиці доцільна при збереженості складу і активності плаценти, які можуть забезпечити кріогенні біотехнології. Перспектива патогенетично спрямованого використання КБПП у пацієнтів похилого віку обумовлює появу нових питань.

Перш за все, залишається актуальною проблема створення ефективних програм кріоконсервування, тобто визначення оптимальних швидкостей заморожування–відтаювання, пошуку кріоконсервуючих розчинів, які зберігають плацентарні структури 36–38 тижнів гестації при ультранизьких температурах. Це пов'язано з тим, що на теперішній час не визначено механізми кріоушкоджень, що відбуваються в плаценті на етапах кріоконсервування.

Суттєве значення для збереженості вітальності деконсервованого біоматеріалу має його початковий морфофункціональний стан, тому визначення критеріїв використання нативної плаценти, в якості об'єкта кріотехнологічного процесінгу, є задачею, яка потребує обов'язкового вирішення.

Не вивчена кріочутливість і особливості кріоконсервування БПП різного ступеня дезінтеграції: фрагментів, клітин, есенціальних сполук.

Сучасним форматом роботи з кріоконсервованим біоматеріалом є забезпечення можливості його довгострокового зберігання, експериментального і клінічного використання в ало-, ксено- і аутосистемі, створення відповідних колекцій генетичного матеріалу з визначеними або заданими властивостями.

Ці проблеми вирішуються за умов низькотемпературного банку кріоконсервованих біооб'єктів, а саме КБПП. Для створення і ефективної роботи такого кріобанку важливо визначити наукові принципи його організації та функціонування.

Враховуючи вищевикладене, **метою** даного дослідження стало визначення процесів, які відбуваються на етапах кріоконсервування в БПП виділених з плаценти 36–38 тижнів гестації, розробка оптимальних для медичного застосування методів їх кріоконсервування та встановлення основних механізмів їх впливу на організм при віковій патології.

Для досягнення мети дослідження необхідно було вирішити наступні задачі:

- встановити клінічні, морфологічні та біохімічні показники плаценти, які є критеріями доцільності її використання в якості джерела для отримання фрагментів, клітин та кріоекстракту;
- отримати біологічні структури плаценти 36–38 тижнів гестації різного ступеня дезінтеграції (фрагменти, клітини, комплекс біологічно активних речовин плаценти) та визначити їх морфофункціональні характеристики;
- оцінити структурно-функціональні зміни, що відбуваються в БПП під впливом низьких температур, та ефективність протоколів кріоконсервування;
- створити ефективні програми кріоконсервування фрагментів, клітин та одержання кріоекстракту плаценти 36–38 тижнів гестації, отримати КБПП, дослідити збереженість їх аутентичних властивостей;
- встановити особливості функціонування кріоконсервованих фрагментів,

клітин та кріоекстракту плаценти 36–38 тижнів гестації в системі *in vitro*: дослідити вплив КБПП на клітинну тест-культуру *BHK-21 clone 13/04*, на її проліферативну активність, мітотичний режим, цитогенетичну стабільність;

- виявити особливості впливу КБПП на організм у динаміці, встановити початок, пік і тривалість безпосередньої їх дії *in vivo*, обґрунтувати диференційовані показання/протипоказання для призначення у похилому віці КБПП різного ступеня дезінтеграції;

- провести дослідження вірогідної побічної дії отриманих КБПП: аномальної токсичності, ембріолетальної, тератогенної дії з метою біобезпеки при їх використанні для корекції інволютивних процесів;

- з'ясувати вплив КФП на організм лабораторних тварин пізнього онтогенезу з метою патогенетичного обґрунтування їх застосування в геронтології;

- на основі системного аналізу отриманих даних встановити основні механізми дії КФП на організм в період пізнього онтогенезу;

- сформулювати науково-організаційні принципи створення і функціонування НТБ КБПП.

Відповідно до методологічного алгоритму дисертаційної роботи проведено 4 етапа досліджень.

На першому етапі проводили дослідницько-біотехнологічні експерименти. Вихідний стан біологічного об'єкта, зокрема плаценти, визначає збереженість біоструктур і ефективність їх біологічної дії після проведення кріогенних біотехнологій. З метою виявлення критеріїв відповідності морфофункціонального стану плаценти в якості потенційного об'єкта НТБ було обстежено 197 вагітних і проаналізовано 170 історій жінок, які народжували у терміні гестації 36–41 тиждень. При аналізі отриманих даних було виявлено, що детермінуючим критерієм є термін вагітності, що становив 36–38 тижнів гестації, відсутність в анамнезі і під час вагітності екстрагенітальної патології, інфекційного процесу, плацентарної дисфункції. Серед біохімічних показників

під час вагітності інформативними і такими, що відповідають функціональній активності плаценти, визначено рівень ПЛ у сироватці крові – 10470 ± 870 МОд/мл; ХГЛ – 23720 ± 1230 МОд/мл.

Визначені сполуки синтезуються плацентарними клітинами, їх рівень свідчить про активність різних функцій плаценти. Синтез ХГЛ реалізується, головним чином, клітинами синцитіотрофобласта і цитотрофобласта, що диференціюються. Перехід цитотрофобласта в синцитіотрофобласт призводить до збільшення секреції ХГЛ. В умовах гіпоксії, плацентарної дисфункції процес диференціювання клітин цитотрофобласта в синцитіотрофобласт блокується, при цьому відмічається зниження рівня ХГЛ. Існує взаємозв'язок між секрецією ХГЛ, проліферацією і диференціюванням трофобласта. Високій швидкості проліферації відповідає значне збільшення рівня ХГЛ у сироватці крові вагітної. При відсутності ХГЛ проліферативна активність знижується до критичного рівня – 60% [12, 289, 437]. Таким чином, визначений рівень гормону можна вважати критерієм проліферативної активності трофобласта, відповідно морфологічної структури плаценти, в якості об'єкту для НТБ.

Продукція плацентарного ПЛ – аналогу поліпептидного гормону передньої долі гіпофіза (гіпофізарного ПЛ) і соматотропного гормону відбувається в синцитіотрофобласті і децидуальній оболонці плаценти. Плацентарному ПЛ притаманна омніпотентність і, відповідно, поліфункціональність, він відіграє важливу роль у підтримці гомеостазу, реалізації дії факторів росту, анаболічних реакціях, синтезі простагландинів, регулює ангіогенез. Плацентарний ПЛ є медіатором, що, поряд з іншими, забезпечує взаємодію нервової, ендокринної та імунної систем у відповідь на функціональний запит організму [45, 136]. Рівень ПЛ у сироватці крові вагітної, визначений у даному дослідженні, свідчить про збереженість регуляторної і структуроутворюючої функції плаценти.

Післяпологові плаценти надавались породілею на основі інформованої згоди. Макроскопічно визначали наявність або відсутність ознак патології –

плацентарної недостатності – кальцинатів, інфарктів, кист, крововиливів, імбібування меконієм та інш. Плацентометричними критеріями визначено: діаметр $20,7 \pm 4,2$ см, вагу $570 \pm 60,5$ г, плодово-плацентарний індекс складав $1/5 - 1/7$ при задовільному стані новонародженого. Верифікацію морфофункціонального стану плаценти проводили за позитивними даними експрес-методів у реальному часі та класичним гістологічним методом з забарвленням гематоксилін-еозином в якості порівняння з попередніми індикаторними критеріями. Так, візуалізація гранулоутворення у цитоплазмі клітин при забарвленні нейтральним червоним ворсин плаценти свідчила про їх вітальність. При означених параметрах у гістологічних препаратах спостерігали неушкоджені синцитій, клітини цитотрофобласта, мезенхіму, судини ворсин, макрофагальні елементи, синцитіальні вузлики, мезенхімальні ворсини, що є резервом росту і розвитку плаценти, в кількості до 3%. Такий відсоток відповідає активному процесу структуроутворення ворсин.

Таким чином, комплекс обраних і визначених параметрів відповідає активному морфофункціональному стану плаценти і може бути критерієм відбору плацент для подальшого кріотехнологічного дослідження.

Аналіз отриманих результатів даного етапу дисертаційної роботи доводить, що при дослідженні структурних та функціональних параметрів плаценти спостерігається значне коливання даних. Це положення також обумовлює актуальність даної серії досліджень.

В цілому, орієнтуючись на вищезазначені критерії морфофункціональної відповідності, для відбору плацентарного матеріалу з оптимальним вихідним станом визначено, що у 32,9% випадків післяпологова плацента відповідає визначеним параметрам і може бути використана в якості об'єкта для кріотехнологій.

Із плацент, що відповідали таким критеріям, отримували КЕП, КФП, ККП.

Методи отримання КБПП базувалися на власних науково-експериментальних дослідженнях, що вирішували біотехнологічне завдання відповідно до ступеня дезінтеграції плацентарного матеріалу. Таким завданням щодо технології отримання КЕП є максимальне екстрагування біологічно активних есенціальних сполук зі збереженістю їх фізіологічного співвідношення і активності. Водночас, необхідно мінімізувати наявність клітинного детриту, вільного гемоглобіну; забезпечити відсутність патогенної флори і довгострокове зберігання стабільної форми отриманого КЕП.

Результати наукових досліджень останніх років свідчать про можливість програмувати вихід біомолекул із кріоконсервованих фрагментів органів залежно від виду кріозахисту (застосування ендо- або екзоцелюлярних кріопротекторів). Завдяки таким прийомам дослідники ініціювали переважну екстракцію цитоплазматичних білків або нуклеотидів різної молекулярної маси з кріоконсервованих фрагментів ксеноорганів. Проте, для отримання КЕП і використання його в алогенній системі важливо забезпечити збереженість природних співвідношень есенціальних сполук для реалізації каскадної біорегуляторної дії плацентарних медіаторів. Тому при отриманні КЕП ми не використовували кріопротектори. КЕП отримували за методом кріодеструкції-кріоекстракції. При порівнянні ефективності отримання БАР плаценти залежно від кількості циклів заморожування-відтаювання (1–4 цикли) з коливанням температур ($25^{\circ}\text{C} \rightarrow -80^{\circ}\text{C} \rightarrow 25^{\circ}\text{C} \rightarrow -196^{\circ}\text{C} \rightarrow 25^{\circ}\text{C}$) і наступним відокремленням детриту центрифугуванням у водно-сольовому розчині було визначено, що оптимальною є трьохетапна програма кріоекстракції. Супернатант після трьохетапної програми кріоекстракції являв собою КЕП, його розливали у кріоампули і розташовували у кріосховищах з рідким азотом для довгострокового зберігання та подальшого дослідження складу і біологічної дії. В результаті такий КЕП після розморожування макроскопічно мав вигляд однорідної напівпрозорої рідини рожевого кольору, мікроскопічно – препарат однорідний, клітини, їх фрагменти, детрит не визначалися, співвідношення

есенціальних сполук плаценти практично співпадали з такими в сироватці кордової крові. Екстракція БАР була максимальною і перевищувала їх вміст в КЕП при інших – 2- або 4-етапних програмах а також в МІБП кріоцел-кріоекстакт плаценти. Рівні БАР в КЕП коливалися в досить широких межах, що характерно для плацентарного матеріалу, і залежить від індивідуальних особливостей. Звертає на себе увагу вірогідно більш високий вміст прогестерону і знижена концентрація естрадіолу. Такі співвідношення даних гормонів є фізіологічними для антенатального періоду, оскільки прогестерон відіграє провідну роль у пролонгуванні вагітності, його концентрація є високою при прогресуючому гестаційному процесі (36–38 тижнів) і морфофункціонально активній плаценті. Таким чином, оптимізована трьохетапна кріопрограма дозволяє максимально екстрагувати есенціальні сполуки із клітин і позаклітинного матриксу плаценти зі збереженням структури та біологічної активності плацентарних біомолекул.

Метою кріоконсервування СКП є збереженість вітальності клітин. Поряд з цим для кріоконсервування експлантів у вигляді тканинних фрагментів необхідно забезпечити збереженість як клітин, так і міжклітинних взаємодій. Тому для кріоконсервування клітинних суспензій і фрагментів плаценти досліджували захисну дію ряду кріоконсервантів і програм заморожування.

Основою кріопрограм були кріобіологічні положення, відповідно до яких ефективність цих програм обумовлена послідовністю наступних етапів: повільне охолодження біоматеріалу від початкової температури до температури кристалізації, стабілізація температури у камері заморожувача в процесі кристалізації і швидке охолодження біоматеріалу до ультранизких температур. На першому етапі ми проаналізували теплофізичні зміни, що відбуваються з досліджуваними кріоконсервантами при реалізації кріопрограм.

Оцінка фазових діаграм розчинів кріопротекторів, зокрема діаграм плавлення, важлива для розуміння механізмів кріоушкодження і кріозахисту

клітин і тканин при дії на них низьких температур у присутності кріозахисних сполук.

У наших експериментах реєструвалися термограми, які віддзеркалювали теплові ефекти, що мали місце при заморожуванні досліджуваних розчинів кріоконсервантів (ДМСО, ПЕО, ДМФА, 1,2-ПД, ГЕК, сахароза) та їх сумішей. Ми вважали за необхідне провести скринінг цих сполук, оскільки в попередніх роботах (власних та інших дослідників) визначено різний ступінь їх кріозахисної дії. Водночас для експлантів плаценти 36–38 тижнів гестації такі дані не виявлено.

При аналізі отриманих нами термограм кріосередовищ найбільший інтерес викликали зони переоходження і кристалізації системи та температурні зміни, що в них відбувалися. Ці дані з урахуванням теплофізичних особливостей розчинів кріоконсервантів використовували в подальшому для розробки режимів заморожування БПП. Визначення зони переохолодження, яке є одним з найбільш кріоушкоджуючих факторів для біосистеми, дозволило значною мірою нівелювати пошкодження при застосуванні режиму сидінгу (протягом 90 сек температурою -90°C) у цих зонах. Суттєвою перевагою цих програм є можливість реалізації більш високих швидкостей охолодження на посткристалізаційному етапі, що також повинно позитивно впливати на кріозахист біосистеми.

КФП отримували шляхом відокремлення від плаценти часточок розміром $1,0 \times 0,5 \times 0,5$ см із наступним їх кріоконсервуванням. У результаті реалізації кріогенних біотехнологічних програм отримано КФП з різними морфофункціональними характеристиками.

При морфологічній оцінці КФП, які заморожували під захистом досліджуваних кріопротекторів, визначено, що найбільш ефективну дію має 5%-й ДМСО. Мікроскопічно в деконсервованих фрагментах плаценти спостерігали всі елементи, які є в нативних зразках: синцитій, цитотрофобласт, мезенхіма з судинами, вільними макрофагальними елементами. Проте в структурі тканини

було виявлено порушення цілості, яке інтерпретується як ознака кріоушкоджень, а саме: місця відшарування трофобласта від мезенхіми, розриви мезенхіми, дезінтеграція міжклітинної речовини. Такі зміни пояснюються гідрофільністю ембріональної мезенхіми ворсин, і, як наслідок, – посиленням кристалоутворення при кріовпливі, що призводить до деструкції на етапах заморожування–відтаювання.

Проблему вирішували внесенням до складу кріоконсерванта сполук, здатних виводити рідину з тканин: декстрану («Поліглюкін»), ПВП («Гемодез Н»), ГЕК («Рефортан»), сахарози.

Найкращі результати було отримано при використанні консерванта до складу якого входили 5%-й ДМСО та 5%-й ГЕК. Природа цього ефекту полягає в тому, що саме ГЕК внаслідок своєї специфічної колоїдної структури є тканинним дегідратантом, який витягує рідину з міжклітинних просторів, не ушкоджуючи клітини.

Для подальшої оптимізації кріопротекторів з метою ініціації кристалоутворення було застосовано режим сидінгу у зоні переохолодження, що призвело до збереженості синцитію у вигляді безперервної базофільної кайми з гіперхромними ядрами, клітин цитотрофобласта, стромы, а також відсутністю структурних порушень міжклітинних контактів.

Враховуючи те, що під дією низьких температур у біоструктурах можуть відбуватися зміни, зокрема сублетальні кріоушкодження на ультратонкому рівні, які виявляються після їх відтаювання та подальшого функціонування, ми провели електронно-мікроскопічне дослідження деконсервованих ворсин плаценти після 4-х годин культивування.

У порівнянні з контрольними нативними зразками із збереженими структурами ворсин, клітинами і міжклітинними взаємодіями, при прямому зануренні фрагментів плаценти в азот без кріопротекторів виявлено грубі деструктивні зміни: конденсація хроматину по периферії ядра, яке інтерпретується як апоптотичне явище, фрагментація мембран, значна

вакуоляризація перинуклеарної зони, деструкція органел, що призводить до летальних ушкоджень.

Кріоконсервант (5% ДМСО+5% ГЕК) дозволив в основному зберегти структуру синцитію та клітин трофобласта. Порушення міжклітинних взаємодій виявлялися рідко. Частіше ушкоджувалися ендотеліоцити. Проте, враховуючи, що їх роль при імплантації фрагментів плаценти незначна, факт девіталізації ендотеліоцитів не є принциповим для оцінки збереженості плацентарних експлантів. Водночас були виявлені ділянки відшарування мікроворсинок, інколи – вакуолізація ендоплазматичного ретикулума і цитоплазми.

Режим сидінгу дозволив зменшити явища вакуолізації, структура КФП мало відрізнялася від нативних зразків: синцитій з ядрами був вкритий маргінальною каймою мікроворсинок, хроматин дифузно розподілений і конденсований вздовж нуклеарної мембрани. В цитотрофобласті виявлялися клітини з полігональними ядрами. Мезенхіма була практично без ушкоджень з мікросудинами, клітинами Кащенко, фібробластоподібними клітинами.

Забарвлення трипановим синім не перевищувало до 6% клітин деконсервованої тканини, при чому барвник не проникав крізь трофобластичний шар, при взаємодії з нейтральним червоним спостерігалася його гранулоутворення у цитотрофобласті й окремих елементах мезенхіми, що характерно для морфофункціональної збереженості тканини.

При культивуванні КФП продукція АФП віддзеркалювала їх синтетичну активність.

Отримані результати дозволяють стверджувати, що кріоконсервування плацентарних експлантів під захистом 5% ДМСО обумовлює збереженість їх клітинного складу, але для кріозахисту структури тканини і міжклітинних взаємодій необхідно багатокомпонентне середовище, що містить регулятор водно-електролітного балансу ГЕК, а також застосування ініціації кристалоутворення.

Отримання ККП є актуальною проблемою сучасної науки, оскільки плацента розглядається як перспективне джерело стовбурових, прогеніторних, мезенхімальних, гормонопродукуючих, гемопоетичних, імунокомпетентних та інших клітин для дослідження, створення лікарських форм та запасів аlogenного або аутологічного генетичного матеріалу для застосування в клініці. Водночас дезінтеграція плацентарного матеріалу являє собою складну біотехнологічну задачу, оскільки такий процес реалізується механічним і ферментативним шляхом. Проте макроструктурно плацента в основній своїй масі це – розгалужена мережа судин різного діаметра і призначення. Сполучнотканинна оболонка судин плаценти досить щільна, що суттєво перешкоджає механічному виділенню клітин синцитію, цитотрофобласта або мезенхіми. Стандартні протоколи ферментативного роз'єднання клітин відносно плацентарних об'єктів є малоефективними. Пояснити це можливо генетично детермінованою стійкістю плацентарних структур до дії протеолітичних ферментів, оскільки адгезія і нідація зародка, інвазія трофобласта і плацентація супроводжуються масивним виходом плацентарних протеолітичних і гідролітичних ферментів, активізацією лізосом ендометрія, що призводить до руйнування епітелію і судин матки для забезпечення формування материнсько-плодового кровообігу. В умовах високої ферментативної активності середовища плацентарні структури еволюційно набули вищезазначену стійкість до дії ферментів [45]. Так само складною задачею є фенотипування клітин плаценти в суспензії, оскільки потужна ферментативна дезінтеграція позбавляє клітини маркерів кластерів диференціювання. Проблеми вирішували оптимізацією процесу з урахуванням вищезазначеної специфіки плацентарних структур. З плацент 36–38 тижнів гестації відокремлювали і подрібнювали мезенхімальні ворсини з синцитіальними вузлами, які є молодими структурами плаценти з мікросудинами і пухкою структурою ворсин. Дезагрегацію клітин проводили комплексним

ферментативним методом (трипсин, колагеназа, ДНК-за) з подовженням часу і послідовною зміною температур.

Кріоконсервування отриманої суспензії клітин плаценти проводили враховуючи її гетерогенність з максимально можливим алгоритмом кріозахисту для досягнення збереженості різних типів клітин. Клітини кріоконсервували за двохетапною програмою (повільно – зі швидкістю 1град/хв до -70°C , потім швидко – шляхом занурення у рідкий азот) із застосуванням 10% ДМСО.

У деконсервованій суспензії ККП виявлено вміст ядерних клітин у концентрації $10^6/\text{мл}$, суправітальним барвником (трипановим синім) забарвлювалося не більше 5% клітин. Адгезія клітин спостерігалася до 3-ї години культивування з наступним формуванням синцитіоподібних структур (3–4 доба), та монослою (7 доба).

Підрахунок живих клітин в суспензії кріоконсервованих клітин плаценти (ККП) методами забарвлення і фенотипування ККП методом проточної цитофлуориметрії на цитометрі FACS Calibur фірми Becton Dickinson («BD» США) з використанням реагентів «BD» за міжнародним протоколом «ISHAGE» показали, що їх збереженість дорівнює 91%. В даному дослідженні ККП демонстрували фенотип, еквівалентний нативним клітинам. Виявлення в суспензії кріоконсервованих клітин, що несуть високогліколізований трансмембранний білок CD34 (2,45%) (життєздатних 1,65%) характеризує цю фракцію клітин як генерацію ранніх лімфогемопоетичних стовбурових клітин, клітин-попередників ендотелію судин, нейроклітин і фібробластів. Даний антиген бере участь в міжклітинній адгезії та регулюванні диференціювання клітин. В суспензії були також виявлені клітини (0,33%), які експресують CD45, що є рецептором протеїнтирозинфосфатази – довгої одноланцюгової трансмембранної молекули, і вважається загальним для всього лейкоцитарного ряду. Висока щільність його експресії виявляється на лімфоцитах, на активованих Т-клітинах і Т-клітинах пам'яті. Одночасно в ККП виявлено значну кількість клітин, що не відносяться до лейкоцитів. Їх вітальність становила до

91%, що підтверджувалося характерними культуральними реакціями (адгезія, формування моношару, секреція ХГЛ і АФП). Високий відсоток вітальності ККП відображає ефективність програм їх отримання і кріоконсервування.

Проблема визначення вітальності кріоконсервованих біооб'єктів не обмежується констатацією збереженості структури і метаболізму після деконсервування. Важливою є верифікація їх біологічної дії на біосистеми різного ступеня організації та інтерпретація отриманих даних щодо вкладу КБПП в сано- або патогенез з визначенням механізмів позитивної – ревіталізуючої, або негативної – ушкоджуючої їх дії.

На другому етапі дослідження відповідно до концепції роботи встановлювали особливості механізму дії КБПП різного ступеня дезінтеграції (КЕП, ККП і КФП), що мали максимально високі показники збереженості структури, функцій та БАР, узагальнюючи дані щодо їх впливу на клітини, органи та організм у модельних системах.

Визначення впливу КБПП на клітинну культуру розкриває його особливості на клітинному і субклітинному рівнях. В якості тестової моделі було обрано паспортизовану клітинну культуру *BHK-21 clone 13/04*. Аналіз даних щодо проліферативної активності клітин *BHK-21 clone 13/04* демонструє, що внесення КБПП у концентрації 0,2 % до живильного середовища не знижувало приріст клітин, додавання КЕП у концентрації 0,4 % пригнічувало їх приріст, що може бути пов'язано зі слідовою наявністю вільного гемоглобіну, який діє токсично на клітини *in vitro*. Присутність у середовищі 0,4 % ККП або КФП викликає стимуляцію приросту клітин *BHK-21 clone 13/04*.

Морфологічно культура клітин у присутності КБПП складалася із середніх за розміром клітин з округлими ядрами, з наявністю від двох до декількох ядерців. У моношарі патологічних змін практично не виявлялося.

При аналізі мітотичного режиму клітин в експерименті визначено збільшення мітотичної активності клітин культури, їх приріст за певний час зростав у присутності КБПП. Фази мітозу клітин відповідали нормі у більшості

клітин, що діляться. Серед патологічних мітозів зустрічалися форми з мікроядрами, 3-полосний мітоз, що свідчить про перебудови в хромосомах і веретені ділення клітин. Процент патологічних мітозів та їх динаміка серед клітин, що діляться, не перевищували припустимі рівні, що свідчить не про токсичність КБПП, а про адаптивні перебудови в клітинах культури до ростових плацентарних факторів.

У подальшому досліджували КБПП в експерименті *in vivo*. Експерименти на лабораторних тваринах проводили з дотриманням загальних Національних норм з біоетики (1-й Національний конгрес з біоетики, Київ, 2001) і положень «Європейської Конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1985) які були підтримані Комітетом з біоетики ІПКіК НАН України.

Дози препаратів, що вводилися тваринам, розраховували за Ю.В. Риболовлевим та ін. (1979), О.В. Стефановим (2000). Визначення циркуляції сполук плацентарного походження в організмі після введення КБПП у динаміці висвітлює особливості впливу на макроорганізм клітинно-тканинних і безклітинних КБПП, а саме – на початок дії, його пік і тривалість.

За вмістом в організмі лабораторних тварин АФП и ХГЛ методом твердофазного ІФА з використанням тест системи «Вектор бест» (Росія) було виявлено, що КЕП чинить максимальний вплив у першу добу після введення, його безпосередня дія обмежується тижнем, у подальшому ефект обумовлюють реакції організму на компенсацію сполук, що вводяться, та їх релізінг-ініціююча дія. Введення КПФ і ККП призводить до більш плавної динаміки вмісту сполук, що досліджувались (ХГЛ и АФП), тривалість їх виявлення була більшою (в 4–9 разів), що пояснюється функціонуванням у організмі збережених фрагментів і клітин плаценти.

Результати вивчення структури імплантованих КФП і оточуючих тканин в організмі експериментальних тварин, в якості його реакції на введення БПП, свідчили про те, що кріотехнології дозволяють досить тривалий час (до 60 діб)

функціонувати імплантованим КФП, реалізувати замісну функцію, а саме регуляторну та синтетичну, а також чинити системний ініціюючий вплив на регенеративний потенціал в організмі реципієнта.

Отримані дані мають вирішальне значення при виборі КБПП у залежності від ступеня дезінтеграції при їх призначенні в конкретній клінічній ситуації. Для досягнення швидкого, максимально можливого, короткочасного ефекту при стабільному гомеостазі чи достатньому власному потенціалі відновлення його балансу – доцільно застосування КЕП. У ситуаціях, коли потрібна довготривала замісна та регуляторна дія плацентарними сполуками, а також з метою запобігання різких коливань у системі гомеостазу препаратом вибору є клітинно-тканинні КБПП і в першу чергу – КФП.

Перспектива клінічного застосування КБПП, враховуючи їх багатовекторний потенціал, спонукала до проведення тесту на аномальну токсичність, тобто введення лабораторним тваринам терапевтичної дози, розрахованої для людини. У цих модельних експериментах у тварин не спостерігалось ознак інтоксикації, місцевої чи загальносоматичної патології, до терміна завершення експериментів вага тварин не змінилась, летальності серед них не було. Додатково не визначено патологічних змін внутрішніх органів – головного мозку, печінки, нирок, селезінки (при гістологічному аналізі) в даній серії експерименту.

Дослідження впливу КБПП на внутрішньоутробний розвиток організму здійснено в зв'язку з тим, що механізми впливу на організм є найбільш демонстративними при їх вивченні в біосистемах, які динамічно розвиваються. Безумовно, це відноситься до внутрішньоутробного плода, як найбільш чутливого біооб'єкта, і, в першу чергу, в випадку негативного біовпливу.

Вагітним самицям вводили КБПП і досліджували їх вірогідну ушкоджуючу дію на гестацію. Аналіз репродуктивних результатів виявив збільшення передімплантаційної, загальної ембріональної летальності після введення КЕП. У випадку застосування КФП і ККП спостерігався позитивний

ефект трофічного впливу на фетоплацентарний комплекс, репродуктивні втрати знижувались відносно середніх контрольних показників.

При макроскопічному вивченні ембріонів дослідних тварин зовнішні ознаки аномалій розвитку були відсутні. Морфоанатомічними дослідженнями всіх внутрішніх органів визначено, що на фоні застосування КЕП відбувається достовірне збільшення кількості крововиливів, набряків, затримки осифікації. Тератогенні ускладнення при застосуванні КФП і ККП були відсутні, водночас виявлено їх позитивний вплив на процеси осифікації.

Отримані дані можуть бути інтерпретовані кореляцією вмісту біологічно активних плацентарних сполук в організмі реципієнта після введення КБПП у динаміці. Тобто значний вміст плацентарних сполук у першу добу після введення КЕП з наступним різким їх зниженням порушує тонкі процеси гістогенезу, а поступове і тривале їх надходження при введенні КФП і ККП потенціує структуроутворення клітин, органів і організму в цілому.

Аналіз морфофункціональних характеристик і особливостей біологічної дії отриманих КБПП, а саме доведений стимулюючий вплив КФП і ККП на проліферативну активність клітинних культур при відсутності цитотоксичної та мутагенної дії, ембріотоксичного та тератогенного впливу при збереженості функціональної активності, дозволили верифікувати біобезпечність їх застосування.

За допомогою системного аналізу отриманих експериментальних даних визначено специфіку отримання, кріоконсервування і біологічної дії БПП (фрагментів, клітин, комплексу есенціальних сполук плаценти) з високим ступенем збереженості їх морфофункціонального стану.

Третім етапом дослідницької роботи було визначення механізмів саногенезу та ефективності корекції інволютивних процесів у похилому віці з використанням КБПП. Базуючись на попередніх висновках, ми вважали оптимальним використання КФП 36–38 тижнів гестації у програмі корекції геріатричних проявів. Обґрунтуванням цього вибору є доведені структурна

збереженість, висока функціональна активність КФП, повільна динаміка їх біологічного впливу при відсутності негативно-пошкоджуючої дії на біосистеми організму.

Для з'ясування механізмів впливу КФП на організм лабораторних тварин пізнього онтогенезу 18-місячним щурам лінії Вістар (50 самиць і 50 самців) під місцевою новокаїновою анестезією проводили імплантацію КФП під шкіру в паравертебральну ділянку над крижами. Ці тварини склали основні експериментальні групи. Групами порівняння були інтактні молоді (5-місячні) тварини, а також інтактні та хибнооперовані старі тварини (18-місячні). Дозу імплантованих КФП розраховували по Ю.В.Риболовлеву [108].

Через 2 місяці тварин виводили з експерименту.

Аналіз морфометричних характеристик, поведінкових реакцій, а також відбір тварин без ознак хвороб (абсцеси, пухлини, виразки) дозволив характеризувати експериментальні групи на початку дослідження як репрезентативні для кожної вікової групи і статі.

За вільнорадикальною теорією старіння з віком суттєво змінюється інтенсивність процесів ВРО і функціональна активність АОС. Водночас існуючі дані щодо різноспрямованого впливу БПП на ВРО/АОС обумовили необхідність дослідження цієї системи при дії КБПП на організм у похилому віці.

При дослідженні показників ВРО в сироватці крові самців щурів було виявлено, що рівні гідроперекисів ліпідів та інтенсивність аскорбат- Fe^{2+} індукowanego ПОЛ у сироватці тварин пізнього онтогенезу мали тенденцію до підвищення порівняно з відповідними показниками в молодому віці. Імплантація КФП старим тваринам достовірно не змінювала кожний окремий показник у групах, проте ми спостерігали тенденцію до наближення показників прооксидантної системи у старих тварин з імплантацією КФП до показників молодих щурів.

Дослідження активності АОС у сироватці крові тварин експериментальних груп виявило, що активність глутатіонпероксидази та вміст

ферментативно активного ЦП різко та вірогідно зменшувались по мірі старіння тварин (з $843,1 \pm 36,5$ до $446,1 \pm 84,2$ нМоль NADPH/хв $\times$ мл – глутатіонпероксидази та з $2,09 \pm 0,12$ до $0,82 \pm 0,08$ нМоль/мл – ЦП), після імплантації КФП ці показники вірогідно зростали ($727,9 \pm 48,8$ нМоль NADPH/хв $\times$ мл – глутатіонпероксидаза та $1,03 \pm 0,05$ нМоль/мл – ЦП), але не досягали рівнів, характерних для молодих тварин.

Було продемонстровано, що інтенсивність процесів ВРО в печінці тварин набувала характерних вікових ознак. Рівні гідроперекисів ліпідів мало відрізнялися у всіх групах тварин. Рівень ШО у групі щурів пізнього онтогенезу був вірогідно підвищений ($17,31 \pm 1,52$, УО/мг білка), а після застосування КФП знижувався до рівня ($14,52 \pm 1,33$ УО/мг білка) і статистично не відрізнявся від цього показника у молодих тварин. При дослідженні активності антиоксидантних ферментів в пост'ядерній фракції клітин печінки виявлено, що активність каталази, ГП та глутатіонтрансферази у тварин пізнього онтогенезу достовірно зменшується, а після імплантації КФП відновлюється до рівня, характерного для молодих тварин. При цьому досліджувані показники змінювалися синхронно у групах самців і самиць. Таким чином, при дослідженні процесів ВРО/АОС виявлено, що з віком спостерігається зсув системи в бік прооксидантних процесів, а з застосуванням КФП вдається певною мірою відновити активність основних антиоксидантних ферментів.

З огляду на те, що у структурі захворюваності і летальності в старості превалює коронарна і судинна патологія, в першу чергу, ми досліджували вплив імплантацій КФП на серцево-судинну систему в експерименті.

При морфологічному дослідженні міокарда у старих самців спостерігали фіброзні зміни в тканині, зниження рівня РНП, що свідчить про уповільнення анаболічних процесів, зниження інтенсивності синтезу білка. Після імплантації КФП ці показники покращились, що було підтверджено імуногістохімічними дослідженнями. Так, спостерігалось відновлення рівней інтенсивності світіння РНП і ДНП, зниження вмісту колагену IV типу, підвищення інтенсивності

світіння рецепторів до ендотеліну 1, що свідчить про більш адекватну регуляцію реактивності судин, їх скорочення, продукцію вазорелаксантів, факторів росту, приводячи до підтримки мікрогемодинаміки. Відзначено зниження підвищеного індексу апоптозу (за рівнем CD95 – мембранного рецептора, який ініціює апоптоз).

Важлива роль печінки в усіх видах обміну речовин, синтезі білків, підтримці гомеостазу, детоксикації, а також суттєве зниження її функціональних можливостей внаслідок інволютивно-дистрофічних змін у старшому віці, обумовили дослідження впливу імплантації КФП на стан печінки у тварин пізнього онтогенезу. Після введення КФП у старих щурів виявлено суттєве відновлення структури паренхіми печінки за рахунок зменшення дифузного фіброзу, який спостерігався раніше, до незначного перипортального фіброзу, нівелювалися явища жирової дистрофії. Імплантація КФП старим щурам призводила до відновлення інтенсивності забарвлення на ДНП і РНП, зниження підвищеного апоптозного індексу і реструктуризації колагену IV типу, збільшення світіння рецепторів до ендотеліну 1, що інтерпретується як наслідок активних репаративних процесів у печінці тварин даної групи.

Відомо, що старіння чоловічого та жіночого організму проходить гетерохронно, механізми інволютивних змін, які певною мірою залежать від динаміки рівней гонадотропних гіпофізарних і статевих гормонів, мають специфічні відмінності. Привносячи в організм в періоді пізнього онтогенезу з КФП комплекс гормонів та їх релізінг-факторів, ми вважали за доцільне провести порівняння ефектів плацентарної терапії даного класу у реципієнтів (експериментальних тварин) різної статі.

У міокарді старих самиць, порівняно з молодими, виявлено морфологічні особливості з боку всіх основних структурних компонентів. У стромальному компоненті визначені ознаки розвитку склеротичних змін в інтерстиції і периваскулярних просторах. У м'язовому компоненті визначені ознаки зниження інтенсивності метаболічних процесів нуклеїнових кислот в

кардіоміоцитах, а також посилення апоптозу клітинних елементів міокарда. З боку судинного компонента виявлено склероз судинних стінок, потовщення базальних мембран, підвищене накопичення в них колагену IV типу, зниження здатності ендотеліоцитів експресувати рецептори до ендотеліну-1.

Після імплантації КФП у міокарді старих самиць виявлялись морфологічні ознаки, які свідчили про суттєве поліпшення метаболічних процесів у кардіоміоцитах, зокрема про активізацію обміну нуклеопротейдів. Можливо з цим пов'язано зменшення інтенсивності апоптозу клітинних елементів міокарда. До сприятливих ознак слід віднести також зниження інтенсивності накопичення в базальних мембранах судин колагену IV типу і підвищення здатності ендотеліоцитів експресувати рецептори до ендотеліну-1. Виявлені позитивні зміни правомірно пояснити результатом системної модулюючої дії біологічно активних складових КФП.

У печінці старих самиць, порівняно з молодими, виявлені морфологічні особливості свідчили про розвиток склеротичних процесів, посилення внутрішньоклітинної альтерації на фоні помірно виражених компенсаторно-приспосувальних процесів у вигляді проліферації гепатоцитів з порушенням трабекулярної будови часточок. У гепатоцитах відзначено ознаки зниження інтенсивності метаболічних процесів нуклеїнових кислот, а також посилення апоптозу клітинних елементів печінки. З боку судинного компонента виявлено підвищене накопичення колагену IV типу, зниження здатності ендотеліоцитів експресувати рецептори до ендотеліну-1. Усі вищевказані зміни можна вважати ознаками інволютивно-дистрофічного старіння печінки.

Після імплантації КФП старим самицям виявлено суттєву динаміку показників гістохімічних реакцій на нуклеопротейди, що свідчило про високу функціональну активність генетичної детермінації метаболізму, анаболічних процесів при зниженні індексу апоптозу (з $12,4 \pm 1,5$ до $9,0 \pm 0,9$) зменшення явищ фіброзу та ліпоїдозу. Виявлено збільшення відносної частки судинного компонента за рахунок повнокрів'я мікроциркуляторного русла та ангіогенезу

de novo, що є характерною реакцією на введення плацентарних структур, які містять васкулопоетичні фактори. Крім того, знижена інтенсивність накопичення в базальних мембранах судин колагену IV типу і підвищена здатність ендотеліоцитів експресувати рецептори до ендотеліну-1 також свідчили про активну реструктуризацію системи кровообігу в печінці, що призводило до відновлення її будови і функції.

Проблему подовження репродуктивного віку обумовлює збільшення кількості пізніх шлюбів, що пов'язано з необхідністю самореалізації в суспільстві. Ми досліджували вплив КФП на генеративну функцію в експерименті.

Після імплантації КФП у старих щурів-самців починаючи з 7–10 доби спостерігалось підвищення статевої активності, відбувалися репаративні зміни в гонадах, що виявлялося в продукції повноцінних клонів різних стадій розвитку сперматогенного епітелію, ефективного сперматогенезу, активізації функції ендокриноцитів.

Найбільші зміни спостерігали в сперматогоніях типу А та клітинах Лейдіга, які полягали в нормалізації рівнів РНП та ДНП; у старих тварин підвищений апоптозний індекс вірогідно знижувався з $6,8 \pm 0,4$ до $5,0 \pm 0,2$, але не досягав рівня, характерного для молодих самців ($3,8 \pm 0,2$). Подібні тенденції спостерігали при дослідженні рівнів експресії колагену IV типу та рецепторів до ендотеліну 1. У сім'яниках цих тварин також спостерігалось зниження вмісту ШО, підвищення глутатіон-S-трансферази в порівнянні з групою старих інтактних щурів. Виявлені позитивні зміни детермінували підвищення тестостеронпродукуючої здатності гонад.

Рівень тестостерону після імплантації КФП зростав більш ніж у 2 рази за термін, більший понад 2 місяці, проте не досягав рівня, характерного для молодих самців. У результаті знижена репродуктивна здатність старих самців практично відновилась як кількісно, так і якісно: кількість вагітностей у молодих самиць від старих самців з імплантацією КФП збільшилась до 2-х

разів, зменшилася кількість резорбцій внутрішньоутробних плодів, збільшилася кількість життєздатних плодів (середня кількість плодів становила $9,9 \pm 2,1$). На підставі отриманих даних можна стверджувати, що імплантація КФП патогенетично обґрунтована для відповідної групи пацієнтів, оскільки КФП одночасно є геропротекторами і відновлюють генеративну функцію.

У цілому результати даної серії експериментів свідчать, що визначені зміни у старих самців відповідали ознакам фізіологічного повільного старіння. Імплантація КФП певною мірою призводила до поступового ремоделювання життєвоважливих органів і систем організму з відновленням рівня їх функціонування.

Становить певний інтерес дослідження характеру впливу КБПП на статеву систему і репродуктивну функцію самиць пізнього онтогенезу. При дослідженні статевого циклу тварин встановлено, що дослідні старі самиці знаходилися у фазі дієструсу.

В яєчниках спостерігали зменшення кількості фолікулів на всіх стадіях розвитку, переважно виявлялись атретичні фолікули. При гістохімічному забарвленні спостерігали зниження оптичної щільності РНП та підвищення ДНП в клітинах яєчника. Імуногістохімічне дослідження виявило специфічне світіння клітин мікропрепаратів яєчників цих тварин. Відмічено достовірне збільшення апоптозного індексу клітинних елементів яєчників. У базальних мембранах судин і епітелію в порівнянні з молодими тваринами виявлено більш яскраве світіння колагену IV типу. Тоді як інтенсивність світіння ендотеліоцитів, які експресують рецептори до ендотеліну-1, у порівнянні з групою молодих самиць була знижена, про що свідчив показник оптичної щільності світіння ендотеліну-1.

Стан матки у експериментальних тварин є біологічним тестом для визначення функціональної активності яєчників, оскільки гормони останнього впливають на ступінь проліферативних процесів у ній. При макроскопічному дослідженні роги матки у старих самиць були атрофічними, потоншеними, на

розрізі виявлено згладження складчатості слизової оболонки. При мікроскопічному дослідженні виявлена гіпоплазія, сплющення ендометрія і дифузний розвиток сполучної тканини, групові залози практично не зустрічались, поодинокі залози мали менший діаметр, ніж у молодих самиць, строма ендометрія, міометрій були достовірно стоншені. При цьому показники оптичної щільності ДНП та РНП достовірно відрізнялися відносно молодих самиць. В сукупності зміни такого роду кваліфікуються як дисфункціональний інволютивний стан, що прогресує.

При імплантації КФП старим самицям виявлено зменшення сенільних проявів і ознак. Спостерігалось відновлення масового коефіцієнту матки з $0,150 \pm 0,018$ до $0,220 \pm 0,019$, який практично дорівнював показнику молодих самиць – $0,234 \pm 0,032$ г на 100 г ваги. Макроскопічно тканина матки мала вигляд, характерний для молодих самиць, однак шари ендометрія були потовщені нерівномірно. Міометрій потовщувався з $40,5 \pm 5,7$ до $52,5 \pm 5,4$ мкм, ендометрій – з $149,2 \pm 12,2$ до $230,5 \pm 23,4$ мкм, збільшувалася кількість залоз, з'являлися групи залоз в ендометрії. При проведенні гістохімічного дослідження оптична щільність при реакції на ДНП знижувалась з $0,172 \pm 0,01$ до $0,152 \pm 0,005$ УО, а реакція на РНП зростала з $0,139 \pm 0,002$ до $0,151 \pm 0,01$ УО.

При гістологічному дослідженні яєчників старих самиць з імплантацією КФП спостерігалось збільшення кількості зрілих фолікулів з $2,3 \pm 0,3$ до $5,1 \pm 0,5$ та жовтих тіл з $4,2 \pm 1,3$ до $7,5 \pm 0,6$, кількість яких однак не досягала показника у молодих самиць, оскільки кількість примордіальних та первинних фолікулів у 18-місячних самиць є вичерпною. При цьому загальна кількість генеративних елементів залишалась незмінною в усіх групах.

Апоптозний індекс та вміст колагену IV типу після імплантації КФП знижувалися, експресія рецепторів до ендотеліну-1 підвищувалася. При проведенні гістохімічного дослідження продемонстровано зміну рівней оптичної щільності як ДНП, так і РНП, значення яких наближалось до таких у молодих самиць, що свідчило про активність процесів ремоделювання тканин

репродуктивної системи. Проте в даній групі спостережень, так само як й у хибнооперованих, вагітність не відбулася у жодної самиці. Отримані дані інтерпретуються як процес купірування інволютивних змін без відновлення репродуктивної функції.

Аналіз отриманих даних переконує, що імплантація КФП у пізньому онтогенезі впливає на інволютивні процеси в репродуктивній системі по-різному та залежить від статевої приналежності. Так, у щурів-самців відновлюється і статеві, і генеративні функції, у самиць генеративна функція не відновлюється, проте сенільні прояви в органах репродукції підлягають зворотньому розвитку, наближаючись до рівня, характерного для молодих тварин.

Результати дослідження доводять факт ревіталізуючого впливу КФП на організм у період пізнього онтогенезу, що дозволяє сформулювати концептуальну гіпотезу механізму позитивної дії КБПП на організм у похилому віці. Встановлено, що він реалізується через відновлення структурних компонентів і обміну нуклеопротейдів (ДНП і РНП), активацію знижених репаративних процесів, білок-синтезуючої функції, регулювання судинного компонента мікроциркуляції, реструктуризації типів колагену, уповільнення апоптозу, купірування прооксидантних та ініціацію захисних антиоксидантних механізмів. В цілому це патогенетично обґрунтовує доцільність і ефективність включення до лікувально-профілактичних програм імплантації КФП в геронтології та геріатрії.

Отримані результати в якості нових медичних технологій можуть бути реалізовані в клінічній практиці при наявності відповідних низькотемпературних банків кріоконсервованих біоб'єктів. Кріобанки КБПП мають важливе загальнодержавне значення для збереження здоров'я нації, дозволяють мати певний запас аутологічних чи алогенних БПП для терапії широкого спектра хвороб від народження до похилого віку.

Ефективне функціонування такого банку обумовлюють сучасні наукові принципи його організації, координація і узгодження структур і підрозділів, які забезпечують інформаційне, організаційне та інженерно-технічне супроводження всіх етапів роботи.

Проблема створення НТБ має першочергове значення при обговоренні світовою науковою спільнотою на фахових форумах. Даний напрямок визначено пріоритетним на рівні міжнародних об'єднань. Функціонують кріобанки, що спеціалізуються на роботі з традиційними біологічними об'єктами – компонентами крові та кісткового мозку, тканин ока, репродуктивного матеріалу – сперматозоїдів, яйцеклітин, ембріонів; абіотичних матеріалів опорно-рухової системи, коронарних клапанів, судинних алографтів [55, 128, 131, 153, 170, 179, 199, 238, 243, 312]. Активно розвиваються НТБ колекцій клітинних ліній, мікроорганізмів, генетичного матеріалу рослин, риб, тварин, птахів домашніх, диких, рідких чи зникаючих видів та інше [5, 44, 166, 241, 253, 269]. Ці НТБ мають певні вимоги і умови діяльності.

НТБ БПП є структурами, що з'являються лише в теперішній час. Проведений науковий аналіз історії розвитку тканинних банків, сучасного стану проблеми, варіантів її вирішення з урахуванням особливостей медико-біологічних технологій з використанням БПП дозволив визначити принципи організації і функціонування НТБ КБПП.

Умовою виникнення кріобанків, становлення принципів і системи їх функціонування стали результати кріобіологічних досліджень.

Визначення основних механізмів кріоушкодження біологічних структур і принципів їх кріозахисту дозволило кріоконсервувати біоб'єкти, що потенційно можуть зберігатися тривалий час, а після деконсервування зберігають свої або модифіковані характеристики. Таким чином, основним принципом діяльності кріобанків є наукові дослідження щодо розробки і реалізації програм кріоконсервування та довгострокового зберігання біоб'єктів

із максимальним рівнем їх вітальності після деконсервування. Це положення, на нашу думку, екстраполюється на НТБ КБПП.

Морфологічна гетерогенність і фізіологічна поліфункціональність КБПП значно розширюють можливість клітинно-тканинної терапії. Аналіз стану проблеми та власні дослідження доводять ефективність і різноплановість клінічного застосування БПП при анеміях, цукровому діабеті, панкреатиті, перитоніті, у прегравідарній підготовці жінок, які страждають на антифосфоліпідний синдром, у репродуктивних технологіях, при невиношуванні вагітності, материнсько-плодовій інфекції, атеросклерозі та інш. Враховуючи вищенаведене, ми вважаємо, що концепція регенеративної терапії відповідає меті діяльності НТБ КБПП і може бути взята за основу одного з принципів прогнозування перспективності такого кріобанку.

Досвід роботи нашого банку співпадає зі світовим і передбачає створення запасів КБПП для використання не тільки в алогенній системі, але й аутологічного застосування.

Сучасний формат діяльності НТБ передбачає збереження генетичних запасів планети, її багатой флори і фауни. В цій глобальній задачі принциповим є створення запасів генетичного матеріалу *Homo sapiens*. Безперечно, що біологічні структури плаценти людини є найбільш відповідним та придатним джерелом для створення колекцій генетичного різноманіття людства. Відносно використання генетичного матеріалу людини в майбутньому КБПП є найбільш реальним і перспективним матеріалом. Стверджувати це дозволяє наявність у плаценті клітин-попередників практично всіх органів і систем людини, які несуть в собі генетично детерміновану програму розвитку відповідної анатомічної структури і есенціальних сполук – ініціаторів структуроутворення, регуляторів розвитку і функціонування клітин, органів та систем людини. Тому при створенні НТБ КБПП важливо передбачити формування відповідних колекцій плацентарного матеріалу довгострокового зберігання як складової генетичних запасів біосфери.

Потенціал біобанків, в яких зберігається генетичний матеріал людини, в першу чергу плацентарний, розглядається як ключовий інструмент для забезпечення персоніфікованої медицини. Розкодування персонального геному пацієнта (з використанням плацентарного матеріалу), визначення його генетичного прогнозу, дозволяє сучасній медицині рухатися від суто реактивного підходу, коли лікувально-профілактичні заходи є відповіддю на хворобу, до двовекторної системи підтримки здоров'я. В якості нового напрямку розглядається персоніфікована біомедицина.

Водночас визначено, що серед біоматеріалів НТБ плацентарні структури починають займати все більш вагому частку. Шляхом кріобіологічних методів, нанотехнологій, клітинної, тканинної, генної інженерії здійснюється масштабування клітинних культур, сепарація, програмування і репрограмування клітин, створюються діагностикуми, вакцини, біопрепарати.

Сучасний стан розвитку тканинних банків у світі вимагає формувати концепцію роботи НТБ КБПП, яка б передбачала поряд з інноваційними проектами формування сертифікованих колекцій клітин, тканин, органних культур, медичних препаратів і біосубстанцій плаценти ауто-, ало- та ксеногенного походження в якості експериментального матеріалу, а також запасів для біології, медицини, біофізики, аграрної науки та інше.

Позитивний світовий досвід пропонує гармонізацію діяльності НТБ у системі транснаціональних фахових асоціацій. Вважаємо, що аналіз діяльності світових асоціацій тканинних банків може стати в нагоді для організації і функціонування вітчизняних НТБ КБПП, їх об'єднання з метою успішної реалізації наукового потенціалу в практичній медицині. Кріобанкам України, як Європейської держави, відповідно і НТБ КБПП, належить керуватися положеннями Європейської Асоціації тканинних банків. В ЕАТБ розроблено критерії, які включають усі аспекти її діяльності. Ці стандарти базуються на положеннях Міжнародної організації стандартизації (ISO) і застосовуються спільно з принципами належної виробничої практики (GMP), що забезпечують

інформаційну і технічну оптимізацію всіх структур і етапів роботи банку відповідно до сучасних вимог.

У першу чергу це стосується адаптації загальних положень ЕАТВ до конкретних технологічних протоколів отримання КБПП і технічних регламентів, що визначають реалізацію процесінгу на сучасному лабораторному, кріогенному, контрольно-вимірювальному обладнанні, застосуванні сертифікованих і біобезпечних середовищ, субстанцій, реактивів. тощо. Значна увага приділяється фаховій кваліфікації персоналу і науковій компетенції співробітника – дослідника.

Питання біоетики в діяльності НТБ КБПП є принципово суттєвим. Необхідною умовою роботи з тканинами і клітинами людини є наукова обґрунтованість, коректність виконання, чітке додержання затверджених стандартів діяльності, добровільна участь пацієнтів у дослідженнях, належна кваліфікація персоналу НТБ, конфіденційність, що базуються на позиціях моралі і додержанні прав людини. Основним документом, що забезпечує урегулювання етичних питань досліджень за участю людини, стандартом для діяльності НТБ у цьому напрямку є Хельсинська декларація прав людини (2000р) з додатковими фаховими протоколами. Ці документи є імперативними міжнародними гарантантами здоров'я, прав і гідності учасників банкінгу біоматеріалів. Сфера дії цих документів, на нашу думку, безперечно повинна поширюватися на діяльність НТБ БПП.

Результати даного дослідження свідчать, що науково-інформаційне співробітництво з провідними медико-біологічними науковими закладами, асоціаціями України та світу детермінує ефективність розвитку кріобіологічних досліджень, біотехнології створення КБПП, їх банкінгу, експериментального випробування і клінічного використання.

Таким чином, проведений аналіз виникнення і розвитку банків біологічних об'єктів, систематизація та узагальнення даних сучасного стану проблеми біобанків в Україні, Європі, світі, а також власні дослідження і досвід

Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України дозволили сформулювати представлені науково-організаційні принципи діяльності НТБ БПП.

Подальший прогрес у цій галузі може бути досягнуто шляхом розширення мережі НТБ БПП на основі визначених принципів їх організації та діяльності з залученням сучасних інноваційних програм. Безсумнівно, це відповідає нагальним національним задачам щодо збереження і охорони здоров'я людини, а також пріоритету вітчизняної науки.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі запропоновано вирішення проблеми кріоконсервування плаценти 36–38 тижнів гестації у вигляді біооб'єктів різного ступеня дезінтеграції, визначено процеси, які відбуваються в них під дією низьких температур, здійснено верифікацію впливу КБПП на клітини, тканини та організм реципієнтів пізнього онтогенезу. Отримані результати дозволили створити НТБ КБПП, обґрунтувати патогенетично та з точки зору клінічної ефективності і біобезпеки застосування КФП в геронтологічній практиці з метою подовження активного довголіття, покращення репродуктивних прогнозів і оптимізації демографічної ситуації на державному рівні.

1. Встановлено пренатальні прогностичні критерії морфофункціональної відповідності вихідного стану плацент для створення КБПП: рівень ПЛ в сироватці крові вагітної – 10470 ± 870 МОд/мл; ХГЛ – 23720 ± 1230 МОд/мл, відсутність ознак дисфункції чи інфекції плаценти під час вагітності, пологи шляхом операції кесаріва розтину в терміні вагітності 36–38 тижнів. Відбір плацент відповідно до цих критеріїв обумовлює їх придатність для подальших кріобіологічних досліджень на етапах біотехнологічних процесів.
2. Кріоекстракція БАР плаценти шляхом проведення 3-х циклів її заморожування-відтаювання з використанням ультранизьких температур (-80°C , -196°C) дозволяє отримувати есенціальні сполуки плаценти в максимально високих концентраціях при збереженості їх властивостей і фізіологічних співвідношень.
3. Суспензія клітин плаценти, отримана комплексним ферментативним методом, містить ядерні клітини ($10^6/\text{мл}$), які здатні до адгезії при культивуванні з наступним формуванням синцитіоподібних структур та моношару. За даними цитофлюориметричного аналізу в СКП визначено 2,6% CD34⁺ та 0,4% CD45⁺ клітин, 1,85% життєздатних CD34⁺ та до 95% інших

життєздатних клітин, що секретують ХГЛ та АФП.

4. Кріоконсервування СКП за двохетапною програмою заморожування під захистом 10% розчину ДМСО дозволяє зберегти життєздатність до 91% клітин, що демонструють фенотип еквівалентний нативним клітинам. Виявлено кріостійкість СКП (при її гетерогенності) на етапах розробленої програми.
5. Створено методологічний підхід до отримання фрагментів плаценти з високим потенціалом проліферації, збереженості структури і функціональної активності, який полягає в вилученні поверхневих локусів плаценти, які містять синцитіальні вузли, мезенхімальні, кінцеві ворсини, вкриті синцитіоцитотрофобластом, при їх короткочасному гіпотермічному зберіганні в живильному середовищі.
6. Кріоконсервування фрагментів плаценти 36-38 тижнів гестації під захистом 5% розчину ДМСО дозволяє зберегти клітинний склад. Для одночасного ефективного збереження міжклітинних взаємодій і структури тканини фрагментів плаценти необхідно багатокомпонентне середовище, що містить додатково 5% гідроксиетилкрохмалю, та застосування трьохетапної програми заморожування з ініціацією кристалоутворення.
7. Кріоконсервовані фрагменти, кріоекстракт і суспензія клітин плаценти не чинять ушкоджуючої, токсичної або негативно модифікуючої дії на морфологію клітинного моношару *ВНК-21 clone 13/04*, а також на процес ділення клітин. В присутності КФП і ККП відбуваються стимуляція розмноження клітин і адаптація клітинної популяції.
8. Початок і максимальний вплив КЕП на організм реалізується в першу добу після його введення з підвищенням вмісту АФП і ХГЛ в 6–10 разів і наступним різким їх зниженням. Безпосередня дія КЕП є короткотривалою та обмежується одним тижнем, що в цілому є негативним для нестабільного гомеостазу організму в похилому віці. Введення клітинно-тканинних структур плаценти (КФП і ККП) призводить до більш плавної динаміки

вмісту плацентарних сполук в організмі реципієнта, тривалість їх дії більше ніж КЕП в 4–9 разів, що в цілому відповідає вимогам до фармакодинаміки геріатричних лікувально-профілактичних засобів.

9. Виявлено, що КБПП різного ступеня дезінтеграції демонструють різноспрямовану біологічну дію на біосистеми при атестації їх на біобезпеку. Встановлено відсутність ушкоджуючої дії КБПП на організм при тестуванні на аномальну токсичність з поглибленим дослідженням структури життєвоважливих органів. Дослідження дії КБПП на внутрішньоутробний розвиток довели, що введення КЕП під час гестації збільшує ембріолетальність, ініціює спорадичні крововиливи і набряки. Введення ККП і, більшою мірою, КФП сприяє підвищенню фертилізації, позитивно впливає на трофіку і розвиток організму, не чинить ушкоджуючої дії, що доводить біобезпечність і обґрунтовує вибір КФП щодо призначення в похилому віці.
10. Механізм позитивного впливу КФП на організм пізнього онтогену реалізується через відновлення рівня генетичної детермінації метаболізму (відтворення складу ДНП), регуляції апоптозу, ініціації потенціалу білоксинтезуючої функції (РНП), активізацію репаративних процесів, мікроциркуляції і васкулогенезу, купірування прооксидантних і ініціацію антиоксидантних механізмів.
11. Інволютивні процеси в репродуктивній системі коригуються в залежності від статеві належності. У особин чоловічої статі під впливом введення КФП відновлюється статеві і генеративна функції, у жіночих – генеративна функція не відновлюється, проте сенільні прояви в органах репродукції підлягають зворотньому розвитку з циклічними змінами в яєчниках і матці.
12. Науково-організаційними принципами створення і функціонування НТБ КБПП є пріоритетність фундаментальних досліджень в галузі кріобіології і кріомедицини, орієнтування на збереженість вітальності КБПП, формування колекцій клітин, тканин і біосубстанцій плаценти ауто-, ало- і ксеногенного походження при науково-інформаційному співробітництві з провідними

фаховими закладами і гармонізації стандартів діяльності в системі асоціацій НТБ.

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

Для створення КБПП з високим рівнем морфофункціональних характеристик, рекомендується використовувати плаценти від породіль, у яких перед пологамі рівень ПЛ у сироватці крові становив – 10470 ± 870 МОд/мл; ХГЛ – 23720 ± 1230 МОд/мл, були відсутні ознаки дисфункції чи інфекції плаценти під час вагітності, пологи відбувалися шляхом операції кесаревого розтину в терміні вагітності 36–38 тижнів.

Для отримання КЕП з максимально високими концентраціями есенціальних сполук при збереженості їх властивостей і фізіологічних співвідношень вільного від клітинно-тканинного детриту рекомендується використовувати програму кріоекстракції, що складається з 3-х циклів заморожування-відтаювання тканини плаценти з застосуванням ультранизьких температур (-80°C , -196°C).

Для виділення СКП з вмістом ядерних клітин, серед яких 2,6 % CD34^{+} , 0,4% CD45^{+} , 1,85% життєздатних CD34^{+} та до 95% інших життєздатних клітин, здатних до адгезії та формування синцитіоподібних структур, моношару, секреції ХГЛ та АФП при культивуванні пропонується комплексний ферментативний метод з використанням 0,125% трипсину, 0,2 мг/мл ДНКазу в 5-ти циклах ферментації.

Кріоконсервування СКП під захистом 10%-го ДМСО та двохетапної програми охолодження (повільно – зі швидкістю 1 град/хв до -70°C , потім швидко занурення у рідкий азот) забезпечує збереженість 91% клітин з фенотипом, що є еквівалентним нативним клітинам плаценти.

Для отримання КФП 36–38 тижнів гестації з високим ступенем збереженості клітин, міжклітинних взаємодій і структури тканини плаценти рекомендується використання кріоконсерванта, що містить 5% ДМСО і 5% ГЕК та трьохетапна програма кріоконсервування з ініціацією кристалоутворення

(повільне охолодження до температури кристалізації, стабілізація температури та швидке охолодження до температури рідкого азоту). При цьому необхідною умовою є попереднє визначення зон переохолодження, які є максимально небезпечними для біоматеріалу в плані кріодеструкції, це дозволяє своєчасно модифікувати кристалоутворення шляхом його ініціювання при визначеній температурі початку кристалізації.

Серед КБПП різного ступеня дезінтеграції (КЕП, ККП, КФП) у програмі корекції геріатричних проявів оптимальним є використання КФП 36–38 тижнів гестації. Обґрунтуванням цього вибору є доведені структурна збереженість, висока функціональна активність КФП, повільна динаміка їх біологічного впливу при відсутності негативної дії на біосистеми організму.

Включення в лікувально-профілактичні програми імплантації КФП у геронтології і геріатрії рекомендується для корекції сенільно-інволютивних змін з метою відновлення структурних компонентів і обміну нуклеопротейдів (ДНП і РНП), активації знижених, репаративних процесів, білок-синтезуючої функції, регулювання судинного компонента мікроциркуляції, реструктуризації типів колагену, уповільнення апоптозу, купірування прооксидантних механізмів, ініціації захисних антиоксидантних механізмів.

Для впровадження розроблених медико-біологічних технологій одержання і застосування КБПП необхідне створення НТБ БПП. Рекомендуються визначені принципи їх організації: пріоритетність наукових досліджень у галузі кріобіології і кріомедицини, формування колекцій КБПП ауто-, ало- і ксеногенного походження при науково-інформаційному співробітництві з провідними фаховими закладами і гармонізації стандартів діяльності в системі асоціацій НТБ.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. Актуальные проблемы криобиологии и криомедицины / Под. ред. акад. НАН Украины А.Н. Гольцева. – Харьков: „Райдер”. – 2012. – 768 с.
2. Амстіславській С.Я. Кріобанк ембріонів ссавців: вибір методів і пріоритетів / С.Я. Амстіславській, І.С. Трукшін // Онтогенез. – 2010. – Т. 41, № 1, – С. 19–31.
3. Анисимов В.Н. Молекулярные и физиологические механизмы старения. / СПб.: Наука, 2003– 468 с.
4. Бабийчук Л.А. Оценка состояния различных популяций ядродержащих клеток кордовой и донорской крови в зависимости от метода их консервирования / Л.А. Бабийчук, О.А. Михайлова, П.М. Зубов, В.В. Рязанцев // Пробл. криобиологии. – 2011. – Т. 21, № 4. – С. 385–394.
5. Багіров В.М. Біотехнологічні методи збереження та раціонального використання генофонду рідкісних та зникаючих видів / В.М. Багіров, Ш.Н. Насиба, С.А. Лесин // Біофізика живої клітини. – 2008.– Т. 9. – С. 21–25.
6. Белоус А.М. Криобиология / А.М. Белоус, В.И. Грищенко. – Киев: Наук. думка, 1994 – 430 с.
7. Белоус А.М. Криоконсерванты / А.М. Белоус, М.И. Шраго, Н.С. Пушкарь. – Киев: Наук. думка, 1979. – 200 с.
8. Берстон М. Гистохимия ферментов / М. Берстон. Пер. с англ. – М.: Мир, 1965. – 349 с.
9. Биология старения: Руководство по физиологии / Под ред. В.В. Фролькиса. – Л.: Наука, 1982. – 616 с.
10. Боброва Е.М. Влияние криопротекторов и низких температур на термодинамические параметры и структурное состояние компонентов кордовой крови и плаценты человека: автореф. дис. на соиск. науч. ст.

- канд. биол. наук: спец. 03.00.19 «Криобиология» / Е.М. Боброва. – Харьков, 2007. – 20 с.
11. Бондаренко Т.П. Трансплантация криоконсервированного эндокринного материала как метод коррекции различных патологий у экспериментальных животных / Т.П. Бондаренко, Н.М. Алабедадькарим, Г.А. Божок [и др.] // Пробл. криобиологии. – 2005. – Т. 15, № 3. – С. 393-397.
 12. Бочков Н.П. Роль молекулярно-генетической диагностики в прогнозировании и профилактике возрастной патологии / Н.П. Бочков, Ц.В. Соловьева, Д.Л. Стрекалов, В.Х. Хавинсон // Клин. мед. – 2002. – № 2. – С. 4-8.
 13. Бутенко Г.М. Вікові, статеві та генетичні особливості впливу імунотропних препаратів в експерименті // Г.М. Бутенко, А.Є. Родніченко, Л.Ф. Андріанова, І.М. Пішель, А.М. Устименко, В. Даниленко / Вісник фармакології та фармації. – 2008. – № 2. – С.40-44.
 14. Ванюшин Б.Ф. Молекулярно-генетические механизмы старения / Б.Ф. Ванюшин, Г.Д.Бердышев – М.:Медцина, 1997. – 300 с.
 15. Волова Л.Т. Этические проблемы и значение доклинических испытаний в биоимплантологии // Клинические и фундаментальные аспекты клеточных и тканевых биотехнологий: материалы II Всероссийского симпозиума с международным участием: – Самара:ООО „Офорт”, 2004. – С. 17–21.
 16. Граменецкий Е.М. Прижизненная окраска клеток и тканей. / Е.М. Граменецкий – Л: Медгиз, 1963.– 154 с.
 17. Доклінічні дослідження лікарських засобів / За ред. член-кор. АМН України О.В. Стефанова. – К.: Видавничий дім „Авіцена”. – 2001. – 528 с.
 18. Дыбан А.П. Очерки патологической эмбриологии человека. / А.П.Дыбан – Л: Медгиз, 1956. – 228 с.
 19. Глянц Е.В. Медико-биологическая статистика / Е.В. Глянц. Пер. с англ. – М.: Практика, 1998. – 459 с.

20. Гольцев А.Н. Возможности использования продуктов эмбриофетоплацентарного комплекса как корректора апоптотических процессов при аутоиммунных заболеваниях / А.Н. Гольцев, В.И. Грищенко, И.В. Рассоха, Л.В. Останкова // Пробл. криобиологии. – 2003. – № 1. – С. 41-48.
21. Гольцев А.Н. Криоэкстракция как метод получения биологически активных молекулярных субстанций тканевого происхождения / А.Н. Гольцев, А.И. Осецкий, М.О. Кравченко // Імунологія та алергологія, – 2009. № 2-3. – С. 149.
22. Гордиенко Е.А. Физические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий / Е.А. Гордиенко, Н.С. Пушкаръ. – Киев: Наук. думка, 1994. – 142 с.
23. Гордієнко О.І. Механізми проникності клітинних мембран для води і кріопротекторів / О.І. Гордієнко, О.В. Давидова, О.В. Сакун // Пробл. криобиологии. – 2008. – Т. 18, № 2. – С. 170-175.
24. Григорьев М.Ю. Апоптоз в норме и патологии / Григорьев М.Ю, Имятинов Е.Н, Хансон К.П. // Мед. акад.журн. – 2003. – Т. 3. – С. 3-11.
25. Гринь В.К. 10-летний опыт клинического применения биотехнологий / В.К. Гринь, А.Г. Попандопуло, А.А. Штутин [и др.] // Вестник неотложной и восстановительной медицины. – 2012. – Т. 13, № 1. – С. 3–9.
26. Грищенко В.И. Использование криоконсервированной плацентарной ткани при нарушениях сперматогенеза у мужчин / В.И. Грищенко, А.Г. Геродес, Ю.В. Никитченко, Н.Г. Грищенко, Л.И. Луцкая, О.С. Прокопюк // Здоровье мужчины. – 2007. – № 2 (21). – С. 168–171.
27. Грищенко В.И. Клеточная терапия: фундаментальные и клинические аспекты / В.И. Грищенко, О.С. Прокопюк, Т.Н. Юрченко // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2005. – № 3. – С. 41–42.

28. Грищенко В.И. Роль криобиологии в создании биотехнологий клеточной и тканевой трансплантации / В.И. Грищенко // Пробл. криобиологии. – 2001. – № 3. – С. 7-8.
29. Грищенко В.И. Использование криоконсервированной плацентарной ткани в лечении невынашивания беременности / В.И. Грищенко, В.В. Лазуренко, О.С. Прокопюк, О.Н. Аралов // Пробл. криобиологии. – 2003. – № 1. – С. 6-80.
30. Грищенко В.И. Терапия криоконсервированной плацентарной тканью и медикаментами раннего и патологического климакса / В.И. Грищенко, О.С. Прокопюк, О.В. Прибылова, И.В. Строна // Международ. мед. журнал. – 2000. – Т. 6, № 1. – С. 54–57.
31. Грищенко В.И. Новые криобиологические технологии получения клеточных и тканевых фетоплацентарных трансплантатов и их использование в медицине / В.И. Грищенко, Т.Н. Юрченко, О.С. Прокопюк // Трансплантологія. – 2004. – Т. 7, № 3. – С. 123–129.
32. Грищенко В.И. Организационные формы работы Украинского банка биологических объектов / В.И. Грищенко, Т.Н. Юрченко, А.С. Снурников., О.С. Прокопюк, В.И. Строна // Експерим. і клін. медицина. – 2000. – № 4. – С. 124–126.
33. Грищенко В.І. Використання кріоконсервованої плаценти в лікувальній практиці / В.І. Грищенко, О.С. Прокопюк, В.І. Шепітько [та інш.] // Трансплантологія. – 2002. – Т. 3, № 2. – С. 32-37.
34. Грищенко М.Г. Патогенетичні основи вдосконалення допоміжних репродуктивних технологій у жінок, які перенесли запальні захворювання органів малого тазу: автореф. дис. на здоб. наук. ступ. докт. мед. наук: спец. 14.01.01 «Акушерство и гинекология» / М.Г. Грищенко. – Харків, 2011. – 36 с.
35. Гусев В.А. Современные концепции свободнорадикальной теории старения / В.А. Гусев, Л.Ф. Панченко // Нейрохимия. – 1997. – Т. 14. –

- С. 14–29.
36. Доклінічні дослідження лікарських засобів: Методичні рекомендації / Під ред. О.В. Стефанова. – К.: Авіцена, 2001. – 528 с.
 37. Дыбан А.П. Основные методические подходы к тестированию тератогенной активности химических веществ / А.П. Дыбан, В.С. Баранов, И.М. Акимова // Архив анатомии, гистологии, эмбриологии. – 1970. – Т. 59, № 10. – С. 89–100.
 38. Животная клетка в культуре (Методы и применение в биотехнологии) / Под ред. Л.П. Дьякова – М.:Компания „Спутник”,2000. – 400 с.
 39. Заготівля і кріоконсервування плацентарної тканини та її клінічне застосування: Методичні рекомендації / В.І. Грищенко, О.С. Прокопюк [та інш.]. – Харків, 1996. – 15 с.
 40. Замотаев И.П. Особенности гериатрической фармакотерапии / И.П. Замотаев // Советская медицина. – 1990. – № 2. – С. 19–23.
 41. Западнюк В.И. Гериатрическая фармакология / В.И. Западнюк. – Киев: Здоров'я, 1977. – 167 с.
 42. Зыбина Е.В. Цитология трофобласта. – Л.: Наука, 1986. – 192 с.
 43. Канунго М. Биохимия старения / М. Канунго. Пер. с англ. – М.: Медицина, 1982. – 296 с.
 44. Карнаухов В.Н. Консервація генетичних ресурсів на порозі зникнення / В.Н. Карнаухов // Біофізика живої клітини. – 2003. – Т. 7. – С. 9–12.
 45. Кветной И. М. Сигнальные молекулы – маркеры зрелости плаценты / Кветной И. М., Айламазян Э.К., Лапина Е.А. [и др.]. – М.: МЕДпресс-информ,– 2005, – 97 с.
 46. Клебанов Г.И. Оценка антиокислительной активности плазмы крови / Г.И. Клебанов, И.В. Бабенкова, Ю.О. Теселкин [и др.] // Лабораторное дело. – 1988. – № 5. – С. 59-62.
 47. Компанієць А.М. Дослідження морфофункціональної збереженості тромбоцитів на етапах кріоконсервування. / А.М. Компанієць, О.В. Книш,

- Т.М.Гуріна [та інш.] // Проблемы криобиологии. – 2006. – Т. 16, № 2. – С. 182–191.
48. Кондаков И.И. Влияние криоконсервированной плаценты на морфологию миокарда при экспериментальном атеросклерозе / И.И. Кондаков, Т.Н. Юрченко, Т.М. Шарлай // Пробл. криобиологии. – 2011. – Т. 21, № 4. – С. 45–56.
 49. Коржевский Д.Э. Основы гистологической техники / Д.Э. Коржевский, А.В. Гиляров – М: "СпецЛит", – 2010, – 94 с.
 50. Коркушко О.В. Лечение взвесью плаценты в профилактике преждевременного старения человека / О.В. Коркушко, Е.Г. Калиновская, С.В. Литовченко, Н.В. Кочубей // Тканевая терапия по Филатову. – Одесса: ОГМУ, 1977. – С. 127–129.
 51. Коркушко О.В. Пептидные препараты тимуса и эпифиза в профилактике ускоренного старения / О.В. Коркушко, В.Х. Хавинсон, Г.М. Бутенко, В.Б. Шатило. – СПб.: Наука, 2002. – 202 с.
 52. Криопротекторы / Под ред. Н.С. Пушкаря, М.И. Шраго, А.М. Белоуса [и др.]. – Киев: Наук. думка, 1978. – 201 с.
 53. Кріоконсервування та зберігання кріоконсервованої суспензії плаценти для клінічного використання: Методичні рекомендації / В.І. Грищенко, Т.Ф. Морозова, О.М. Воротілін [та інш.]. – Харків: НАН України ІПКіК; МОЗ України, Харк. Ін-т. удоск. лікарів. Харків, 1997. – 16 с.
 54. Кузник Б.И. Цитомедины. 25-летний опыт экспериментальных и клинических исследований / Б.И. Кузник, В.Г. Морозов, В.Х. Хавинсон. – СПб.: Наука, 1998. – 310 с.
 55. Ланкин В.З. Ингибирование перекисления липидов и детоксикация липоперекисей защитными ферментными системами (супероксид-дисмутаза, глутатион-пероксидаза и глутатион-редуктаза) при экспериментальном злокачественном росте / В.З. Ланкин, С.М. Гуревич // Докл. АН СССР. – 1976. – Т. 226, № 3. – С. 705–708.

56. Легач Е.И. Гормонопродукция щитовидной железы и надпочечников при их совместном культивировании / Е.И. Легач, В.В. Сирота // Матеріали науково–практичної конференції «Сучасні напрямки розвитку ендокринології» (Треті Данилевські читання), 26–27 лютого 2004 р. – Харків, 2004 – С. 107–108.
57. Лилли Р. Патологическая техника и практическая гистохимия / Р. Лилли. Пер. с англ. – М.: Мир, 1969. – 645 с.
58. Лупа Х. Основы гистохимии / Х. Лупа. Пер. с нем. – М.: Мир, 1980. – 343 с.
59. Луценко Н.С. Применение криоконсервированной плацентарной ткани при изоиммунизации беременных женщин / Н.С. Луценко, О.С. Прокопюк, И.А. Бондаренко [и др.] // Пробл. криобиологии. – 2008. – Т. 8, № 3. – С. 316–318.
60. Лэмб М. Биология старения. / М. Лэмб. Пер. с англ. – М.: Мир, 1980. – 206 с.
61. Медик В.А. Заболеваемость населения: история, современное состояние и методология изучения / В.А. Медик. – М.: Медицина, 2003. – 512 с.
62. Меркулов Г.А. Курс патологогистологической техники / Г.А. Меркулов. – Л.: Медгиз, 1961. – 340 с.
63. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма: Методические рекомендации / А.В. Арутюнян, Е.Е. Дубинина, Н.Н. Зыбина. – СПб.: ИКФ «Фолиант», 2000. – 104 с.
64. Милованов А.П. Патология системы мать–плацента–плод / А.П. Милованов. – М.: Медицина, 1999. – 448 с.
65. Митропольский А.К. Техника статистических вычислений / А.К. Митропольский. – М.: Физматиздат, 1971. – 576 с.
66. Мулдашев Э.Р. Служба заготовки донорских тканей в России и за рубежом. Технологии консервации и стерилизации трансплантатов / Э.Р. Мулдашев, Р.Т. Нигматулин, О.Р. Шангина [и др.] // Социальные и

- медико-биологические аспекты трансплантации тканей. – Уфа: ООО «Компания Эволюция», 2007. – 236 с.
67. Мурызина И.Ю. Гормонально-цитокиновый профиль при нарушении процесса дородовой перестройки и пути его коррекции: автореф. дис. на соиск. науч. ст. канд. мед. наук: спец. 14.01.01 «Акушерство и гинекология» / И.Ю. Мурызина. – Харьков, 2004. – 20 с.
 68. Насадюк К.М. Стан і перспективи кріозбереження та клінічного застосування пуповинної крові в Україні / К.М. Насадюк // Клітинна трансплантологія і тканинна інженерія. – 2011. – Т. VI, № 1. – С. 98–103.
 69. Нигматулин Р.Т. История трансплантации тканей / Р.Т. Нигматулин // Очерки трансплантации тканей. – Уфа: ООО «Компания Эволюция», 2003. – 156 с.
 70. Николенко А.В. Криопротекторные свойства полиолов и их производных при замораживании тромбоцитов / А.В. Николенко, А.М. Компаниец, В.И. Луговой // Пробл. криобиологии. – 1995. – № 4. – С. 36–40.
 71. Новик А.А. Клеточная терапия / Новик А.А., Иванов Р.А. Клеточная терапия / Под. ред. Ю.Л. Шевченко. – М.: ООО «МИА», – 2008. – 240 с.
 72. Новиков А.Н. Механизм роста кристаллов льда в сложных биологических системах / А.Н. Новиков, Л.Г. Кулешова, Т.П. Линник // Биофизика. – 1991. – Т. 36, № 1. – С. 122–127.
 73. Обладнання низькотемпературного банку біологічних об'єктів та умови довгострокового зберігання біологічних об'єктів у низькотемпературному банку: Методичні рекомендації / В.І. Грищенко, І.П. Висеканцев, О.С. Прокопюк [та інш.]. – Харків: НАН України ІПКіК, – 2004. – 14 с.
 74. Обухова Л.К. Роль свободнорадикальных реакций окисления в молекулярных механизмах старения живых организмов / Л.К. Обухова, Н.М. Эмануэль // Успехи химии. – 1983. – Т. 52. – С. 353–372.

75. Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты /
Е.Б. Меньшикова, В.З. Ланкин, Н.К. Зенков, И.А. [и др.]. – М.: Фирма «Слово», 2006. – 556 с.
76. Осецкий А.И. О механизме защиты криоконсервируемых биообъектов с помощью многокомпонентных криопротекторных растворов /
А.И. Осецкий, Т.М. Гурина, А.П. Кирилюк, Н.В. Репин // Пробл. криобиологии. – 2008. – Т. 18, № 32. – С. 231.
77. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. Электрофорез и ультрацентрифугирование / Л.А. Остерман. – М.: Наука, 1981. – 536 с.
78. Пат. № 8457 Україна, Контейнер для замороживания биологических объектов. Новиков А.Н., Олейник С.Т., Шраго М.И. заявитель Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, заявл. 28.11.86. Опубл. БИ № 22.88
79. Пат. №39614А Україна, МПК А 61К35/50. Спосіб корекції функціонального стану міокарда у лабораторних тварин пізнього онтогенезу / В.І. Грищенко, О.С. Прокопюк, В.В. Чижевський, В.Ю. Прокопюк; заявник та патентовласник Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України. – № 20000116284; заявл. 07.11.00; опубл. 15.06.01. Бюл. № 5.
80. Пат. №46493 Україна, МПК7 А 61К35/50, А 61Р15/08. Спосіб корекції порушень сперматогенезу у чоловіків / В.І. Грищенко, Г.Г. Геродес, О.К. Аліпова, О.С. Прокопюк; заявник та патентовласник Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України. – №2001075342; заявл. 25.10.01; опубл. 15.10.04. Бюл. № 10.
81. Пат. №67588А Україна, МПК7 А 01N1/02. Спосіб консервування хоріальної тканини / В.І. Грищенко, О.С. Прокопюк, В.Ю. Прокопюк, В.В. Чижевський, І.Б. Мусатова; заявник та патентовласник Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України. – № 2003109777; заявл. 31.10.03; опубл. 15.06.04. Бюл. № 6.

82. Пат. №70686 Україна, МПК7 А61К35/50. Спосіб лікування урогенітальних розладів в клімактеричному періоді / В.І. Грищенко, О.С. Прокопюк, О.А. Перчик, В.І. Страна; заявник і патентовласник Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України. – № 20031212133; заявл. 23.12.03; опубл. 15.10.04. Бюл. № 10.
83. Пат. №72117 Україна, МПК А 61В17/00, А61Р15/00. Спосіб корекції вікових порушень репродуктивної функції / В.Ю. Прокопюк, О.С. Прокопюк, В.Г. Карпенко, Н.М. Пасієшвілі, О.В. Фалько; заявник і патентовласник Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України. – № 201200310; заявл. 10.01.12; опубл. 10.08.12, Бюл. № 15.
84. Пат. №79009 Україна, МПК А 01N1/02 Спосіб кріоконсервування тканини плаценти / В.Ю. Прокопюк, О.С. Прокопюк, В.В. Чижевський; заявник і патентовласник Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України. – № 201210931; заявл. 19.09.12; опубл. 10.04.13. Бюл. № 7.
85. Пат. №7937 Україна, МПК7 А 61К 35/16 А 61В17/00. Спосіб лікування цукрового діабету, ускладненого діабетичною мікроангіопатією / Я.О. Попович, А.Г. Шевчук, О.С. Прокопюк, О.В. Ліпіна, І.Б. Мусатова, В.Ю. Прокопюк; заявник та патентовласник Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України. – № 2001075342; заявл. 20.12.04.; опубл. 15.07.05., Бюл. № 7.
86. Пат. № 30808А Україна, МПК А01N1/02. Спосіб консервування тканин фетоплацентарного комплексу / В.І. Грищенко, Т.М. Юрченко, О.С. Прокопюк, В.І. Страна, В.П. Козлова, В.Ю. Прокопюк; Заявл. 05.06.98; Опубл. 15.12.2000. – Бюл. № 7-II.
87. Пат. № 46489 Україна G01N 33/00. Спосіб кількісного визначення вмісту антигену в біологічних тканинах / Г.І. Губіна-Вакулик, І.В. Сорокіна, В.Д. Марковська, Л.С. Купріянова, Р.В.Сидоренко; Заявл. 26.06.2009; Опубл. 25.12.2009. – Бюл. № 24.

88. Перчик О.А. Сохранность экстракта плаценты на этапах низкотемпературного хранения и его эффективность при урогенитальных расстройствах у женщин в климактерии: автореф. дис. на соиск. научн. ст. канд. мед. наук: спец. 14.01.03 «Криомедицина» / О.А. Перчик. –□ Харьков, 2007. – 20 с.
89. Пирс Э. Гистохимия / Э. Пирс. Пер. с англ. – М.: Изд-во иностр. лит., 1962. – 771 с.
90. Пітько В.А. Вплив температурного режиму зберігання тканини плаценти на властивості одержаних з неї водно-сольових екстрактів / В.А. Пітько, К.Д. Розанова, Д.М. Погожих, [и др.] // Зб. наукових праць асоціації акушерів-гінекологів України. – 2006. – С. 585–587.
91. Плацента: криоконсервирование, структура, свойства, перспективы клинического применения // Под. ред. В.И. Грищенко, Т.Н. Юрченко. – Харьков: СПД ФЛ Бровин А.В., 2011. – 292 с.
92. Попандопуло А.Г. Биотехнологические особенности получения аутологичных фибробластов и перспективы их использования в современной косметологии / А.Г. Попандопуло, О. И. Селезнева, А.Я. Гончарова, И.О. Коробкина // Вестник неотложной и восстановительной медицины. –2012. – Т. 13, №. 1. – С. 161.
93. Попов В.Б. Тестирование химических веществ на тератогенность в культуре постимплантационных зародышей крысы / В.Б. Попов // Сб. научн. трудов [«Общие закономерности и контролирующие механизмы раннего эмбриогенеза млекопитающих в норме и патологии»]. – Ленинград, 1985. – С. 77–84.
94. Попович Я.О., Шевчук А.Г., Василюк М.Д. Препарати кріоплацентарного комплексу в корекції оксидантного стресу при лікуванні хворих на синдром діабетичної стопи // Трансплантологія. –2007. – Т.9, №1. – С.224 – 227.

95. Прокопюк В.Ю. Вплив імплантації кріоконсервованої хоріальної тканини на морфофункціональний стан міокарда старих щурів / В.Ю. Прокопюк, О.С. Прокопюк, В.В. Чижевський // Медицина сьогодні і завтра. – 2011. – Т. 50–51, № 1–2. – С. 242–245.
96. Прокопюк О.С. Влияние криоконсервированного экстракта плаценты на интенсивность ПОЛ и содержание гидроперекисей липидов в тканях крыс в норме и после общего острого охлаждения / О.С. Прокопюк, А.К. Черемской, Ю.В. Никитченко, В.В. Чижевский // Пробл. криобиологии. – 2005. – Т. 15, № 4. – С. 681–687.
97. Прокопюк О.С. Застосування трансплантації кріоконсервованої хоріальної тканини в лікуванні вагітних з материнсько-плодовою інфекцією / О.С. Прокопюк, В.Г. Карпенко, В.Ю. Прокопюк // Трансплантологія. – 2004. – Т. 7, № 3. – С. 333–336.
98. Прокопюк О.С. Изучение влияния экстракта плаценты и нейроткани на мембранометаболическую функцию митохондрий и микросом из печени крыс в системе *in vivo* / О.С. Прокопюк, В.И. Страна, Т.Н. Юрченко [и др.] // Пробл. криобиологии. – 2002. – № 4. – С. 24–29.
99. Прокопюк О.С. Коррекция сенильно-инволютивных процессов с использованием криоконсервированных фрагментов плаценты / О.С. Прокопюк // Сб. материалов международной научно-практической конференции «Практико-ориентированные биотехнологические исследования в растениеводстве, животноводстве и медицине» (Брест, 27-28 июня 2013). – Брест, 2013. – С.123 – 126.
100. Прокопюк О.С. Криоконсервирование плаценты различной степени зрелости / О.С. Прокопюк, А.Ю. Петренко, В.Ю. Прокопюк, В.В. Чижевский // Пробл. криобиологии. – 2008. – № 2. – С. 220.
101. Прокопюк О.С. Криоконсервированные биообъекты плацентарного происхождения в Украинском тканевом банке / О.С. Прокопюк, В.И. Грищенко, В.И. Страна, Т.Н. Юрченко // Сб. докладов

- III Всероссийского симпозиума с международным участием ["Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии"], (25–26 апреля 2007). – Москва, 2007. – С. 98–99.
102. Прокопюк О.С. Микроциркуляция при остром общем охлаждении на фоне введения криоконсервированного экстракта плаценты / О.С. Прокопюк., А.К. Черемской, И.В. Слета [и др.] // Пробл. криобиологии. – 2005. – Т. 15, № 3. – С. 479–481.
103. Прокопюк О.С. Экспериментальное обоснование коррекции нарушений репродуктивной функции в геронтологии / О.С. Прокопюк, В.Г. Карпенко, В.Ю. Прокопюк // Тези доповідей науково-практичної конференції з міжнародною участю [«Інноваційні аспекти технологій в урології»], (22-23 березня 2012). – Київ, 2012. – С. 74–75.
104. Прокопюк О.С. Глава 16. Криоконсервирование плацентарных биообъектов, содержащих стволовые клетки / О.С. Прокопюк, В.И. Грищенко, Л.А. Бабийчук [и др.] // Стволовые клетки и регенеративная медицина / Под ред. В.А. Ткачука. – М.: МАКС Пресс, 2011. – 320 с. – С. 289–303.
105. Прокопюк О.С. Плацентарная терапия гериатрических изменений репродуктивной функции / О.С. Прокопюк, В.Ю. Прокопюк, В.Г. Карпенко // Тезисы докладов V Всероссийского симпозиума с международным участием „Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии”, 17-18 мая 2012. –Уфа, 2012. – С. 185–186.
106. Прокопюк О.С. Глава 5. Верификация биобезопасности и сохранности криоконсервированных плацентарных биообъектов / О.С. Прокопюк, В.В. Чижевский, В.Ю. Прокопюк, В.В. Волина // Плацента: криоконсервирование, структура, свойства, перспективы клинического применения. / Под. ред. В.И. Грищенко, Т.Н. Юрченко. – Харьков: СПД ФЛ Бровин А.В., 2011. – 292 с.
107. Пушкарь Н.С. Низкотемпературная кристаллизация в биологических

- системах. / Н.С. Пушкарь, А.М.Белоус, Ю.А. Иткин – Киев: Наук. Думка, 1977. – 242 с.
108. Рыболовлев Ю. Р. Дозирование веществ для млекопитающих по константам биологической активности / Ю. Р. Рыболовлев, Р.С. Рыболовлев // Доклады Академии Наук СССР. – 1979, Т. 247. – С. 1513-1516.
 - 109.Савельев В.И. Тканевые банки страны: Итоги и перспективы развития / В.И. Савельев, М.В. Лекишвили // Технологии живых систем. – 2009. – Т. 6, № 4. – С. 4–9.
 - 110.Сандомирський Б. П. Кріо- і клітинна терапія в естетичній медицині / Б. П. Сандомирський // Нувель Естетік. – 2005. – Т. 28, № 6. – С. 10 - 14.
 - 111.Сельков С.А. Плацентарные макрофаги / Сельков С.А., Павлов О.В. – М.: Товарищество научных изданий КМК, 2007. – 187 с.
 - 112.Сергиенко В.И. Математическая статистика в клинических исследованиях / В.И. Сергиенко, И.Б. Бондарева. – М.: ГЭОТАР-МЕД, 2001. – 256 с.
 - 113.Смольникова Н.М. Изучение эмбриотоксических свойств лекарственных веществ / Н.М. Смольникова, И.В. Голованова, В.А. Проїнова [и др.] // Фармакология и токсикология. – 1982. – №4. – С. 115-119.
 - 114.Степанов С.А. Введение в клиническую морфологию плаценты человека / С.А. Степанов, М.И. Исакова, Миронов В.А. [и др.] – Саратов: Изд-во Саратов. ун-та, 1991. – 161 с.
 - 115.Стентон Г. Медико-биологическая статистика / Г. Стентон. – М.: Практика, – 1999. – 459 с.
 - 116.Сукач А.Н. Перспективы использования наночастиц ферромагнетиков для криоконсервирования клеток / А.Н. Сукач, В.П Грищук, В.И. Грищенко // Проблемы криобиологии . – 2008. – Т. 18, № 4. – С. 401 – 403.
 - 117.Трифонов В.Ю. Криоконсервированная сыворотка кордовой крови в восстановлении репродуктивной функции при антифосфолипидном синдроме / В.Ю. Трифонов, В.Ю. Прокопюк, А.В. Зайченко // Пробл. криобиологии. – 2011. – Т. 21, № 1. – С. 75–84.

- 118.Тюрина О.В. Организация публичного банка плацентарной крови в Самарской области / О.В. Тюрина // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2007. – Т. II, № 2. – С. 94.
- 119.Федоров В.А. Опыт организации банков пуповинной крови в РФ / В.А. Федоров // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2007. – Т. II, № 2. – С. 95.
- 120.Феськов А.М. Диагностика и лечение эндокринного бесплодия у женщин в зависимости от состояния эндометрия: автореф. дис. на соиск. научн. ст. докт. мед. наук: спец. 14.01.01 «Акушерство и гинекология» / А.М. Феськов. – Киев, 2002. – 33 с.
- 121.Филатов В. П. Основные теоретические вопросы тканевой терапии / В. П. Филатов // Тканевая терапия. – Киев: Изд-во АН УССР, 1953. – С. 5–21.
- 122.Фролькис В.В. Геронтология: прогнозы и гипотезы / В.В. Фролькис // Вест. НАН Украины. – 1999. – № 7. – С. 28–40.
- 123.Фролькис В.В. Экспериментальные пути продления жизни / В.В. Фролькис, Х.К. Мурадян. – Л.: Наука, 1988. – 248 с.
- 124.Фуллер Б. Криоконсервирование для создания банка клеток: современные концепции на рубеже 21 столетия / Б. Фуллер, К. Грин, В.И. Грищенко // Пробл. криобиологии. – 2003. – № 2. – С. 62–83.
- 125.Хавинсон В.Х. Результаты и перспективы применения пептидных биорегуляторов в геронтологии / В.Х. Хавинсон, В.Г. Морозов // Клинич. медицина. – 2006. – № 8. – С. 81–84.
- 126.Хансон К.П. Роль апоптоза в старении и возрастной патологии / К.П. Хансон // Успехи геронтологии. – 1999. – № 3. – С. 103-111.
- 127.Цирельников Н.И. Гистофизиология плаценты человека / Н.И. Цирельников. – Новосибирск: Наука, 1980. – 184 с.
- 128.Цуцаева А.А. Криобанки. Использование криоконсервированных биообъектов в медицине, ветеринарии и на этапах биотехнологии /

- А.А. Цуцаева, В.И. Грищенко, Б.Т. Стегний // Ветеринарная патология. – 2007. – Т. 20, № 1. – С. 17–19.
- 129.Цуцаева А.А. Крiоиммунологiя. / А.А. Цуцаева, А.Н. Гольцев, Н.Н. Попов. – Киев: Наук. думка,1988. – 176 с.
- 130.Чижевский В.В. Поиск оптимальных режимов замораживания и криозащитных сред для криоконсервирования биологического материала / В.В. Чижевский, В.Ю. Прокопюк, М.И. Грошевой // Матеріали IV з'їзду трансплантологів України, (21-23.11.2007). – Трансплантологія. – 2007. – Т. 9, № 1. – С. 309–311.
- 131.Шангина О.Р. Тканевой банк аллоплант – вчера, сегодня, завтра / О.Р. Шангина // Сб. тезисов V Всероссийского симпозиума с международным участием [«Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии»]. – Уфа, 2012. – С. 54–55.
- 132.Шатило В.Б. Функциональный возраст системы вегетативной регуляции как критерий функционального состояния организма / В.Б. Шатило // Проблемы старения и долголетия. – 1992. – Т.2, №3. – С. 293–296.
- 133.Швед А.Д. К вопросу о необходимости создания в Украине национального банка кордовой крови / А.Д. Швед // Doctor. – 2004. – № 4. – С. 37–42.
- 134.Шепітько В.І. Морфофункціональний стан селезінки після алотрансплантації плаценти / В.І Шепітько. // Вісн. Морфології. – 2003. – Т.9, № 2. – С. 198–200.
- 135.Шепітько К.В. Лікування стабільної стенокардії із застосуванням криоконсервованої фетоплацентраної тканинної трансплантації / К.В. Шепітько, С.О. Гаєвський, М.М. Потяженко [та інш.] // Пробл. криобиологии. – 2001. – № 3. – С. 43.
- 136.Ширшев С.А. Иммунология материнско-фетальных взаимодействий / С.В. Ширшев. – 2009. – Екатеринбург: УрО РАН. – 2009. – 582 с.

- 137.Шраго М.И. Крипротекторы и консерванты (основные направления исследований) / М.И. Шраго, А.Н. Новиков, Л.А. Ханина [и др.] // Криобиология. –1985. – № 3. – С. 8–13.
- 138.Юрченко Т.М. Обґрунтування використання тканин фетоплацентарного комплексу в лікувальній практиці / Т.М. Юрченко, В.І. Строна, О.С. Прокопюк [та інш.] // Трансплантологія. – 2003. – Т. 4, № 1. – С. 202–203.
- 139.Юрченко Т.Н. О возможности криоконсервирования плацентарной ткани / Т.Н. Юрченко, О.С. Прокопюк, И.Ю. Кузьмина [и др.] // Тези докл. І з'їзду Українського товариства кріобіологів і кріомедиків. – Харків, 1995. – С. 284–285.
- 140.Acker J.P. Membrane damage occurs during the formation of intracellular ice / J.P. Acker, L.E. McGann // Cryo Letters. – 2001. – Vol. 22, № 4. – P. 241–54.
- 141.Ames B.N. Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging / B.N. Ames, M.K. Shigenaga, T.M. Hogen // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 1993. – Vol. 90. – P. 7915–7921.
- 142.Arking R. Biology of aging. Observations and principles. 2nd edit / R.Arking. – Sunderland: Sinauer, 1998. – 486 p.
- 143.Arrojo I.P. Trends in cord blood banking / I.P. Arrojo, C. Lamas Mdel, L.P. Verdugo [et al.] // Blood Transfus. – 2012. – №. 10. – P. 95–100.
- 144.Asakawa T. Coloring condition of thiobarbituric acid test for detecting lipid hydroperoxides / T. Asakawa, S. Matsushita // Lipids. – 1980. – V. 15, № 3. – P. 137–140.
- 145.Ashwood-Smith. Mechanisms of cryoprotectant action / Ashwood-Smith // Society of Experimental Biology. – 1987. – Vol. 2. – P. 395–406.
- 146.Asok B.T. The aging paradox: free radical theory of aging / B.T. Asok, R. All // Exp. Gerontol. – 1999. – Vol. 34. – P. 293–303.

147. Asslaber M. Biobanks: transnational, European and global networks /
M. Asslaber, K. Zatloukal // *Brief Funct Genomic Proteomic*. – 2007. – №. 6. –
P. 193–201.
148. Baudot A. Glass – forming tendency in the system water – dimethyl sulfoxide / A.
Baudot, L. Alger, P. Boutron // *Cryobiology*. – 2000. – № 1. – P. 151–158.
149. Beavchamp C. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable
to acrylamide gels / C. Beavchamp, I. Fridovich // *Anal. Biochem*. – 1971. – Vol.
44, № 1. – P. 276–287.
150. Bevilacqua G. The role of the pathologist in tissue banking: European Consensus
Expert Group Report / G. Bevilacqua, F. Bosman, T. Dassel [et al.] //
Virchows Arch. – 2010. – Vol. 456, №. 4. – P. 449–454.
151. Biswas T.K. Wound healing activity of human placental extracts in rats /
T.K. Biswas, B. Auddy, N.P. Bhattacharya [et al.] // *Acta Pharmacol. Sin*. –
2001. – Vol. 22, № 12. – P. 1113–1116.
152. Bullough W.S. Mitotic control in adult mammalian tissues / W.S. Bullough // *Biol.*
Revue. – 1975. – Vol. 50. – P. 99–127.
153. By T.M. Cardiovascular tissue banking in Europe / T.M. By, R. Parker,
E.M. Delmo Walter, R. Hetzer // *HSR Proc. Intensive Care Cardiovasc Anesth*.
– 2012. – №. 4. – P. 251–260.
154. Caputcu A.T. Tissue cryobanking for conservation programs: effect of tissue type
and storage time after death / A.T. Caputcu, T. Akkoc, G. Cetinkaya,
S. Arat // *Cell Tissue Bank*. – 2013. – Vol. 14, № 1. – P. 1–10.
155. Cardoso S. Quality standards in Biobanking: authentication by genetic profiling of
blood spots from donor's original sample / S. Cardoso, L. Valverde, A. Odriozola
[et al.] // *Eur. J. Hum. Genet*. – 2010. Vol. 18, № 7. – P. 848–851.
156. Casson P.R. Oral dehydroepiandrosterone in physiological doses modulated
immune function in postmenopausal women / P.R. Casson, R.H. Andersen, H.G.
Herrod // *Amer. J. Obstet. Gynec*. – 1993. – Vol. 169. – P. 1536–1539.

157. Cha S.K. Effects of various combinations of cryoprotectants and cooling speed on the survival and further development of mouse oocytes after vitrification / S.K. Cha, B.Y. Kim, M.K. Kim [et al.] // Clin. Exp. Reprod. Med. – 2011. – Vol. 38, № 1. – P. 24–30.
158. Chakraborty P.D. Analysis of free and bound NADPH in aqueous extract of human placenta used as wound healer / P.D. Chakraborty, D. Bhattacharyya // J. Chromatogr. – 2009. – Vol. 877, № 24 – P. 2435–2042.
159. Chakraborty P.D. Isolation of fibronectin Type III like peptide from human placental extract used as wound healer / P.D. Chakraborty, D. Bhattacharyya // J. Chromatogr. – 2005. – Vol. 818, № 1. – P. 67–73.
160. Chakraborty P.D. Regulation of trypsin activity by peptide fraction of an aqueous extract of human placenta used as wound healer / P.D. Chakraborty, D. Bhattacharyya // J. Cell. Physiol. – 2011. – Vol. 226, № 8. – P. 2033–2040.
161. Chizhevsky V.V. Application efficiency biological object of placenta origin – during general homoiothermal organism / V.V. Chizhevsky, O.V. Lipina, A.K. Cheremskoy // Cryo 2007: 44-th Annual Society for Cryobiology (23.04.2007). – Vancouver, 2007. – P. 83.
162. Colleoni F. Cryopreservation of placental biopsies for mitochondrial respiratory analysis / F. Colleoni, A.J. Morash, T. Ashmore [et al.] // Placenta. – 2012. – Vol. 33, № 2. – P. 122–123.
163. Cotzias G.C. Prolongation of life-span in mice adapted to large amount of L-Dopa / G.C. Cotzias, S.T. Miller, A.R. Nicholson [et al.] // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 1974. – Vol. 71. – P. 2466–2469.
164. Curone A. Placental extracts in the treatment of some forms of threatened abortion / A. Curone // Minerva Ginecol. – 1967 – Vol. 31. № 19(16). – P. 822–823.
165. Cutler R. Oxidative stress: its potential relevance to human disease and longevity determinants / R. Cutler // Age. – 1995. – Vol. 18. – P. 91–96.

- 166.Dannchin-Burge C. The French National Cryobank: Creation of a cryogenic collection for domestic animal species / C. Dannchin-Burge, D. Bibe, D. Planchenault // Institut de l'Elevage. – 2002, September. – P. 1–4.
- 167.Datta P. Analysis of fluorescence excitation-emission matrix of multicomponent drugs: A case study with human placental extract used as wound healer / P. Datta, D. Bhattacharyya // J. Pharma. Biomed. Anal. – 2004. – Vol. 36, № 1. – P. 211-218.
- 168.Datta P. Spectroscopic and chromatographic evidences of NADPH in human placental extract used as wound healer / P. Datta, D. Bhattacharyya // J. Pharma. Biomed. Anal. – 2004. – Vol. 34. – P. 1091-1098.
- 169.Devireddy R.V. Predicted permeability parameters of human ovarian tissue cells to various cryoprotectants and water / R.V. Devireddy // Mol. Reprod. Dev. – 2005. – Vol. 70, № 3. – P. 333-343.
- 170.Dolmans M.M. A review of 15 years of ovarian tissue bank activities / M.M. Dolmans, P. Jadoul, S. Gilliaux // J. Assist. Reprod. Genet. – 2013. – Vol. 30, № 3. – P. 305–314.
- 171.Ebendal T. Function and evolution in the NGF family and its receptors / T. Ebendal // J. Neuros. Res. – 1992. – Vol. 32. – P. 461–470.
- 172.Elmoazzen H.Y. Cryoprotectant equilibration in tissues / H.Y. Elmoazzen, J.A. Elliott, L.E. McGann // Cryobiology. – 2005. – Vol. 51, № 1. – P. 85–91.
- 173.Elmoazzen H.Y. Dimethyl sulfoxide toxicity kinetics in intact articular cartilage / H.Y. Elmoazzen, A. Poovadan, G.K. Law [et al.] // Cell Tissue Bank. – 2007. – Vol. 8, № 2. – P. 125-133.
- 174.Estrafallaces A. Placental extracts in the therapy of cervico-vaginal lesions / A. Estrafallaces, T. Mannarino // Quad Clin. Ostet. Ginecol. – 1966. – Vol. 21, № 5. – P. 249-252.
- 175.Fahy G.M. Cryoprotectant toxicity neutralization / G.M. Fahy // Cryobiology. – 2010. – Vol. 60, № 3. – P. 45-53.

- 176.Fahy G.M. Cryoprotectant toxicity and cryoprotectant toxicity reduction: In search of molecular mechanisms / G.M. Fahy, T.H. Liley, H. Lindsell [et al.] // *Cryobiology*. – 1990. – Vol. 27, № 3. – P. 247-268.
- 177.Faulk W.P. Immunological studies of human placenta: identification and distribution of protein in mature chorionic villi / W.P Faulk, P.M Johnson // *Clin. Exp. Immunol.*– 1977. – Vol. 27, № 2. – P. 365–375.
- 178.Flercher B.L. Measurement of fluorescent lipid peroxidation products in biological systems and tissues / B.L. Flercher, C.J. Dillard, A.Y. Tappel // *Anal. Biochem.* – 1973. – Vol. 52. – P. 1–9.
- 179.Gaum L. Tissue and corneal donation and transplantation in the UK / L. Gaum, I. Reynolds, M.N. Jones [et al.] // *Br. J. Anaesth.* – 2012. – Vol. 108. – P. 43–47.
- 180.Gilbertson J.R. Automated clinical annotation of tissue bank specimens / J.R. Gilbertson, R. Gupta, Y. Nie [et al.] // *Medinfo*. – 2004. – № 11. – P. 607–610.
- 181.Girotto G. Use of placental extract for the treatment of myopic and senile chorio-retinal dystrophies / G. Girotto, W. Malinverni // *Int. J. Tissue React.* – 1982. – № 4. – P. 169-172.
- 182.Gislefoss R.E. Long-term stability of serum components in the Janus Serum Bank / R.E. Gislefoss, T.K. Grimsrud, L. Mørkrid // *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* – 2008. – Vol. 68, № 5. – P. 402-409.
- 183.Giustina A. Growth hormone treatment in aging: state of the art and perspectives / A. Giustina, P. Desenzani, S. Bossoni, P. Perini // *Aging. Clin. Exp. Res.* – 1997. – Vol. 9, № 4. – P. 73-74.
- 184.Grichenko V.I. Application of cryopreserved tissues of placenta under placental insufficiency / V.I. Grichenko, I.V. Kusmina, O.S. Prokopyuk // *VI-th Meeting of the European Placenta Group: Abstracts*. – Belgium, 1995. – P. 161.
- 185.Grischenko V. Morphological characteristics of the liver tissue reaction to the placenta cryopreserved fragment implantation in the experiment /

- V. Grischenko, V. Kozlova, V. Shepitko, T. Yurchenko, V. Strona, O. Prokopyuk // 2nd World Congress on Tissue Banking– and 8th International Conference of EATB, date, 1999: Abstracts. – Warsaw, 1999. – P. 203.
186. Grischenko V. Usage of cryopreserved fragments of placenta in the complex therapy of diabetes mellitus / V. Grischenko, L. Bobyрева, T. Yurchenko, V. Shepitko, V. Bobyрева, V. Strona, O. Prokopyuk // 2nd World Congress on Tissue Banking – and 8-th International Conference of EATB, date, 1999: Abstracts. – Warsaw, 1999. – P. 207.
187. Grischenko V.I. The effect of different cryopreservation programs on morphofunctional properties of the applied in clinics tissues / V.I. Grischenko, A.S. Snurnikov, T.N. Yurchenko, V.I. Strona, O.S. Prokopyuk // World Congress of Cryobiology – Cryo 99, 1999: Abstracts. – Marselle, 1999. – P. 30.
188. Grischenko V.I. About possibility to prevent hemorheologic disorders during homoiothermal organism cooling / V.I. Grischenko, O.V. Lipina, V.V. Chizhevsky, O.S. Prokopyuk // Cryo 2006, July 24-27, 2006: Abstracts. – Hamburg, Germany, 2006. – P. 102.
189. Grizzle W.E. Quality Assurance in Tissue Resources Supporting Biomedical Research / W.E. Grizzle, K.C. Sexton, W.C. Bell // Cell. Preserv. Technol. – 2008. – Vol. 6, № 2. – P. 113–118.
190. Guilbert L.J. Preparation and functional characterization of villous cytotrophoblasts free of syncytial fragments / L.J. Guilbert, B. Winkler-Lowen, R. Sherburne [et al.] // Placenta. – 2002. – Vol. 23, № 2-3. – P. 175-83.
191. Gurgel L.A. Effects of human placental extract on chemical and thermal nociception in mice / L.A. Gurgel, F.A. Santos, V.S. Rao // Eur. J. Pain. – 2000 – Vol. 4, № 4. – P. 403-408.
192. Hainaut P. Pathology as the cornerstone of human tissue banking: European consensus expert group report / P. Hainaut, E. Caboux, G. Bevilacqua // Biopreservation and Biobanking. – 2009/2010. – Vol. 7, № 3. – P. 157-160.
193. Hamilton J.B. Duration of life and causes of death in domestic cats: influence of

- sex, gonadectomy and inbreeding / J.B. Hamilton, R.S. Hamilton, G.E. Mestler // J. Gerontol. – 1969. – Vol. 24. – P. 427-437.
194. Harman D. Free-radical theory of aging: invereasing the functional life span / D. Harman // Ann. N.Y. Acad. Sci. □- 1994. – Vol. 717. – P. 1-15.
195. Herman M. Hormone placement in the aging male / M. Herman, P. Berger // Exp. Gerontol. – 1999. – Vol. 34, № 8. – P. 923-933.
196. Higgins A.Z. Curve fitting approach for measurement of cellular osmotic properties by the electrical sensing zone method. I. Osmotically inactive volume / A.Z. Higgins, J.O. Karlsson // Cryobiology. – 2008. – Vol. 57, № 3. – P. 223-33.
197. Higgins A.Z. Curve fitting approach for measurement of cellular osmotic properties by the electrical sensing zone method. II. Membrane water permeability / A.Z. Higgins, J.O. Karlsson // Cryobiology. – 2010. – Vol. 60, № 2. – P. 117-128.
198. Hong J.W. The effect of human placenta extract in awound healing model / J.W. Hong, W.J. Lee, S.B. Hahn [et al.] // Ann. Plast. Surg. – 2010. – Vol. 65, №1. – P. 96-100.
199. Howard W. Bone banking / W. Howard // Aust. Nurs. J. – 1999. – № 6. – P. 1–3.
200. Huppertz B. The anatomy of the normal placenta / B. Huppertz // J. Clin. Pathol. – 2008. – Vol. 61. – P. 1296–1302.
201. Huppertz B. Cryogenic and low temperature preservation of human placental villousexplants e A new way to explore drugs in pregnancy disorders / B. Huppertz, V. Kivity, M. Sammar [et al.] // Placenta. – 2011. – Vol. 32. – P. 65–76.
202. Kaminski A. Implementation of EU requirements for tissue and cell banking in Poland / A. Kaminski, I. Uhrynowska-Tyszkiewicz, E. Olender // Сборник тезисов IV Всероссийского симпозиума с международным участием

- [«Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии»]. – СПб.: 2010. – С. 15-16.
- 203.Keldenich H. Treatment of hypogalactia with a placental extract. Clinical study / H. Keldenich, G. Bizzi, O. Longhi // *Minerva Ginecol.* – 1976. – Vol. 28, № 12. – P. 1015-1020.
- 204.Khavinson V.Kh. New approach to the prophylaxis and treatment of age-related pathology / V.Kh. Khavinson, D.V. Solovyova // *Romanian J. of Gerontology and Geriatrics.* – 1998. – Vol. 20, № 1. – P. 28-34.
- 205.Khuu H.M. Catastrophic failures of freezing bags for cellular therapy products: description, cause and consequences / H.M. Khuu, H. Cowley, V. David-Ocampo [et al.] // *Cytotherapy.* – 2002. – № 4. – P. 539-549.
- 206.Klinich K.D. Effect of frozen storage on dynamic tensile properties of human placenta / K.D. Klinich, C.S. Miller, J. Hu [et al.] // *J Biomech. Eng.* – 2012. – Vol. 134, № 3. – P. 034501.
- 207.Kocaoemer A. Human AB serum and thrombin-activated platelet-rich plasma are suitable alternatives to fetal calf serum for the expansion of mesenchymal stem cells from adipose tissue / A. Kocaoemer, S. Kern, H. Kluter, K. Bieback // *Stem Cells.* – 2007. – Vol. 25. – P. 1270-1278.
- 208.Koike K. Efficacy of porcine placental extract on shoulder stiffness in climacteric women / K. Koike, Y. Yamamoto, N. Suzuki [et al.] // *Climacteric.* – 2012. – Vol. 16, № 4. – P. 447-452.
- 209.Kong M.H. Effect of human placental extract on menopausal symptoms, fatigue, and risk factors for cardiovascular disease in middle-aged Korean women / M.H. Kong, E.J. Lee, S.Y. Lee [et al.] // *Menopause.* – 2008. – Vol. 15, № 2. – P. 296-303.
- 210.Laherty R.F. Inhibition of prolactin secretion of rat placental extract / R.F. Laherty, J.M. Budd, H.H. Srebnik // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* – 1983. – Vol. 172, № 1. – P. 29-33.

- 211.Lee J.H. Slow cooling rate with a shock cooling program can effectively cryopreserve pig hepatocytes / J.H. Lee, D.H. Jung, D.H. Lee [et al.] // Transplant. Proc. – 2012. – Vol. 44, № 4. – P. 1002-1004.
- 212.Leibo S.P. The principal variables of cryopreservation: solutions, temperatures, and rate changes / S.P. Leibo, T.B. Pool // Fertil Steril. – 2011. – Vol. 96, № 2. – P. 269-276.
- 213.Lekishvili M.V. Experimental and clinical study of the demineralized bone allografts manufactured in the tissue bank of CITO / M.V. Lekishvili, A.I. Snetkov, M.G. Vasiliev // Cell and Tissue Banking. – 2004. – Vol. 5, № 4. – P. 231-238.
- 214.Lermen D. Cryobanking of viable biomaterials: implementation of new strategies for conservation purposes / D. Lermen, B. Blömeke, R. Browne [et al.] // Mol. Ecol. – 2009. – Vol. 18, № 6. – P. 1030–1033.
- 215.Li W. Numerical analysis to determine the performance of different oocyte vitrification devices for cryopreservation / W. Li, X. Zhou, H. Wang // Cryo Letters. – 2012. – Vol. 33, № 2. – P. 144-150.
- 216.Liseth K. The viability of cryopreserved PBPC depends on the DMSO concentration and the concentration of nucleated cells in the graft / K. Liseth, J.F. Abrahamsen, S. Bjorsvik [et al.] // Cytotherapy. – 2005. – № 7. – P. 328-333.
- 217.Litvan G.G. Mechanism of cryoinjury in biological systems / G.G. Litvan // Cryobiology. – 1972. – Vol. 9. – P. 182–191.
- 218.Liu J. Cord Blood Banking and Transplantation in China: A Ten Years Experience of a Single Public Bank / J. Liu, J. He, S. Chen [et al.] // Transfus Med. Hemother. – 2012. – Vol. 39, № 1. – P. 23–27.
- 219.Manyalich M. European quality system for tissue banking / M. Manyalich, A. Navarro, J. Koller [et. al.] // Transplant. Proc. – 2009. – Vol. 41, № 6. – P. 2035–2043.

- 220.Marco-Jimenez F. Effect of "ice blockers" in solutions for vitrification of in vitro matured ovine oocytes / F. Marco-Jimenez, F. Berlinguer, G.G. Leoni // *Cryo Letters*. – 2012. – Vol. 33, № 1. – P. 41-44.
- 221.Marek M. Heart rate variability: Standards of measurement, physiological interpretation and clinical use / M. Marek // *Eur. Heart. J.* – 1996. – Vol. 17. – P. 354-381.
- 222.Marklund S. Normal Cu-Zn-superoxide dismutase, Mn-superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in Werner's syndrome / S. Marklund, I. Norgens Son, O. Back // *J. Gerontol.* – 1981. – Vol. 12536, № 4. – P. 405–409.
- 223.Mauzer P. Causes of injury in frozen and thawed cells / P. Mauzer // *Fed. Proc.* - 1965. – Vol. 24. – P. 175-182.
- 224.Mazur P. Freezing of living cells: mechanisms and implication / P. Mazur // *Am. J. Physiol.* – 1984. – Vol. 247. – P. 125-142.
- 225.Meryman H.T. / Freezing injury from "solution effects" and its prevetion by natural or artifical cryoprotection / H.T. Meryman, R.J.Williams, M.Douglas // *Cryobiology*. – 1977. – Vol. 14. – P. 287-302.
- 226.Miller R.K. Human Placental Explants in Culture: Approaches and Assessments / R.K. Miller, M.A Turner // *Placenta*. – 2005. – Vol. 26.– P. 439-448.
- 227.Morales Pedraza J. The importance of establishing an international network of tissue banks and regional tissue processing centers / J. Morales Pedraza // *Cell Tissue Bank*. – 2013. [Epub ahead of print]
- 228.Morente M.M. Biobanking: old activity or young discipline? / M.M. Morente, P.L. Fernandez, E. Alava // *Semin Diagn. Pathol.* – 2008. – Vol. 25. – P. 317–322.
- 229.Muldrew K. Mechanisms of intracellular ice formation / K. Muldrew, L.E. McGann // *Biophys. J.* – 1990. – Vol. 57. – P. 525-532.

230. Murthy S.N. Some insight into the physical basis of the cryoprotective action of dimethyl sulfoxide and ethylene glycol / S.N. Murthy // *Cryobiology*. – 1998. – Vol. 36, № 1. – P. 84-96.
231. Myint P. An international survey of tissue banking, a preliminary report / P. Myint, J. Wondergem, Y. Pynda, G.O. Phillips // *Cell Tissue Bank*. – 2013. – Vol. 14, № 2. – P. 159–165.
232. Narayan R.P. Development of tissue bank / R.P. Narayan // *Indian J. Plast. Surg.* – 2012. – Vol. 45, № 2. – P. 396–402.
233. Nath S. Cell adhesion by aqueous extract of human placenta used as wound healer / S. Nath, D. Bhattacharyya // *Indian J. Exp. Biol.* – 2007. – Vol. 45. – P. 732-738.
234. Newby D. Effect of cryopreservation on human cytotrophoblast cells in culture: hCG and PALP production / D. Newby, G.L. Dalgliesh, D.A. Aitken, F. Lyall // *Placenta*. – 2007. – Vol. 28, № 4. – P. 350-352.
235. Noiville C. Biobanks for research. Ethical and legal aspects in human biological samples collections in France / C. Noiville // *J. Int. Bioethique*. – 2012. – Vol. 3, № 2. – P. 165–172.
236. O'Doherty K.C. Structuring public engagement for effective input in policy development on human tissue biobanking / K.C. O'Doherty, A. Hawkins // *Public. Health. Genomics*. – 2010. – Vol. 13, № 4. – P. 197–206.
237. Ohkawa H. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction / H. Ohkawa, N. Ohahi, K. Jadi // *Anal. Biochem.* – 1979. – Vol. 95, № 2. – P. 351–358.
238. Olatunbosun O.A., Zhu L. The role of sperm banking in fertility preservation / O.A. Olatunbosun, L. Zhu // *Clin. Exp. Obstet. Gynecol.* – 2012. – Vol. 39, № 3. – P. 283–287.
239. Ollier W. UK Biobank: from concept to reality / W. Ollier, T. Sprosen, T. Peakman // *Pharmacogenomics*. – 2005. – № 6. – P. 639–646.

- 240.Osa T. Inhibitory action of human and rat placental extracts on myometrial activities of mouse and rat / T. Osa, T. Katase, T. Shibata // Jpn. J. Physiol. – 1974. – Vol. 24, № 4. – P. 433-450.
- 241.Ostashko F.I. Survival of trophoblastic fragments and vesicles after vitrification, ultrarapid freezing, and storage at 4 degrees C / F.I. Ostashko, V.I. Grishchenko, E.F. Isachenko // Cryobiology. – 1993. – Vol. 30, № 4. – P. 432-437.
- 242.Paglia D.E. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase / D.E. Paglia, W.N. Valentine // J. Lab. Clin. Med. – 1967. – Vol. 70. – P. 158–169.
- 243.Parker R. Cardiovascular tissue banking in Europe / R. Parker, E.M. Delmo Walter, R. Hetzer // HSR Proc. Intensive Care Cardiovasc. Anesth. – 2012. – Vol. 4, № 4. – P. 251–260.
- 244.Parolini O. Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international Workshop on Placenta Derived Stem Cells / O. Parolini, F. Alviano, G.P. Bagnara [et al.] // Stem Cells. – 2008. – Vol. 26. – P. 300–311.
- 245.Pati S. Clinical evaluation of effect of dressing with placental extract (Inj Placentrex) in the treatment of infected wounds / S. Pati, B.K. Saumandal, A.K. Bhattacharyya, P. Saumandal // J. Obstet. Gynaecol. (India). – 2001. – Vol. 51. – P. 124-126.
- 246.Peyridieu J.F. Critical cooling and warming rates to avoid ice crystallization in small pieces of mammalian organs permeated with cryoprotective agents / J.F. Peyridieu, A. Baudot, P. Boutron [et al.] // Cryobiology. – 1996. – Vol. 33, № 4. – P. 436-446.
- 247.Pierpaoli W. Pineal control of aging: effect of melatonin and pineal grafting on aging mice / W. Pierpaoli, W. Regelson // Proc. Nat. Acad. Sci., USA. – 1994. – Vol. 91. – P. 787-791.

248. Polchow B. Cryopreservation of human vascular umbilical cord cells under good manufacturing practice conditions for future cell banks / B. Polchow, K. Kebbel, G. Schmiedeknecht [et al.] // J. Transl. Med. – 2012. – Vol. 16, № 10. – P. 98.
249. Porta E.A. Effect of the type of dietary fat at two levels of vitamin E in Wistar male rats during development and aging. I. Life span, serum biochemical parameters and pathological changes / E.A. Porta, N.S. Joun, R.T. Nitta // Mech. Ageing. Dev. – 1980. – Vol. 13. – P. 1-39.
250. Prokopiuk O.S. Cryopreservation effect on morfofunctional integrity of humanplacental tissue / O.S. Prokopiuk, V.Yu. Prokopiuk, V.V. Volina, V.V. Chizevsky // Speaker Abstract 47th Annual Meeting of Cryobiology “Cryo-2010”, (17-20 July 2010). – Bristol, 2010. – P. 77.
251. Prokopiuk V.Yu. Perspectives and Opportunities of Application of Transplantation of Cryopreserved Chorion Tissue / V.Yu. Prokopiuk // Abstracts of World Congress of Cryobiology. Marseille, France. – 1999. – P. 31.
252. Pruß A. Tissue Banking and Transfusion Medicine – a Suitable Cooperation Model / A. Pruß // Transfus. Med. Hemother. – 2011. – Vol. 38, № 6. – P. 349–350.
253. Radaeva I.F. Banks of cell cultures for biotechnology / I.F. Radaeva, M.P. Bogryantseva, E.A. Nechaeva // Bull. Exp. Biol. Med. – 2012. – Vol. 153, № 4. – P. 581–585.
254. Ravin H.A. Rapid test for hepatolenticular degeneration / H.A. Ravin // Lancet. – 1956. – Vol. 1. – P. 7267–7271.
255. Recent advances in research on the human placenta // Edited by Jing Zheng. – Croatia: Published by In Tech Janeza. – 2012. – 428 p.
256. Riegman P.H. Biobanking for interdisciplinary clinical research / P.H. Riegman, W.N. Dinjens, J.W. Oosterhuis // Pathobiology. – 2007. – Vol. 74. – P. 239–244.

257. Robin C. Human placenta is a potent hematopoietic niche containing hematopoietic stem and progenitor cells throughout development / Robin C., Bollerot K., Mendes S. [et al.] // Cell Stem Cell. – 2009. – Vol. 5, – P. 385–395.
258. Rudman D. Effect of human growth hormone in men over 60 years old / D. Rudman, A.G. Felle, H.S. Nagraj [et al.] // New Engl. J. Med. – 1990. – Vol. 323. – P. 1-6.
259. Sahota D.S. Effect of long-term storage on placental growth factor and fms-like tyrosine kinase 1 measurements in samples from pregnant women / D.S. Sahota, L.W. Chan, M. Chen [et al.] // J. Matern. Fetal. Neonatal. Med. – 2010. – Vol. 23, № 12. – P. 1475-1480.
260. Salvaterra E. The ethics of cord blood banking in light of ownership, informed consent, and solidarity / E. Salvaterra, L. Lecchi, S. Gobbi, P. Rebulla // Cell preservation technology. – 2006. – Vol. 4, № 2. – P. 91–96.
261. Sgro L.C. Topical treatment of cervico-vaginal lesions using a placental extract with anticomplement activity / L.C. Sgro // Minerva Ginecol. – 1978. - Vol. 30. – P. 671-682.
262. Shibasaki F. Anomalies observed in fetal mouse skeleton stained with alizarin blue and alizarin red. / F. Shibasaki, M. Vasuda // Teratology. – 1980. – Vol. 22, № 1. – P. 1.
263. Shore V.H. Vascular endothelial growth factor, placental growth factor and their receptors in isolated trophoblast / V.H. Shore, T.H. Wang, C.L Wang [et al.] // Placenta. – 1997. – Vol. 18, №8. – P. 657– 665.
264. Shukla V.K. A trial to determine the role of placental extract in the treatment of chronic non-healing wounds / V.K. Shukla, M.A. Rasheed, M. Kumar [et al.] // J. Wound. Care. – 2004. – Vol. 13, № 5. – P. 177-179.
265. Snurnikov A.S. Cryosublimation of fetoplacental tissues in general system of tissue banks / A.S. Snurnikov, V.I. Grischenko, T.I. Gurina, O.S. Prokopyuk // 35-th Annual Meeting of the Society for Cryobiology, 1999: Abstracts. – Pittsburgh, 1999. – P. 52.

- 266.Sohal R.S. Oxidative stress, caloric restriction and aging / R.S. Sohal,
R. Weindruch // Science. – 1996. – Vol. 273. – P. 59-63.
- 267.Soto C. Consent to tissue banking for research: qualitative study and
recommendations / C. Soto, C. Tarrant, K. Pritchard–Jones, M. Dixon–Woods //
Arch. Dis. Child. – 2012. – Vol. 97, № 7. – P. 632–636.
- 268.Sreedhar Thirumala W. Clinical grade adult stem cell banking / W. Sreedhar
Thirumala, G. Scott, J. Erik // Organogenesis. – 2009. – Vol. 5, № 3. –
P. 143-154.
- 269.Stacey G.N. Cryopreservation and banking of mammalian cell lines /
G.N. Stacey, J.R. Masters // Nat. Protoc. – 2008. – № 3. – P. 1981–1989.
- 270.Sternberg S. Memory-scanning: mental processes revealed by reaction-time
experiments / S. Sternberg // American Scientist. – 1969. – Vol. 57 № 4. –
P. 421-457.
- 271.Stiff P.J. Autologous bone marrow transplantation using unfractionated cells
cryopreserved in dimethylsulfoxide and hydroxyethyl starch without controlled-
rate freezing / P.J. Stiff, A.R. Koester, M.K. Weidner [et al.] // Blood. – 1987. –
Vol. 70. – P. 974-978.
- 272.Stott S.L. Visualization of intracellular ice formation using high-speed video
cryomicroscopy / S.L. Stott, J.O. Karlsson // Cryobiology. – 2009. - Vol. 58,
№ 1. – P. 84-95.
- 273.Subramanian T. Effects of placental dressing indolentulcers / T. Subramanian, P.
Vijayarathinam, V. Sathyavan // J. Indian Med. Assoc. – 1990. – Vol. 88. – P.
314.
- 274.Taghizadeh R.R. Wharton's Jelly stem cells: future clinical applications /
R.R. Taghizadeh, K.J. Cetrulo, C.L. Cetrulo // Placenta. – 2011. – Vol. 32, № 4.
– P. 311-315.
- 275.Thirumala S. Clinical grade adult stem cell banking / S. Thirumala,
W.S. Goebel, E.J. Woods // Organogenesis. – 2009. – Vol. 5, № 3. –
P. 143-154.

- 276.Thirumala S. Effect of various freezing parameters on the immediate post-thaw membrane integrity of adipose tissue derived adult stem cells / S. Thirumala, S. Zvonic, E. Floyd [et al.] // *Biotechnol. Prog.* – 2005. – Vol. 21. – P. 1511-1524.
- 277.Thoenen H. Quantification and purification of neurotrophic molecules / H. Thoenen, S. Korsching, Y. Barde, D. Edgar // *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* – 1983. – Vol. 48. – P. 679-684.
- 278.Tiwary S.K. Effect of placental-extract gel and cream on non-healing wounds / S.K. Tiwary, D. Shukla, A.K. Tripathi [et al.] // *J. Wound. Care.* – 2006. – Vol. 15, № 7. – P. 325-328.
- 279.Valk J. Optimization of chemically defined cell culture media-replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods / J. Valk, D. Brunner, K. De Smet [et al.] // *Toxicol. In Vitro.* – 2010. – Vol. 24, № 4. – P. 1053-1063.
- 280.Vaught J.B. Ethical, legal, and policy issues: dominating the biospecimen discussion / J.B. Vaught, N. Lockhart, K.S. Thiel [et al.] // *Cancer Epidemiol. Biomarkers. Prev.* – 2007. – Vol. 16. – P. 2521–2523.
- 281.Villalba R. In vitro susceptibility of high virulence microorganisms isolated in heart valve banking / R. Villalba, F. Solis, G. Fornés // *Cell Tissue Bank.* – 2012. – Vol. 13, № 3. – P. 441–445.
- 282.Wang H.Y. Inhibition of nucleation and growth of ice by poly (vinyl alcohol) in vitrification solution / H.Y. Wang, T. Inada, K. Funakoshi, S.S. Lu. // *Cryobiology.* – 2009. – Vol. 59. – P. 83-89.
- 283.Wang H.Y. Glass transition behavior of the vitrification solutions containing propanediol, dimethyl sulfoxide and polyvinyl alcohol / H.Y. Wang, S.S. Lu, Z.R. Lun // *Cryobiology.* – 2009. – Vol. 58, № 1. – P. 115-117.
- 284.Warner E. Tissue banking in ENT: challenges and methods / E. Warner, M. Birchall, M.W. Lowdell // *J. Laryngol. Otol.* – 2013. – Vol. 27, № 7. – P. 630–637.

285. Warwick R.M. International collaboration between tissue banking associations / R.M. Warwick // Cell Tissue Bank. – 2010. – Vol. 11, № 2. – P. 105.
286. Watson P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post – thawing / P.F. Watson // Reprod. Fertil. Dev. – 1995. – Vol. 7. – P. 871-891.
287. Weisman Ch. Molecular biology of transmissible spongiform encephalitis / Ch. Weisman // FEBS Lett. – 1996. – Vol. 389. – P. 3-11.
288. Weiss A.D. Statistical prediction of the vitrifiability and glass stability of multi-component cryoprotective agent solutions / A.D. Weiss, J.F. Forbes, A. Scheuerman [et al.] // Cryobiology. – 2010. – Vol. 61, № 1. – P. 123-127.
289. Woods E.J. Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues / E.J. Woods, J.D. Benson, Y. Agca, J.K. Critser // Cryobiology. – 2004. – Vol. 48. – P. 146-156.
290. Wowk B. Thermodynamic aspects of vitrification / B. Wowk // Cryobiology. – 2010. – Vol. 6, № 1. – P. 11-22.
291. Wu C.H. Wound healing effects of porcine placental extracts on rats with thermal injury / C.H. Wu, G.Y. Chang, W.C. Chang [et al.] // Br. J. Dermatol. – 2003. – Vol. 148, № 2. – P. 236-245.
292. Yoshizawa R.S. Review: Public perspectives on the utilization of human placentas in scientific research and medicine / R.S. Yoshizawa // Placenta. – 2013. – Vol. 34. – P. 9–13.
293. Yuille M. The UK DNA banking network: a “fair access” biobank / M. Yuille, K. Dixon, A. Platt, W. Ollier // Cell and Tissue Banking. – 2010. – Vol. 11, № 3. – P. 241-251.

«Затверджую»
Перший проректор
ДВНЗ «Івано-Франківський національний
медичний університет», професор
А. М. Ерстенюк
«*15*» *вересня* 2013 р



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції для впровадження:** Використання наукових даних, щодо організації та функціонування низькотемпературних банків плацентарних біооб'єктів.
2. **Найменування установи:** ДВНЗ «Івано-Франківський національний медичний університет».
3. **Автори:** Прокопюк О.С., Чижевський В.В., Прокопюк В.Ю.
4. **Джерело інформації:** Статті.
Особенности использования низкотемпературного хранилища для долгосрочного хранения биологического материала в парах жидкого азота. Проблемы криобиологии. – 2007. – Т. 17, №3. – С. 305-311.
5. **Де та коли впроваджено:** Впроваджено у 2012 році в учбовий процес кафедри.
6. **Зауваження та пропозиції:** не має.

Завідувач кафедри хірургії №1
д.мед.н., професор

С. М. Василюк

ЗАТВЕРДЖУЮ

Проректор з науково-дослідної роботи
 Національного фармацевтичного університету
 МОЗ України
 проф. Коваленко С.М.
 « 28 » _____ 2013

**АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ**

1. Найменування пропозиції для впровадження: Використання наукових даних, щодо впровадження нових технологій отримання клітинних та тканинних фетоплацентарних трансплантатів .

2. Найменування установи: Інститут підвищення кваліфікації спеціалістів фармації Національного фармацевтичного університету МОЗ України

3. Автори: Прокопюк О.С., Грищенко В.І., Юрченко Т.М.

4. Джерело інформації:

Новые криобиологические технологии получения клеточных и тканевых фетоплацентарных трансплантатов и их использование в медицине. Трансплантология.- 2004.-Т.7, № 3.-С.123-129.

5. Де та коли впроваджено: Впроваджено у 2013 році в науково-дослідну роботу кафедри клінічної фармакології Інституту підвищення кваліфікації спеціалістів фармації Національного фармацевтичного університету МОЗ України (м. Харків).

6. Зауваження та пропозиції: не вносилися.

Обговорено та затверджено на засіданні кафедри клінічної фармакології ІПКСФ Національного фармацевтичного університету

Протокол №3 від «25» листопада 2013 року

Даний спосіб було вперше використано в ІПКіК НАН України. Дійсний акт не являється основою для фінансових претензій з боку патентовласника.

Відповідальний за впровадження
 д.мед.н., професор Зайченко Г.В.
 Підпис _____

ЗАТВЕРДЖУЮ
Директор ІПКіК НАН України
Академік НАН України
А.М. Гольцев
«20» травня 2013



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Найменування пропозиції для впровадження: Використання наукових даних, щодо функціонування низькотемпературного банку біологічних об'єктів.

2. Найменування установи: ІПКіК НАН України.

3. Автори: Грищенко В.І., Прокопюк О.С., Ходько О.Т., Прокопюк В.Ю.

4. Джерело інформації: Патенти, статті.

1. Пат. 70805 Україна, МПК7 А 01N1/02. Контейнер для низькотемпературного консервування біологічних об'єктів. Заявл. 29.12.03; опубл. 15.10.04, Бюл. № 10.
2. Криоконсервированные биообъекты плацентарного происхождения в Украинском тканевом банке / "Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии": III Всероссийский симпозиум с международным участием, 25-26 апреля 2007: Сборник докладов. — Москва, 2007. — С. 98 — 99.

5. Де та коли впроваджено: Впроваджено у 2012 році в роботу низькотемпературного банку біологічних об'єктів ІПКіК НАН України.

6. Зауваження та пропозиції: не має.

«20» травня 2013

Даний спосіб було вперше використано в ІПКіК НАН України. Дійсний акт не являється основою для фінансових претензій з боку патентовласника.

Відповідальний за впровадження
к.б.н. Черемський А.К.
Підпис _____





ЗАТВЕРДЖУЮ

Заступник директора з наукової роботи

ДП «МНЦ КіК НАН, АМН та МОЗ України

д.м.н., проф. Г.А. Бабійчук

«12» лютого 2013

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Найменування пропозиції для впровадження: Використання наукових даних, щодо функціонування низькотемпературного банку біологічних об'єктів.

2. Найменування установи: ДП «МНЦ КіК НАН, АМН та МОЗ України».

3. Автори: Грищенко В.І., Прокопюк О.С., Ходько О.Т., Прокопюк В.Ю.

4. Джерело інформації: Патенти, статті.

1. Пат. 70805 Україна, МПК7 А 01N1/02. Контейнер для низькотемпературного консервування біологічних об'єктів. Заявл. 29.12.03; опубл. 15.10.04, Бюл. № 10.
2. Криоконсервированные биообъекты плацентарного происхождения в Украинском тканевом банке / "Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии": III Всероссийский симпозиум с международным участием, 25-26 апреля 2007: Сборник докладов. – Москва, 2007. – С. 98 – 99.

5. Де та коли впроваджено: Впроваджено у 2012 році в роботу низькотемпературного банку біологічних об'єктів ДП «МНЦ КіК НАН, АМН та МОЗ України».

6. Зауваження та пропозиції: не має.

«12» лютого 2013

Даний спосіб було вперше використано в ІПКіК НАН України. Дійсний акт не являється основою для фінансових претензій з боку патентовласника.

Відповідальний за впровадження
Завідуючий низькотемпературним сховищем
ДП «МНЦ КіК НАН, АМН та МОЗ України»

к.б.н. Чижевський В.В.

Підпис

ЗАТВЕРДЖУЮ

Перший проректор з наукової роботи
Харківського національного медичного університетуд.м.н., проф. В.В. Мясосдов
« » 2013**АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ**

- 1. Найменування пропозиції для впровадження:** Використання наукових даних, щодо лікування уrogenітальних розладів в клімактеричному періоді.
- 2. Найменування установи:** Харківський національний медичний університет.
- 3. Автори:** Грищенко В.І., Прокопюк О.С., Перчик О.А., Строна В.І.
- 4. Джерело інформації:** Патенти, статті.
 1. Пат. 70686 Україна, МПК7 А61К35/50. Спосіб лікування уrogenітальних розладів в клімактеричному періоді ; заявл. 23.12.03; опубл. 15.10.04, Бюл. № 10.
 2. Фундаментальные и клинические аспекты клеточной терапии / Доктор. – 2004. – №4. – С.5-8.
- 5. Де та коли впроваджено:** Впроваджено у 2012 році в учбовий процес кафедри акушерства та гінекології №1 Харківського національного медичного університету.
- 6. Зауваження та пропозиції:** не має.

«9» квітня 2013

Даний спосіб було вперше використано в ІПКіК НАН України. Дійсний акт не являється основою для фінансових претензій з боку патентовласника.

Відповідальний за впровадження
Зав.кафедрою акушерства та гінекології №1
Харківського національного медичного університету
д.м.н., проф. М.О.Щербіна
Підпис

ЗАТВЕРДЖУЮ
Проректор з науково-педагогічної роботи
Холін Ю.В.



«24» січня 2014 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Найменування пропозиції для впровадження: Використання наукових даних, щодо можливої ембріолетальної та тератогенної дії кріоконсервованих біооб'єктів плацентарного походження.

2. Найменування установи: Харківський національний університет ім. Каразіна.

3. Автори: Прокопюк О.С.

4. Джерело інформації:

Дослідження можливої ембріолетальної та тератогенної дії кріоконсервованих біооб'єктів плацентарного походження / Світ медицини та біології. – 2007. – №1. – С. 56-60.

5. Де та коли впроваджено: Впроваджено у 2012 році в учбовий процес біологічного факультету кафедри генетики ХНУ.

6. Зауваження та пропозиції: не має.

«24» січня 2014 р.

Даний спосіб було вперше використано в ПКІК НАН України. Дійсний акт не являється основою для фінансових претензій з боку патентовласника.

Відповідальний за впровадження
зав. кафедрою генетики та цитології
професор Л.І.Воробйова

ЗАТВЕРДЖУЮ

Ректор Харківської медичної академії
післядипломної освіти
проф. Хвистюк О.М.«14» січня 2014**АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ**

1. Найменування пропозиції для впровадження: Використання наукових даних, щодо лікування урогенітальних розладів в клімактеричному періоді.
2. Найменування установи: Харківська медична академія післядипломної освіти.
3. Автори: Грищенко В.І., Прокопюк О.С., Перчик О.А., Строна В.І.
4. Джерело інформації: Патенти, статті.
 1. Пат. 70686 Україна, МПК7 А61К35/50. Спосіб лікування урогенітальних розладів в клімактеричному періоді ; заявл. 23.12.03; опубл. 15.10.04, Бюл. № 10.
 2. Фундаментальные и клинические аспекты клеточной терапии / Доктор. – 2004. – №4. – С.5-8.
5. Де та коли впроваджено: Впроваджено в учбовий процес кафедри перинатології, акушерства та гінекології ХМАПО з 2012 до 2013 рр.
6. Загальна кількість спостережень: 19 хворих
 1. Ефективність впровадження стосовно з критеріями, викладеними в джерелі (п.№4).

Показники	Згідно даним розробника	Згідно даним установи, яка впроваджувала
1. Лікування урогенітальних розладів у жінок	до 93,3 %	до 88,1 %

7. Пропозиції, зауваження: _____

Відповідальний за впровадження
Зав. кафедри перинатології, акушерства
і гінекології ХМАПО, професор
Грищенко О.В.

ЗАТВЕРДЖУЮ
Проректор з науково-педагогічної роботи
Харків О.В.

« 26 »



2014 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Найменування пропозиції для впровадження: Використання наукових даних, щодо корекції геріатричних змін за допомогою кріоконсервованих плацентарних біопрепаратів.

2. Найменування установи: Харківський національний університет ім. Каразіна.

3. Автори: О.С. Прокопчук та інші.

4. Джерело інформації:

Про можливість корекції геріатричних змін за допомогою кріоконсервованих плацентарних біопрепаратів / Практична медицина. – 2008. – Т. 14, №. – С. 250.

5. Де та коли впроваджено: Впроваджено у 2012 році в учбовий процес кафедри фізіології людини та тварин біологічного факультету ХНУ.

6. Зауваження та пропозиції: немає.

«24» січня 2014 р.

Даний спосіб було вперше використано в ІПКіК НАН України. Дійсний акт не являється основою для фінансових претензій з боку патентовласника.

Відповідальний за впровадження
зав. кафедрою фізіології людини і тварин
д.б.н., професор В.А.Бондаренко