

Міністерство освіти і науки України  
Національний технічний університет України  
«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»

*Прокопчук*

**ПРОКОПЧУК ВОЛОДИМИР ЮРІЙОВИЧ**

УДК: 606:615.361.014.4:57.086.13:611.013.8+618.1-08](043.3)

**БІОТЕХНОЛОГІЯ ОТРИМАННЯ ТА НИЗЬКОТЕМПЕРАТУРНОГО  
ЗБЕРІГАННЯ ПОХІДНИХ ПЛАЦЕНТИ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ  
ГІНЕКОЛОГІЧНОЇ ПАТОЛОГІЇ**

03.00.20 Біотехнологія

**РЕФЕРАТ**

дисертації на здобуття наукового ступеня  
доктора біологічних наук

Київ – 2025

Дисертацією є рукопис

Робота виконана в Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України

**Опоненти:** член-кореспондент НАН України, академік НАМН України,  
доктор медичних наук, професор,  
**РЕЗНИКОВ Олександр Григорович,**  
завідувач відділу ендокринології репродукції і адаптації  
Інституту ендокринології та обміну речовин  
імені В.П. Комісаренка НАМН України, м. Київ

доктор біологічних наук, старший дослідник,  
**ЧЕРНИШЕНКО Володимир Олександрович,**  
заступника директора з наукової роботи, завідувач відділу  
структури і функції білка Інституту біохімії  
імені О. В. Палладіна НАН України, м. Київ

доктор біологічних наук, професор,  
**МАЛЮВА Наталія Георгіївна,**  
завідувач лабораторії фармакології ДУ «Інститут проблем  
ендокринної патології  
імені В.Я. Данилевського НАМН України», м. Харків

Захист відбудеться «10» квітня 2025 р. о 13 годин 00 хвилин на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.002.28 Національного технічного університету України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського» за адресою: 03056, м. Київ, проспект Берестейський 37, корпус 1, ауд. 05.

Захист транслюватиметься на YouTube-каналі Вченої ради  
КПІ ім. Ігоря Сікорського:  
<https://www.youtube.com/@vchenaradakpi/streams>

З дисертацією можна ознайомитись на офіційному сайті <https://ela.kpi.ua> та у Науково-технічній бібліотеці ім. Г.І. Денисенка Національного технічного університету України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського» за адресою: 03056, м. Київ, проспект Берестейський 37.

Про дату та місце захисту громадськість проінформованою.  
«6» березня 2025 р.

Учений секретар  
спеціалізованої вченої ради Д 26.002.28  
доктор технічних наук, доцент



Наталія ГОЛУБ

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Швидкий розвиток клітинної та тканинної терапії робить актуальним пошук нових біотехнологій отримання та зберігання біопрепаратів (L. A. Marquez-Curtis, J. A. W. Elliott, 2024). Низькотемпературні технології є безальтернативним методом зберігання життєздатного матеріалу, що є необхідним для забезпечення необхідної кількості різноманітності матеріалу, транспортування, тестування на відсутність збудників інфекційних хвороб та біосумісність (S. Giwa et al., 2017, S. Thirumala al., 2009). Однак за відсутності ефективних технологій зберігання біологічних структур до половини донорського матеріалу не може бути трансплантовано (A.J. Matas, 2015).

Похідні плаценти (клітини, тканини, біологічно активні речовини) є перспективними об'єктами для експериментального та клінічного застосування (A.R. Silini, O. Parolini, 2018, C. Pipino et al., 2013). По-перше, це обумовлено можливістю отримання великої кількості біоматеріалу без шкоди для донорів (R.S. Yoshizawa 2013). По-друге, тканини та клітини плаценти, які регулюють та забезпечують взаємоіснування матері та плоду, мають здатність до синтезу багатьох регуляторних факторів та містять стовбурові клітини (O. Parolini et al., 2008). По-третє, клітини та тканини плаценти пристосовані до існування в чужорідному організмі під час вагітності (L.H. Sekhon et al., 2014, K.J. Askelund et al., 2011), що забезпечується зниженою експресією антигенів, синтезом регуляторів, змінами місцевої і загальної імунної відповіді (A.L.Veenstra van Nieuwenhoven et al., 2003). За даними U.S. National Library of Medicine (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) та U.S. National Institutes of Health (ClinicalTrials.gov) зареєстровано близько 16000 досліджень та 400 клінічних випробувань, присвячених похідним плаценти та кордової крові при лікуванні патологій ендокринної, нервової системи, органів зору, кровотворення, при аутоімунних станах, ішемічних, дистрофічних та дегенеративних порушеннях (J. Zheng, 2012, C. Pipino et al., 2013, R. Lim , 2017).

В Україні плацента та виділені з неї клітини відносяться до «Переліку тканин і клітин людини, з якими дозволена діяльність банків пуповинної крові, інших тканин і клітин людини» (Наказ МОЗ № 276 від 20.04.2012, зареєстровано в Міністерстві юстиції України 5.07.2012 за № 1124/21436) та не поширюється на сферу дії закону «Про застосування трансплантації анатомічних матеріалів людині» (ст. 3., редакція № 1967-IX від 16.12.2021). Таким чином, виготовлення застосування препаратів плаценти не вважається трансплантацією та може бути реалізовано банками пуповинної крові, інших тканин і клітин людини.

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

періоду (І.В. Лахно, О.В. Грищенко, 1999). Продемонстрована ефективність терапії похідними плаценти при імунологічному конфлікті при вагітності (Н.С. Луценко, 2005), невиношувані вагітності (О.М. Аралов, 2004). Однак механізми дії нативних та кріоконсервованих похідних плаценти остаточно не з'ясовані, отримані емпірично на різних об'єктах данні науково не узагальнені, не сформульовано показання та протипоказання до їхнього застосування (В.І. Грищенко, 2010, А. Fierabracci, et al., 2015, О. Parolini et al., 2017).

Необхідність пошуку нових методів лікування хвороб жіночої статеві сфери, підвищення фертильності обумовлена проблемами захворюваності та депопуляції в Україні та розвинених країнах (WHO:World Health Statistics 2022). Найбільшу соціальну значущість мають непліддя, на яке страждає 10-20% подружніх пар (В.О. Феськов, 2017, А. Zarinara et al., 2016), запальні хвороби та гормональні порушення хоч раз у житті виникають у більшості жінок (О.В. Ромащенко та ін., 2016, В.В. Das et al., 2016, L.I. Rasquin Leon et al., 2017), близько 10% вагітностей завершуються абортами (Н.Я. Жилка та ін, 2018, С. Garrido-Gimenez, et al., 2015). У рамках 70-ї сесії Генеральної Асамблеї ООН у Нью-Йорку серед цілей сталого розвитку на 2016-2030 у медичній сфері на першому місці стоять зниження материнської та дитячої смертності (<http://www.un.org.ua/ua/tsilirozvytku-tysiacholittia/tsili-staloho-rozvytku>). В Україні, незважаючи на реальні успіхи програми «Репродуктивне здоров'я нації», показники жіночого здоров'я ще відстають від європейських (Н.Г. Гойда та ін, 2016, І.Є. Вернера, 2016). Існуючі методи лікування гінекологічної та акушерської патології не достатньо ефективні, потребують вдосконалення та інновацій (W.F. Rayburn et al., 2016, Н. Kitchen et al., 2017).

Таким чином розробка ефективної біотехнології отримання та низькотемпературного зберігання препаратів похідних плаценти для лікування гінекологічної патології є актуальною та перспективною задачею.

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

#### **Мета дослідження.**

Наукове обґрунтування біотехнології отримання та зберігання похідних плаценти для лікування гінекологічної патології.

#### **Задачі дослідження:**

1. Отримати похідні плаценти, що можуть бути застосовані в медичній

практиці (експланти, клітини в суспензії, в сфероїдах та інкапсульовані в альгінатних сферах), порівняти їх властивості та оцінити придатність для подальшого застосування.

2. Порівняти методи оцінки якості похідних плаценти та обрати найбільш інформативні та прийнятні для застосування.
3. Провести оцінку впливу субнормотермічного (20°C) та гіпотермічного (4°C) зберігання на структуру, життєздатність, метаболічну активність, культуральні характеристики похідних плаценти.
4. Розробити біотехнологічні підходи до короткочасного субнормотермічного (20°C) та гіпотермічного (4°C) зберігання похідних плаценти.
5. Дослідити особливості ушкодження різних похідних плаценти при кріоконсервуванні в залежності від їхньої структури, складу кріозахисних середовищ та температурних режимів охолодження та зберігання.
6. Розробити біотехнологічні підходи щодо кріоконсервування та тривалого низькотемпературного зберігання похідних плаценти.
7. Оцінити вплив нативних та кріоконсервованих похідних плаценти на ізольовані компоненти жіночої статеві системи та систем її регуляції (органотипові культури яєчників, маток, фібробласти, нервові клітини, спленоцити) *in vitro*.
8. З'ясувати вплив кріоконсервованих експлантів плаценти на статеву систему здорових самиць, та на перебіг розповсюдженої та соціально значущої гінекологічної патології при в експерименті *in vivo* (інфекційний процес, передчасне виснаження яєчників, ішемічне ураження яєчників, синдром полікістозних яєчників, атифосфоліпідний синдром, операційна травма).
9. На основі отриманих даних визначити перспективи розробки біотехнологій отримання та застосування похідних плаценти при лікуванні гінекологічної патології.

**Об'єкт дослідження:** біотехнологічні підходи до отримання та низькотемпературного зберігання похідних плаценти, які можуть бути використані в медичній практиці.

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

**Методи дослідження.** У дисертаційній роботі застосовано сучасні інформативні методи дослідження. Для отримання, характеристики похідних плаценти та оцінки впливу факторів кріоконсервування застосовували методи культивування клітин, органотипове культивування, світлової, конфокальної лазерної скануючої мікроскопії, проточну цитометрію, біохімічні методи, програмне заморожування, кріомікроскопії. Для оцінки впливу похідних плаценти на жіночу репродуктивну систему застосовували моделювання патологічних станів на лабораторних тваринах, культуральні, гістологічні, морфометричні, біохімічні методи. Використовували комп'ютерну обробку зображень, даних конфокальної мікроскопії, проточної цитометрії, статистичну

обробку даних.

**Наукова новизна одержаних результатів.** У дисертаційній роботі вперше проведено комплексне теоретичне обґрунтування, вирішення біотехнологічних проблеми отримання, кріоконсервування, гіпотермічного та субнормотермічного зберігання похідних плаценти (експлантів, клітин у суспензії, у сфероїдах та інкапсульованих в альгінатних сферах) та їхнє застосування при найбільш розповсюдженій та соціально значущій гінекологічній патології в експерименті.

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

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

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

Доведено, що для кріоконсервування клітин плаценти найкращими кріопротекторами є диметилсульфоксид, 1,2-пропандіол та етиленгліколь. Проведено оцінку можливості кріоконсервування клітин плаценти з кріозахисними середовищами на основі дозволених до клінічного використання препаратів (розчин Рінгера, 0,9% NaCl, Стабізол, Неогемодез, Поліглюкін, Реосорбілакт).

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

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

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

Запропоновано методи кріоконсервування та короткочасного гіпотермічного зберігання похідних плаценти, які базуються на основі дозволених до застосування в клінічній практиці речовин (1,2-пропандіол, розчин Рінгеру, 0,9% NaCl) та холодильне обладнання, яке є на устаткуванні більшості лікарень.

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

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

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

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

Робота на проточному цитометрі виконувалася спільно з к.б.н. П.М. Зубовим, на кріомікроскопі спільно з д.б.н. Л.Г. Кулешовою, на конфокальному мікроскопі спільно з к.б.н. І. Ф. Коваленко. Обговорення результатів та оформлення роботи проводилося спільно з д.м.н. А.М. Гольцевим, д.б.н. О.К. Гулевським, д.б.н. О.Ю. Петренко, д.б.н. О.М. Сукачем, д.м.н. В.В. Лазуренко, д.м.н. О.В. Грищенко.

**Апробація результатів дисертації.** Загальні положення дисертації доповідались і обговорювались на засіданнях секцій вченої ради, двох семінарах ІПКіК НАН України (2017, 2019), науковому семінарі в медичному університеті м.Ганновера (Німеччина) у 2013 році по матеріалам сумісного проекту «Генетична модифікація та довгострокове зберігання клітин плаценти для клінічного застосування», 47th Annual meeting of cryobiology «Cryo-2010», 17-20 July 2010 (Bristol, United Kingdom), 36-й ежегодной конференции молодых учёных «Холод в биологии и медицине», 22-24 мая 2012 (Харьков), конференції «Актуальні питання геронтології та геріатрії», присвяченій пам'яті В.В. Фролькіса (Київ), 25 січня 2013, п'ятому конгресі з біоетики, 23-25 вересня 2013, Київ, Annual scientific conference «Freezing biological time» Society for Low Temperature Biology 50th Anniversary Celebration, & AGM 2014 8-10 October 2014 (London), 8th international meeting Stem cell network North Rhine-Westphalia 21-22 april 2015 (Bonn, Germany), 24th International medical student's conference, 14-16 april 2016 (Krakow, Poland), «Topical issues of new drugs development: XXIII international scientific and practical

conference of young scientists and student», 21 april 2016 (Kharkiv), XIII З'їзді онкологів та радіологів України 26–28 травня 2016 (Київ), 40 щорічній конференції молодих учених «Холод в біології та медицині» 23-24 травня 2016 (Харків), Society for Low Temperature Biology 2016, 7 September 2016, (Dresden, Germany), VII Національному конгресі патофізіологів України з міжнародною участю «Патофізіологія і фармація: шляхи інтеграції» 5-7 жовтня 2016 (Харків), VI Національному конгресі геронтологів і геріатрів України, 19-21 жовтня 2016 (Київ), XIV Міжнародній науковій конференції студентів, аспірантів, докторантів, молодих вчених та фахівців «Актуальні питання сучасної медицини» 30–31 березня 2017 (Харків), 8 th International Symposium on Experimental and Clinical Neurobiology June 18-21, 2017 (Kosice, Slovakia), SLTB Science meeting Cambridge 19 - 20 September 2017 (Cambridge, United Kingdom), International scientific conference «Normal and cancer stem cells: discovery, diagnosis and therapy», 5-6 October 2017 (Kyiv), щорічній науково-практичній конференції з міжнародною участю «Досягнення та перспективи експериментальної і клінічної ендокринології» (сімнадцяті Данилевські читання), 1-2 березня 2018 (Харків), 46th European society for artificial organs congress 3-7 September 2019 Hannover, Germany, Cryo 2022 Annual Meeting of the Society for Cryobiology Dublin, Ireland 19-22 July, 2022, “Cryo 2023 – 60 annual meeting” 25-27 July 2023, Minneapolis, MN, United States.

**Публікація матеріалів.** За результатами досліджень опубліковано 65 наукових праць, у тому числі 3 монографії, 22 статті у наукових фахових виданнях (18 українських, 4 закордонних; 12 статей включених у міжнародні наукометричні бази даних *Scopus* та/або *Web of Science Core Collection*, Q1-3 статті, Q2-1, Q3-4, Q4-3; 7 категорії A), 32 тези доповідей в збірниках матеріалів конференцій, 3 статті у інших періодичних виданнях України, 5 патентів на корисну модель, які в достатній мірі висвітлюють результати роботи, що виносяться на захист.

**Об'єм і структура дисертації.** Дисертація викладена на 325 сторінках комп'ютерного тексту і містить вступ, анотацію, огляд літератури, розділ «Матеріали і методи», три розділи власних досліджень, узагальнення, висновки, список посилань, який включає 327 джерел, з них 245 – іноземні, 1 додаток. Робота ілюстрована 32 таблицями і 99 рисунками.

## **ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ**

### **Огляд літератури**

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



визначення механізмів їхньої дії на жіночу статеву систему та можливостей застосування для лікування гінекологічної патології.

### Матеріали та методи дослідження

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

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

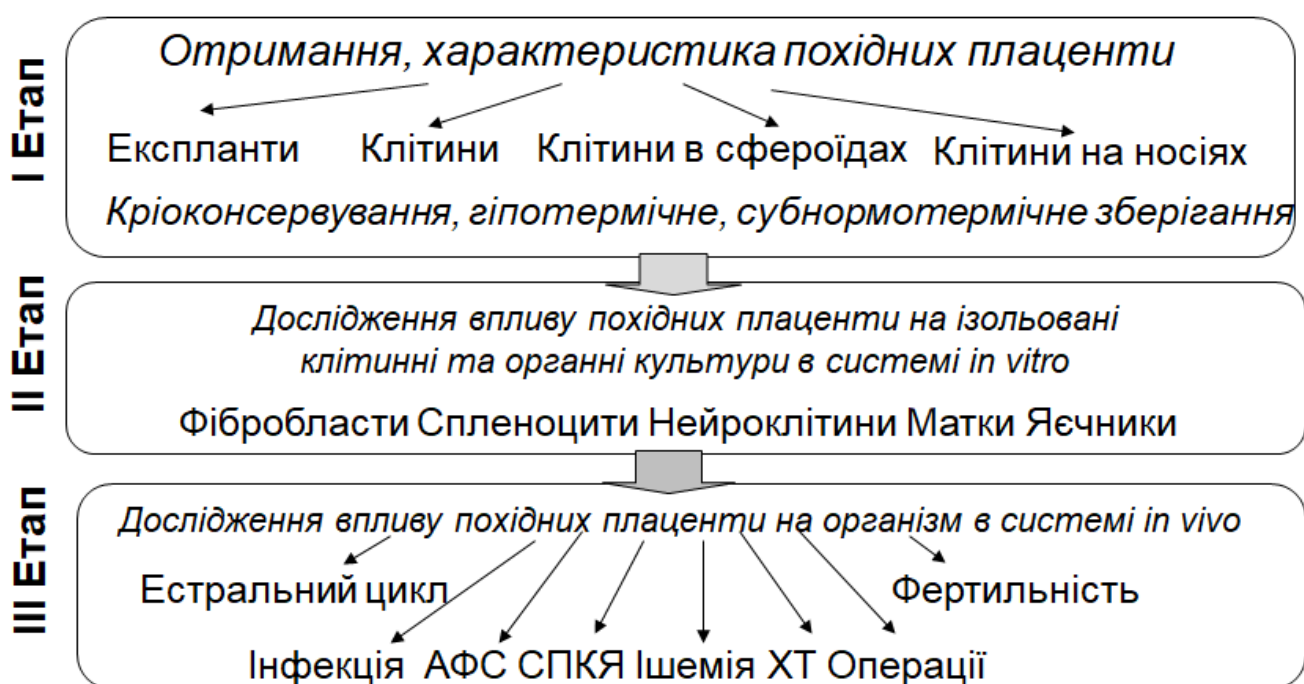


Рис.1. Дизайн дослідження.

На другому етапі дослідження оцінювали вплив нативних та кріоконсервованих похідних плаценти на ізолювані компоненти жіночої статеві системи та її регуляторні ланки *in vitro* для виключення їхнього взаємного впливу, дії регуляторних систем та компонентів сполучної тканини. Для дослідження були обрані культура нервових клітин, як елемент центральної регуляції, органотипові культури матки та яєчників, як основні органи мішені, спленоцити, як елемент імунної системи, культура клітин фібробластів для можливості вивчення дії на сполучну тканину органів. Культивування проводили зі середовищами, кондиційованими нативними та кріоконсервованими похідними плаценти. На основі отриманих на перших двох етапах даних формували біотехнологічні підходи щодо отримання, кріоконсервування, оцінки та вибору похідних плаценти для застосування для лікування гінекологічної патології.

На третьому етапі вивчали вплив похідних плаценти на перебіг експериментальної гінекологічної патології на моделях найбільш розповсюджених

та соціально значущих захворювань. На інтактних тваринах було досліджено вплив похідних плаценти на структуру їх оваріального циклу та фертильність. Було обрано моделі найбільш розповсюдженої та соціально значущої гінекологічної патології: інфекційний процес, аутоімунний процес (антифосфоліпідний синдром (АФС)), ендокринна патологія (на прикладі синдрому полікістозних яєчників (СПКЯ)), травма та ішемія (перекрути яєчників, операційна травма), передчасне виснаження яєчників (на прикладі хіміотерапії (ХТ)). На основі отриманих даних визначали загальні перспективи розробки біотехнологій отримання та застосування похідних плаценти при лікуванні гінекологічної патології.

Плаценти отримували з інформованої згоди жінок після операції кесарів розтин. Проведення експериментів було погоджено з комітетом з біоетики Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (протокол № 2 від 3.06.2013), відповідно до положень «Європейської Конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986).

Клітини отримували ферментативним методом (O. Parolini et al., 2008), експланти – методом фрагментації, сфероїди методом висячої краплі (R.A. Foty, 2011), альгінатні мікросфери – методом інкапсуляції з хлористим кальцієм (A.I. Pravdyuk et al., 2013). Для кріоконсервування застосовували двоетапні програми, на першому етапі охолодження проводили зі швидкістю 1град/хв до  $-80^{\circ}\text{C}$  у ізопропаноловому контейнері MrFrosty (Thermo Fisher, USA) чи за допомогою програмного заморожувача ЗП-10 (СКТБ ІПКіК НАН України), з подальшим зануренням у рідкий азот. У якості компонентів кріозахисних середовищ застосовували ДМСО, сахарозу, 1,2 – пропандіол, етіленгліколь, гліцерин, декстран (у формі Поліглюкіну), полівінілпіролідон (у формі Неогемодезу), гідроксиетилкрохмаль (у формі Стабізолу), сорбітол (у формі Реосорбілакту), середовище DMEM, сольові розчини, сироватку крові великої рогатої худоби. Використовували методи культивування, світлової, лазерної скануючої конфокальної мікроскопії, проточну цитометрію, кріомікроскопії, програмне заморожування, методи морфометрії, біохімічні методи (МТТ тест, тест відновлення резазурину, дослідження активності ферментів). У якості позитивного контролю використовували нативні похідні плаценти, у якості негативного – девіталізовані зануренням у рідкий азот.

Для досліджень у системі *in vitro* застосовували методи культивування клітин плаценти (O. Parolini et al., 2008), фібробластів (X. Luan et al., 2002), нейроклітин (A.N. Sukach et al., 2014), спленоцитів (O.B. Стефанов, 2001), органотипового культивування експлантів плаценти (R.K. Miller et al., 2005), маток та яєчників (Y. Yasuda et al., 1998). Глутаматну ексайтотоксичність моделювали за Kanno H, et al. 2014 з модифікаціями. Для оцінки впливу похідних плаценти на елементи статеві системи застосовували метод культивування в середовищах, кондіційованих біооб'єктами (J.A. Pawitan, 2014). Кондіційовані середовища, отримували, культивуючи похідні плаценти протягом доби в звичайній кількості середовища DMEM без додавання сироватки. Потім досліджувані об'єкти (фібробласти, нейроклітини, спленоцити, органотипові культури маток, яєчників)

культивували протягом доби в отриманих середовищах та проводили оцінку їх морфофункціональних характеристик.

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

Для обробки зображень застосовували програмне забезпечення TourView V. 3.7. (Hangzhou TourTek Photonics Co. Ltd, Hangzhou, China) та ImageJ V.1.48. (National Institutes of Health, USA). Для аналізу даних конфокальної мікроскопії додатково використовували Zeiss LSM Image Browser V. 4.2.0.121 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Germany). Для аналізу даних проточної цитометрії застосовували програмне забезпечення Flowing Software V.2.5.1. (University of Turku, Finland). Для статистичних розрахунків та обробки даних застосовували U критерій Мана-Уїтні, критерій Краскела-Уолліса, програмне забезпечення Past V. 3.15 (University of Oslo, Norway).

### **Результати власних досліджень**

#### **Вплив факторів низькотемпературного зберігання на похідні плаценти.**

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

При дослідженні суспензії клітин, після субнормотермічного зберігання (20°C) у середовищі культивування протягом доби відмічено, що клітини формують рихлі агрегати, розміром 50-200 мкм. Визначена можливість субнормотермічного зберігання клітин протягом 48 годин без значущої зміни показників їх збереженості, та протягом 72 годин з можливістю відновлення моношару. При гіпотермічному зберіганні (4°C) клітини не адгезують між собою,

та зберігаються до 24 годин, після чого відновлення культури неможливе (Табл. 1.).

Таблиця 1

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

Час зберігання	Кількість клітин x 10 <sup>5</sup>	% збереженості за трипановим синім	% адгезії	Формування моношару, діб
Контроль	2,1±0,2	95,3±8,6	95,2±6,5	1
Субнормотермічне зберігання (20°C)				
24 год	2,0±0,1	82,9±5,5	80,4±6,4	2
48 год	1,8±0,06	78,5±6,8	71,2±5,5	3
72 год	1,5±0,05*	69,3±5,4*	65,2±4,4*	4
96 год	1,2±0,03*	72,5±6,8*	60,5±5,8*	-
Гіпотермічне зберігання (4°C)				
24 год	0,9±0,01*	73,8±5,4*	51,2±3,5*	8
48 год	0,4±0,03*	50,5±5,6*	52,5±5,9*	-
72 год	0,2±0,02*	45,3±4,5*	50,2±4,3*	-

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

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

При дослідженні режимів кріоконсервування визначено, що при охолодженні шляхом прямого занурення у рідкий азот кількість клітин знижується, спостерігається загибель клітин. Визначено, що для збереження культури при кріоконсервуванні з 10% ДМСО в середовищі культивування необхідно проводити повільне охолодження до температури не вище -40°C, що дає можливість використовувати для кріоконсервування холодильну техніку, яка є на устаткуванні багатьох лікарень та лабораторій.

При повторному заморожуванні клітин плаценти було виявлено, що кількість клітин знижується вдвічі, життєздатність дорівнює 81,2±8,3% за даними забарвлення трипановим синім, та 36,3±3,8% при вивченні методом цитометрії з 7AAD. Активність за даними МТТ тесту становить 0,923±0,09, адгезували близько

50% клітин, моношар утворювався на 3-4-у добу.

Таблиця 2

**Збереженість клітин плаценти в суспензії після кріоконсервування з різними кріозахисними середовищами (M±m, n=10)**

Склад кріозахисного середовища	Кількість клітин x 10 <sup>5</sup> /мл	% збереженості за трипановим синім	7 AAD+, %	МТТ, Од ОЩ	% адгезованих клітин	Моношар, діб
Негативний контроль	5,5±0,4	5,2±3,7*	89,1±8,8	0,235±0,02	-	-
Позитивний контроль	6,0±0,5	96,4±6,8	8,3±6,5	0,783±0,05	92,2±5,6	2
10% ДМСО DMEM	5,8±0,4	95,2±3,8	16,5±0,9*	0,887±0,07	89,5±5,6	2
1,2 пропандіол 11,4% DMEM	6,0±0,7	94,7±5,6	20,3±2,1*	0,989±0,1	65,8±7,6*	3
Сахароза 6,8% +DMEM	5,7±0,3	58,4±3,6*	65,7±5,8*	0,546±0,04*	59,5±4,5*	5
Етиленгліколь 9,3% +DMEM	4,1±0,2*	85,6±7,8	18,6±3,0*	1,013±0,09*	66,5±5,4*	3
Гліцерин 13,8% +DMEM	5,8±0,3	83,4±5,7	45,9±3,6*	0,539±0,04*	42,5±3,8*	4
0,9% NaCl + 10% ДМСО	2,9±0,2*	75,2±6,5*	58,6±5,2*	0,497±0,03*	72,1±6,5*	6
10% ДМСО+ DMEM (без сироватки)	6,0±0,4	95,2±7,2	12,1±1,1	0,852±0,04	90,5±8,1	2
Сироватка +10% ДМСО	4,4±0,2*	83,4±4,3*	22,5±2,1*	0,823±0,05	81,5±5,6*	3
Розчин Хенкса +10% ДМСО	3,8±0,5*	82,3±6,4*	33,5±2,4*	0,668±0,02*	88,5±6,3	3
Розчин Рінгера + 10% ДМСО	3,2±0,2*	82,5±8,1*	34,9±3,5*	0,836±0,05	95,2±7,2*	3
Поліглюкін	4,1±0,4*	93,2±5,6	32,5±2,3*	0,658±0,05*	83,2±7,5*	3
Неогемодез	5,1±0,6*	91,2±9,5	28,2±3,5*	0,635±0,04*	84,5±7,6	3
Реосорбілакт	3,4±0,4*	17,2±1,2*	67,3±6,8*	0,325±0,02*	15,3±2,1*	8
Стабізол	1,5±0,2*	20,9±2,2*	65,5±5,4*	0,360±0,02*	29,2±2,1*	10

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

При кріомікроскопічному дослідженні суспензії клітин (рис. 2) виявлено, що зниження температури зі швидкістю 1 град/хв приводить до швидкого утворення великої кількості дрібних кристалів при -11°C розміром 1,4±0,12 мкм з

каналами між ними. При подальшому охолодженні кристали зливаються, канали звужуються максимально при  $-50^{\circ}\text{C}$  ...  $-60^{\circ}\text{C}$ , подальше охолодження не приводить до візуальних змін. Виявлено два типи кристалів: великі – в міжклітинному просторі та невеликі, розташовані навколо клітин. При температурі  $-100^{\circ}\text{C}$  в міжклітинному просторі спостерігаються великі кристали з довжиною  $11,8 \pm 2,4$  мкм і  $33,0 \pm 11,2$  мкм, а навколо клітин розташовуються дрібні –  $5,6 \pm 1,6$  мкм. При нагріванні зразка плавлення кристалів візуально спостерігається починаючи з  $-60^{\circ}\text{C}$ , та закінчується при температурі близько  $7^{\circ}\text{C}$  з явищами злиття крупних кристалів.

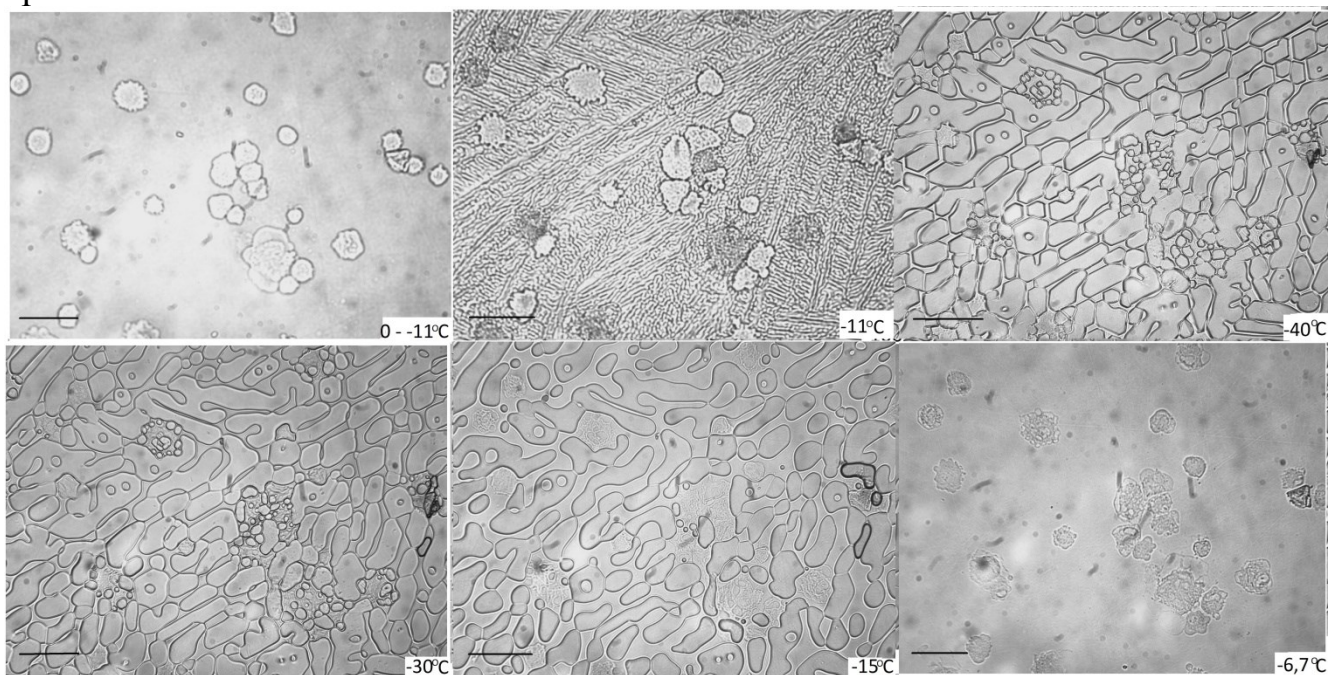


Рис. 2. Суспензія клітин плаценти при кріоконсервуванні, кріомікроскопічне дослідження. Верхній рядок – охолодження, нижній рядок – відігрів. Температура позначена на кожному рисунку в  $^{\circ}\text{C}$ . Масштабна лінійка 50 мкм.

При дослідженні впливу коливань температури в кріосховищах, які спостерігаються при довгостроковому зберіганні, на клітини плаценти визначено наступне. При коливанні температур у межах  $-196^{\circ}\text{C}$  -  $-80^{\circ}\text{C}$  кількість клітин вірогідно знижується після 50 циклів коливань, збереженість за трипановим синім – після 20 циклів, збереженість за пропідієм йодидом – після 10 циклів, показники МТТ тесту знижуються після 5 циклів. При коливанні температур в межах  $-196^{\circ}\text{C}$  -  $-100^{\circ}\text{C}$  кількість клітин вірогідно знижується після 50 циклів коливань, збереженість за трипановим синім – після 40 циклів, збереженість за пропідієм йодидом – після 30 циклів, показники МТТ тесту - після 40 циклів. При коливанні температур в межах  $-196^{\circ}\text{C}$  -  $-150^{\circ}\text{C}$  кількість клітин вірогідно знижується після 50 циклів коливань, збереженість за трипановим синім – після 40 циклів, збереженість за пропідієм йодидом – після 40 циклів, показники МТТ тесту не знижуються. Суттєві апоптотичні зміни, виявлені методом проточної цитометрії за експресією *Apexin V* на поверхні клітин характерні для коливань в межах  $-80^{\circ}\text{C}$ , -  $100^{\circ}\text{C}$ , але не  $-150^{\circ}\text{C}$ .

*Експланти плаценти* являють собою відокремлені ворсини. Вони є перспективним об'єктом для кріоконсервування, субнормотермічного та

гіпотермічного зберігання, оскільки пристосовані до існування у рідкому середовищі, мають невеликі розміри, що дозволяє проводити органотипове культивування без явищ центрального некрозу, рихлу мезенхіму (сполучну тканину) та вкриті шаром трофобласту, що робить їх проникними для кріопротектора та менш чутливими до формування кристалів льоду.

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

Таблиця 3

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

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

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

При кріоконсервуванні експлантів плаценти в середовищі DMEM з 10% ДМСО за двоетапною програмою (повільно до -80°C з наступним зануренням у рідкий азот) визначено, що типовими ушкодженнями є розриви мезенхіми та десквамація трофобласту, які візуалізуються при забарвленні гематоксилін-еозином, а при забарвленні трипановим синім виявляються затікання барвника в середину ворсин. При забарвленні fluoriscine diacetate/etidium bromide (FDA/EB) лише окремі клітини накопичують EB, більшість препарату забарвлена FDA. Зразки, безпосередньо занурені у рідкий азот набувають ознак руйнації (рис. 2). Біохімічні показники в деконсервованих зразках мало відрізняються від показників в нативних експлантах (табл. 3.).

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

чинником ушкодження експлантів плаценти (рис. 4).

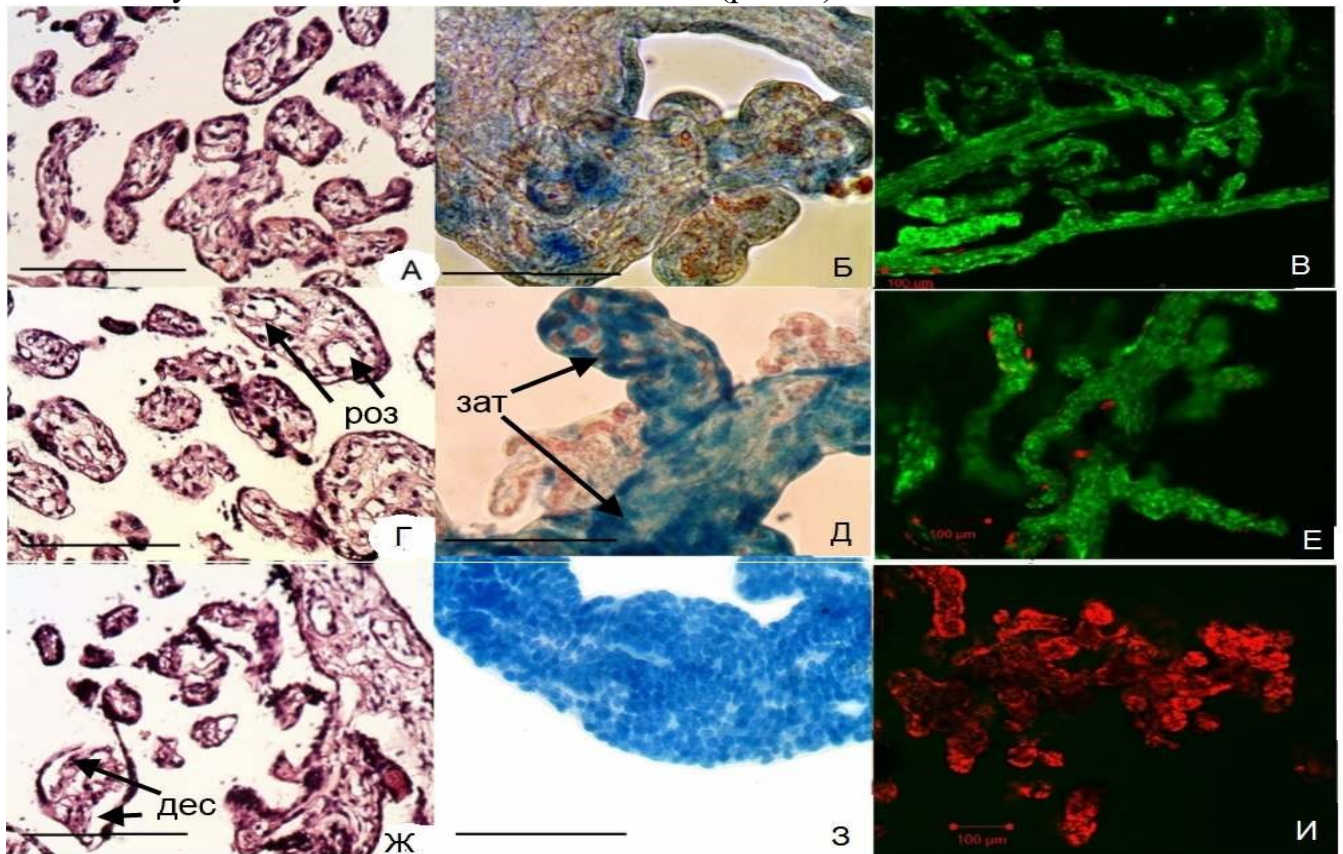


Рис. 3. Експланти плаценти. А, Б, В – нативні, Г, Д, Е – після кріоконсервування, Ж, З, И – негативний контроль, після занурення у рідкий азот. А, Г, Ж – забарвлення гематоксилін-еозином, зрізи, світлова мікроскопія, Б, Д, З – забарвлення трипановим синім, нативний препарат, світлова мікроскопія, В,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

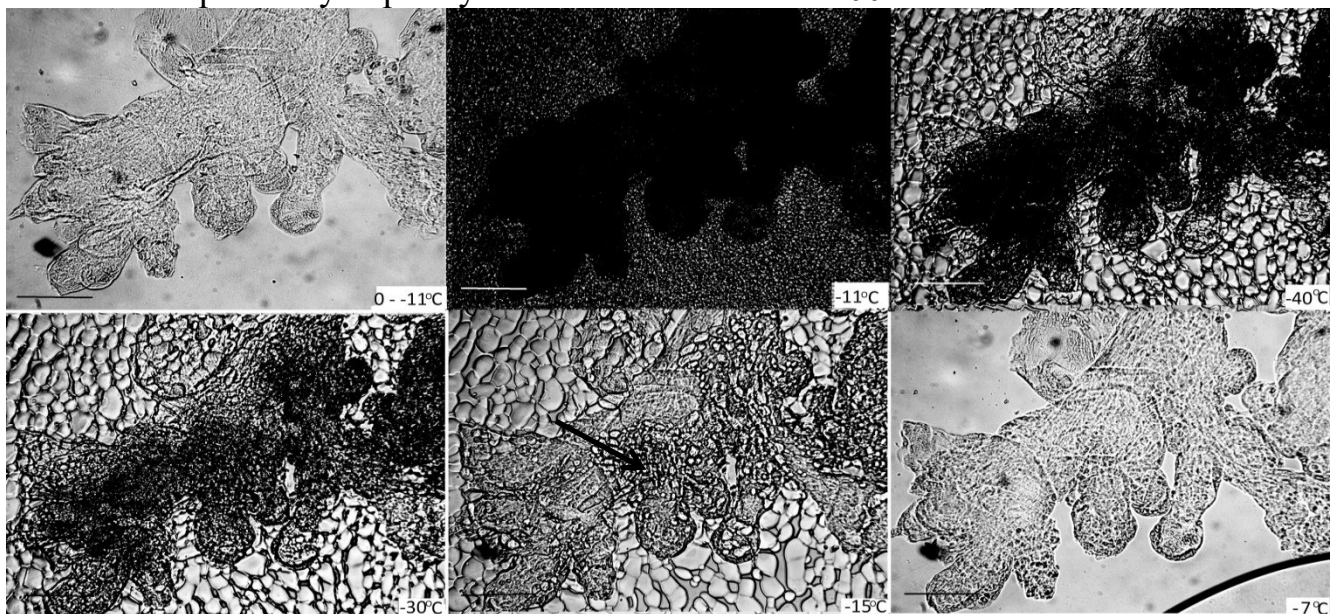


Рис. 4. Експланти плаценти при кріоконсервуванні, кріомікроскопічне дослідження. Верхній рядок – охолодження, нижній – відігрів. Температура позначена на кожному рисунку в °С. Стрілка – збільшенні кристали льоду.



Масштабна лінійка 50 мкм.

При отриманні сфероїдів методом висячої краплі з  $1 \times 10^6$  клітин отримано  $825,3 \pm 56,2$  сфероїдів розміром 50-150 мкм та  $62,3 \pm 5,1$  сфероїдів розміром 150-300 мкм, сферичної форми (рис. 5, А) які не забарвлюються трипановим синім. Сфероїди мають здатність адгезувати до пластику та формувати моношар, механічно руйнуються при повторних процедурах відмивання з центрифугуванням.

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

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

При проведенні кріомікроскопічного дослідження (рис. 6) найбільше ушкодження спостерігається під час розморожування, зростання кристалів при рекристалізації відбувається при  $-20 - -15^\circ\text{C}$ . Після розморожування структура сфероїдів значно змінюється, спостерігається деформація клітин, розриви мембран та підвищення гранулярності окремих клітин, особливо на поверхні сфероїдів. Ці поверхні клітини частіше гинуть за даними конфокальної мікроскопії. Клітини в середині сфероїдів залишаються збереженими.

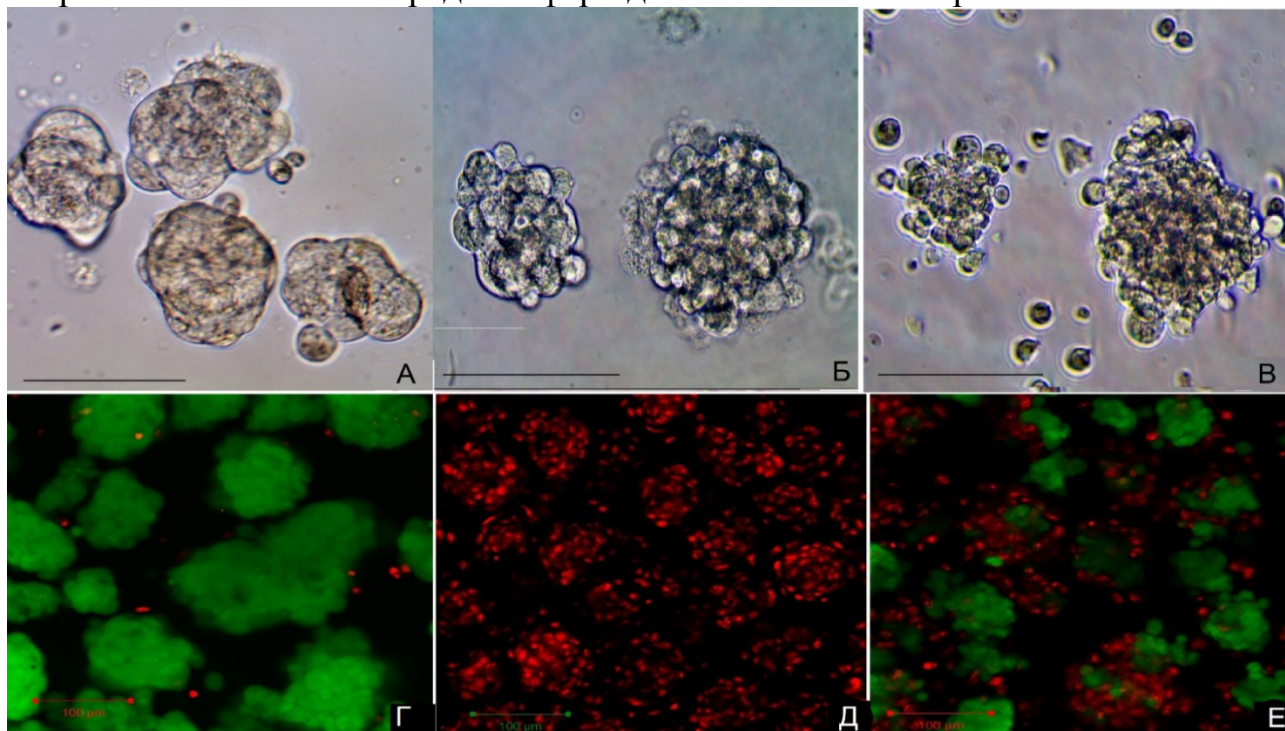


Рис. 5. Сфероїди з клітин плаценти. А, Г – після отримання методом висячої краплі, Б – після субнормотермічного зберігання, В, Е – після кріоконсервування, Д – негативний контроль. А - В – світлова мікроскопія, фазовий контраст, Г - Е –

конфокальна мікроскопія, забарвлення FDA/EB. Масштабні лінійки 100 мкм.

Таблиця 4

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

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

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

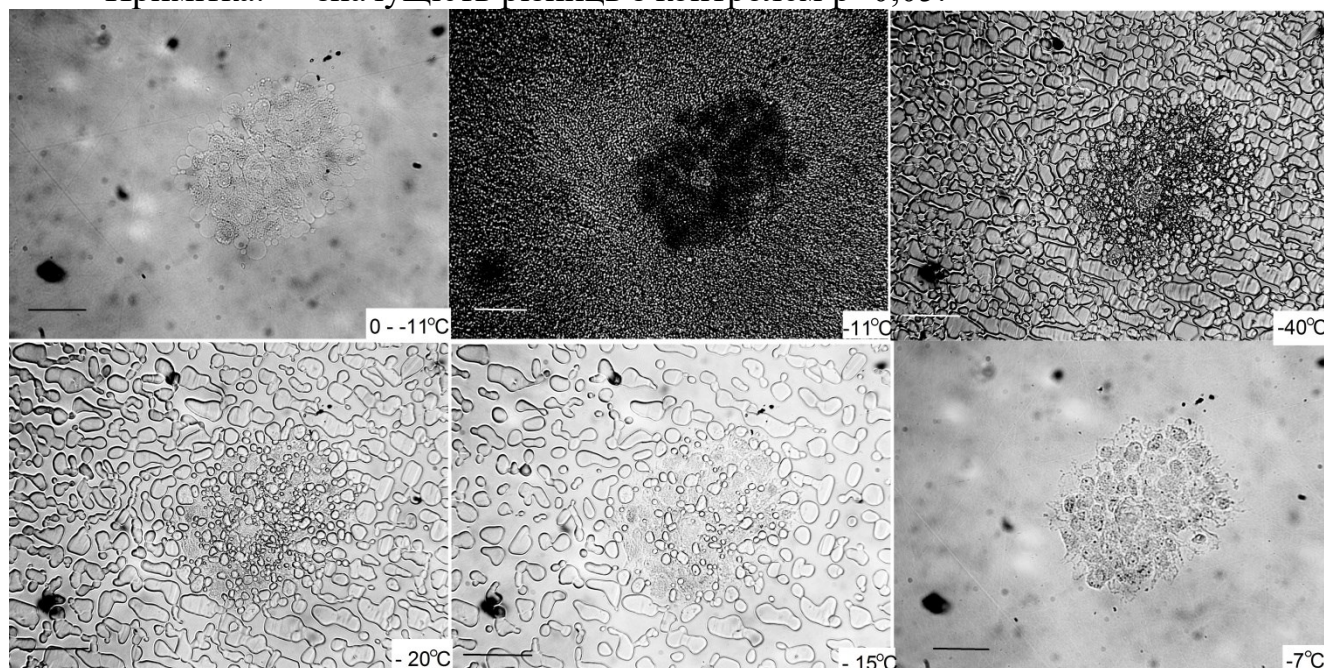


Рис. 6. Сфероїди з клітин плаценти при кріоконсервуванні, кріомікроскопічне дослідження. Верхній рядок – охолодження, нижній – відігрів. Температура позначена на кожному рисунку в °C. Масштабна лінійка 50 мкм.

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

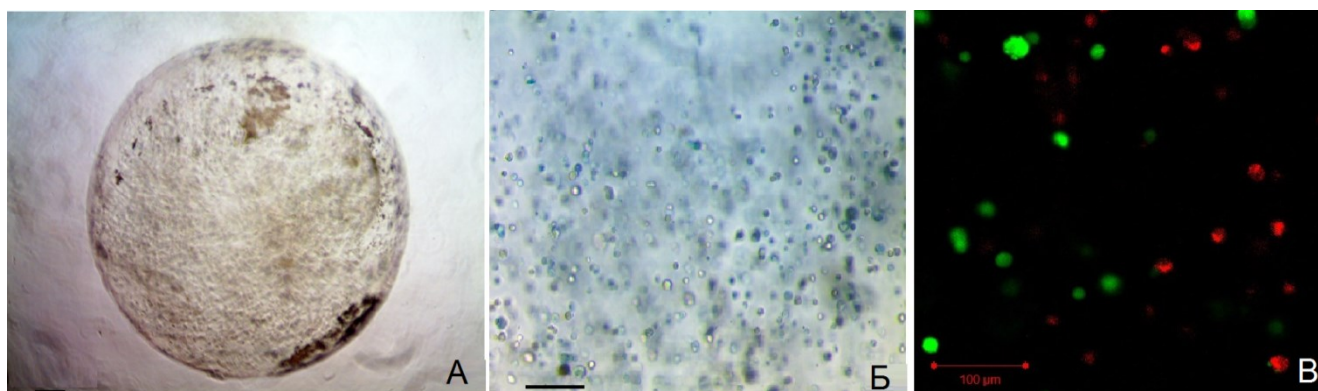


Рис. 7. Клітини плаценти в альгінатних мікросферах. А, В – світлова мікроскопія, С – конфокальна мікроскопія з забарвленням FDA/EB. Масштабні лінійки 100 мкм.

При субнормотермічному зберіганні за даними тесту відновлення резазурину та тесту споживання глюкози клітини плаценти, інкапсульовані в альгінатні мікросфери залишаються збереженими протягом 48 годин, а після 72 годин споживання глюкози та метаболічна активність різко знижуються. При гіпотермічному зберіганні ці показники не відрізняються від контролю до 24 годин (табл. 5).

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

Таблиця 5

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

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

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

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

Таким чином різні похідні плаценти можуть бути отримані та збережені в ході єдиного послідовного біотехнологічного процесу з наступним збереженням для подальшого застосування (рис. 9.). Враховуючи отримані данні, щодо стабільності морфофункціональних характеристик та можливості ефективного низькотемпературного зберігання для подальшого дослідження були обрані суспензії клітин та експланти, як найбільш перспективні для застосування у медичній практиці.

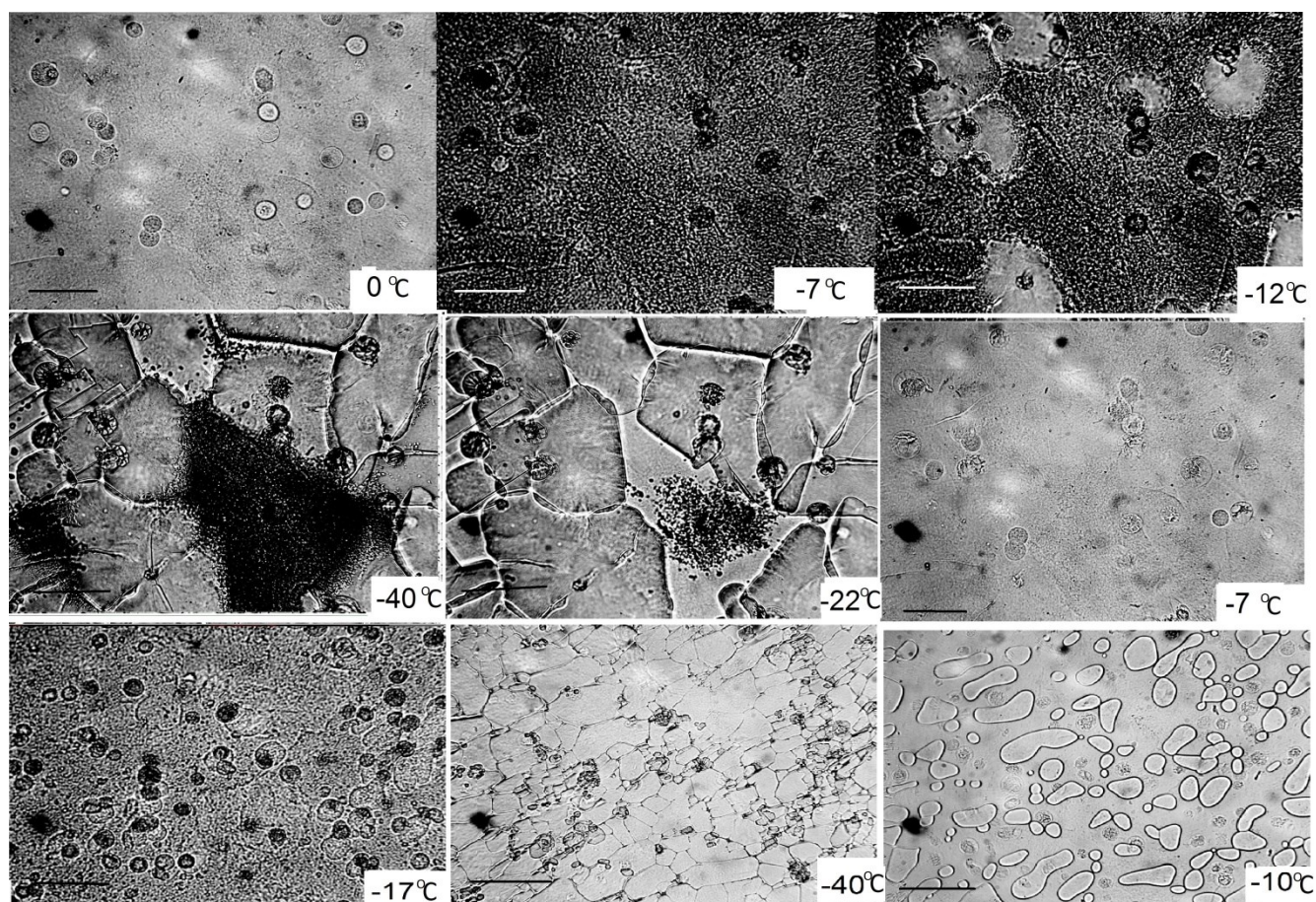


Рис. 8. Клітини плаценти в альгінаті при кріоконсервуванні, кріомікроскопічне дослідження. Верхній рядок – охолодження, середній – відігрів (середовище з ДМСО), нижній – кріоконсервування без ДМСО. Температура позначена на кожному рисунку в °С. Масштабна лінійка 50 мкм.



Рис. 9. Загальна схема біотехнологічного процесу отримання та зберігання похідних плаценти.

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

При дослідженні впливу середовищ, кондиційованих нативними та кріоконсервованими похідними плаценти на культуру фібробластів миші виявлено, що середовища, кондиційовані нативними клітинами плаценти (КП), кріоконсервованими клітинами плаценти (ККП), нативними експлантатами плаценти (ЕП), кріоконсервованими експлантатами плаценти (КЕП) не впливають на проліферативну активність (рис. 10, А) та не змінюють показники МТТ тесту (рис. 10, Б).

При культивуванні спленоцитів з середовищами, кондиційованими КП, ККП, ЕП, КЕП виявлено, що всі досліджувані об'єкти знижують їхню метаболічну активність (рис. 11, А). При цьому, дія КЕП більш виражена, ніж нативних. При постановці реакції бласттрансформації лімфоцитів (РБТЛ) виявлено зниження трансформації клітин в бластні форми після дії середовищ, кондиційованих похідними плаценти (рис. 11, Б).

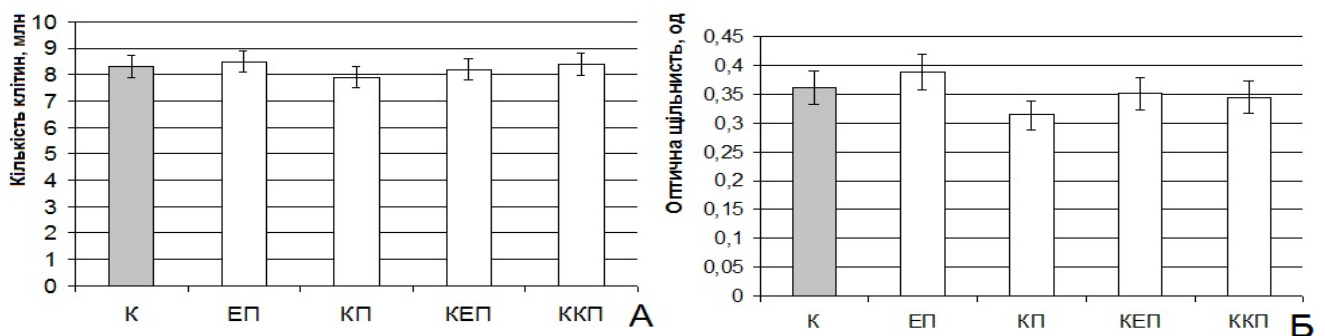


Рис. 10. Показники функціональної активності фібробластів при культивуванні з середовищами, кондиційованими похідними плаценти: А – кількість клітин, Б – МТТ тест. n=24. К – контроль.

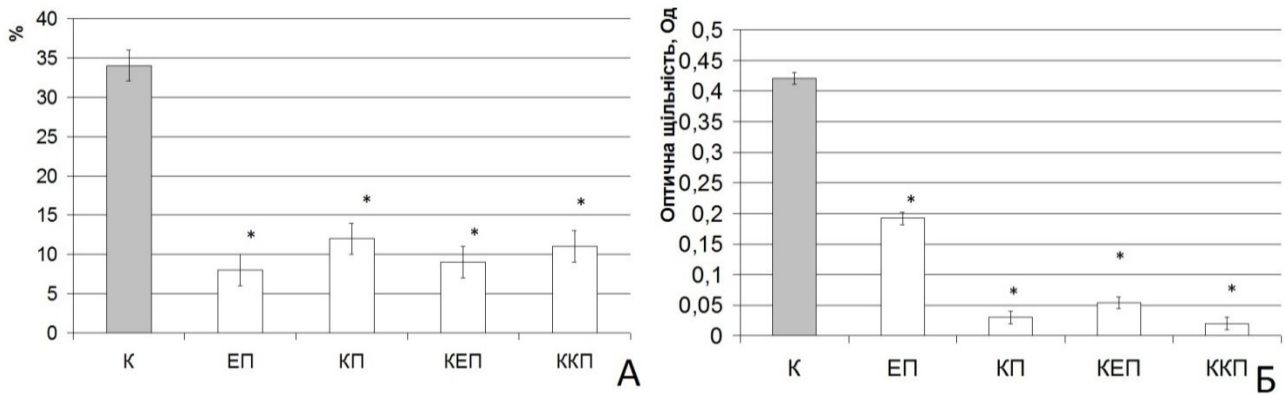


Рис. 11. Показники функціональної активності спленоцитів при культивуванні в середовищах, кондиційованих похідними плаценти: А – РБТЛ, Б - МТТ тест. К – контроль. n =24. \*- значущість різниці з контролем  $p < 0,05$ .

При вивченні впливу середовищ, кондиційованих КП та ККП на *нейроклітини* продемонстровано підвищення показників МТТ тесту (рис. 12, А). Нейропротекторний ефект обох типів середовищ доведено в моделі глутаматної ексайтотоксичності. При цьому нейропротекторна активність середовищ вище за умов їхнього застосування до ураження нейроклітин глутаматом (рис. 12, Б, В).

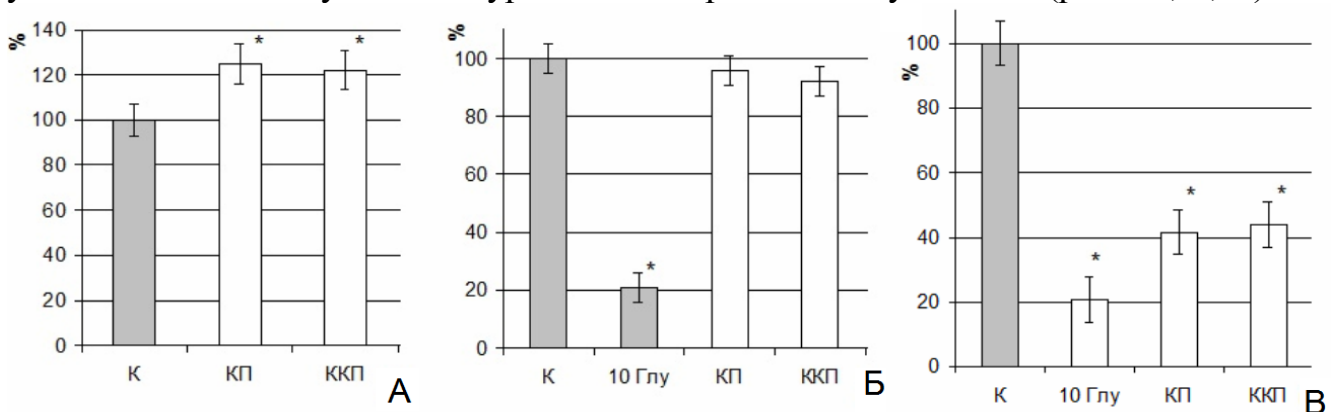


Рис. 12. Показники МТТ тесту нейроклітин при культивуванні зі середовищами, кондиційованими з клітинами плаценти. А – без дії глутамату, Б – до дії глутамату, В – після дії глутамату. К – контроль, 10Глу – додавання 10 мМоль глутамату. n=24. \*- значущість різниці з позитивним контролем  $p < 0,05$ .

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

КП та ККП.

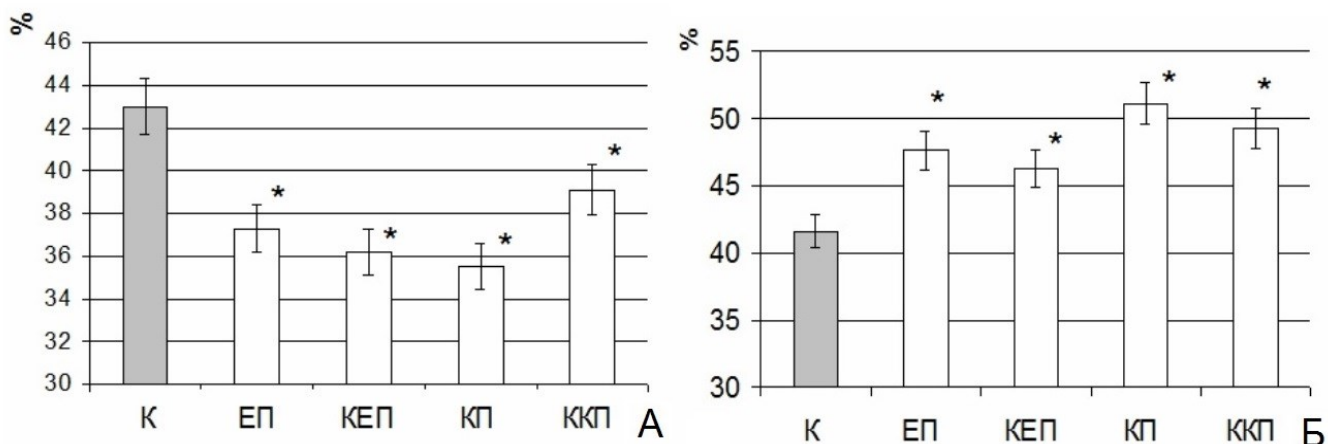


Рис. 13. Показники метаболічної активності яєчників (А) та маток (Б) мишей за даними тесту відновлення резазурину після культивування з середовищами, кондиційованими похідними плаценти. n=6. К – контроль, \*- вірогідність різниць з позитивним контролем  $p < 0,05$ .

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

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

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

Після порівняння різних похідних плаценти, враховуючи встановлену високу біологічну активність кріоконсервованих експлантів плаценти в системі *in vitro*, можливість їхнього отримання без застосування складних технологій, наявність у них всіх складових плаценти, високу збереженість при кріоконсервуванні їх було обрано для подальших експериментальних досліджень *in vivo* (табл. 6).

Таблиця 6

### Порівняння похідних плаценти для використання в лікуванні гінекологічної патології.

	Експланти плаценти	Клітини плаценти в суспензії	Клітини плаценти в альгінатних носіях	Клітини плаценти в сфероїдах
1	2	3	4	5

1	2	3	4	5
Склад	МСК, трофобласт, судини	МСК	МСК, альгінат	МСК
Отримання	Фрагментація	Фрагментація, ензиматична дезагрегація	Фрагментація, ензиматична дезагрегація, краплеве желювання в альгінаті з кальцієм	Фрагментація, ензиматична дезагрегація, культивування методом висячої краплі
Культивування	В суспензії короткочасне	Тривале моношарове культивування	В суспензії короткочасне	В суспензії короткочасне, можлива адгезія чи порушення
Біодеградація	Повна	Повна	Часткова	Повна
Субнормотермічне зберігання	До 48 годин	До 48 годин	До 48 годин	До 24 годин
Кріоконсервування	Ефективне, 90% збереженості	Ефективне, 90% збереженості	Неефективне, 70% збереженості	Неефективне, 50% збереженості
Вплив на фібробласти <i>in vitro</i>	Нейтральний	Нейтральний	Не досліджено через нестабільність та складнощі застосування через неможливість довготривалого зберігання	
Вплив на нейроклітини <i>in vitro</i>	Стимулюючий	Стимулюючий		
Вплив на спленоцити <i>in vitro</i>	Пригнічуючий	Пригнічуючий		
Вплив на матки <i>in vitro</i>	Стимулюючий	Стимулюючий		
Вплив на яєчники <i>in vitro</i>	Пригнічуючий	Пригнічуючий		

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

При дослідженні впливу КЕП на статеву систему та фертильність здорових самиць виявлено, що вони не змінюють структуру естрального циклу, призводять до гіпертрофії ендометрію, збільшення кількості маткових залоз, тимчасового зменшення кількості зростаючих фолікулів в яєчниках з наступною їх гіпертрофією. Виявлені ефекти співпадають з даними отриманими на органотипових культурах маток та яєчників. При дослідженні репродуктивних показників встановлено подовження часу від початку спарювання до настання вагітності та пологів при застосуванні КЕП, що можна пояснити затримкою овуляції (табл. 7).



Таблиця 7

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

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

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

Після моделювання інфекційного процесу у лабораторних тварин встановлено, що у групі з застосуванням КЕП кількість тварин, які завагітніли, значно менша, ніж у контрольній групі та групі тварин з запаленням без КЕП. Вагітність після лікування настає пізніше, кількість плодів значно менша, маса плодів не змінена (табл. 8).

Таблиця 8

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

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

Примітка: \* - різниця статистично значуща у порівнянні з хибнооперованими, \*\* - різниця статистично значуща у порівнянні групою з запаленням без КЕП,  $p < 0,05$ .

Після закінчення експерименту під час аутопсії виявлено поодинокі спайки I – II ступенів у хибнооперованих тварин. У мишей групи з запаленням без лікування, спайки спостерігаються практично в усіх випадках. У тварин групи з запаленням та введення КЕП важкість спайкового процесу вища, часто з включенням у конгломерат яєчників та матки (табл. 7). У трьох тварин виявлено міжпетлеві абсцеси, септичні явища. Ці ознаки свідчать про загострення та пролонгування інфекційного процесу у тварин після введення КЕП, що може бути пояснено ефектом імуносупресії, характерною для вагітності та корелює з даними, отриманими на суспензії спленоцитів.

При порівнянні груп тварин з АФС виявлено, що у мишей без лікування спостерігається підвищення швидкості згортання крові, тромбоцитопенія та

підвищення показників РБТЛ. Застосування КЕП приводить до зниження швидкості згортання крові та РБТЛ до рівня інтактних тварин. При цьому залишається тромбоцитопенія, але кількість тромбоцитів значно вища, ніж у тварин з АФС без лікування (табл. 9). При гістологічному дослідженні репродуктивних органів виявлена різка гіпертрофія матки та деяка гіпертрофія яєчників у тварин з КЕП.

Під час дослідження репродуктивних показників виявлено, що у тварин з АФС значно зменшені маса і кількість плодів, підвищена кількість резорбцій та мертвих плодів, маса плаценти вірогідно не змінена. Після застосування КЕП у тварин із АФС вдалося досягти значного підвищення кількості живих плодів, резорбцій не виявлено, але залишалися самиці з мертвими плодами, маса плодів знижена (табл. 10). Таким чином, КЕП покращує перебіг АФС при вагітності, але не можуть бути застосовані у якості монотерапії.

Таблиця 9

**Лабораторні та репродуктивні показники експериментальних тварин (M±m, n=10 у кожній групі)**

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

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

Після моделювання СПКЯ у щурів спостерігається різке збільшення яєчників за рахунок кіст, зменшення маток без стоншення їхніх шарів (за рахунок розширення порожнини маток), матковий коефіцієнт не змінювався. Жодна нелікована тварина не завагітніла (табл. 10). У тварин, яким проводили терапію КЕП через місяць реєстрували регулярні зміни естрального циклу, 40% тварин завагітніло, час до пологів подовжувався, кількість плодів зменшувалася. При морфологічному аналізі репродуктивних органів виявлено збільшення матки, але масові коефіцієнти не відрізнялися від контрольної групи, спостерігали поодинокі кісти у яєчниках, масові коефіцієнти яких наближені до норми.

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

Група тварин	Масовий коефіцієнт яєчників	Масовий коефіцієнт матки	Регулярний цикл через місяць, %	Кількість вагітних тварин, %	Час до пологів, доба	Кількість плодів
СПКЯ+КЕП	0,045 ±0,003	0,28±0,05	90	40	32,8 ±2,3*	3,2 ±0,2*
СПКЯ	0,078 ±0,008*	0,24±0,08	50	0	-	-
Інтактні тварини	0,042 ±0,005	0,23±0,04	100	90	25,3 ±0,3	7,2 ±0,7*

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

При моделюванні ішемічного ураження (перекруту) яєчників на момент повторної лапаротомії через 4 години після моделювання перекруту у тварин виявляються крововиливи у яєчники та матку. Яєчники збільшені за рахунок крововиливів до 10–15 мм в діаметрі. При гістологічному дослідженні виявлено масивні крововиливи у паренхімі, фолікулах, жовтих тілах та воротах яєчника. У матці - крововиливи у внутрішніх шарах, ближче до ендометрію. Під час повторного дослідження після лікування перекруту без КЕП, наприкінці експерименту, яєчники та матка не мали слідів крововиливів, але на місці перекруту різко зменшена кількість жовтих тіл, місць імплантації та живих плодів (табл. 11).

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

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

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

Середня маса плацент та плодів не відрізнялася від контрольних показників. Спайки спостерігали рідко. У самиць з перекрутом та КЕП кількість жовтих тіл, живих плодів, місць імплантації, а також маса плодів та плаценти не відрізняється від хибно оперованих, але кількість спайок у черевній порожнині є збільшеною.

При моделюванні *передчасного виснаження яєчників* внаслідок хіміотерапії

протягом 2-х тижнів вага тварин всіх груп різко знижується. У групі без лікування миші відновлювали вагу до групи інтактних протягом 8 тижнів. Тварини, яким вводили КЕП відновлювали вагу на 5 тижднів після хіміотерапії (рис. 14, А). Циклічність естрального циклу та статеві активність тварин, які отримували КЕП також покращувались (рис. 14, Б, В).

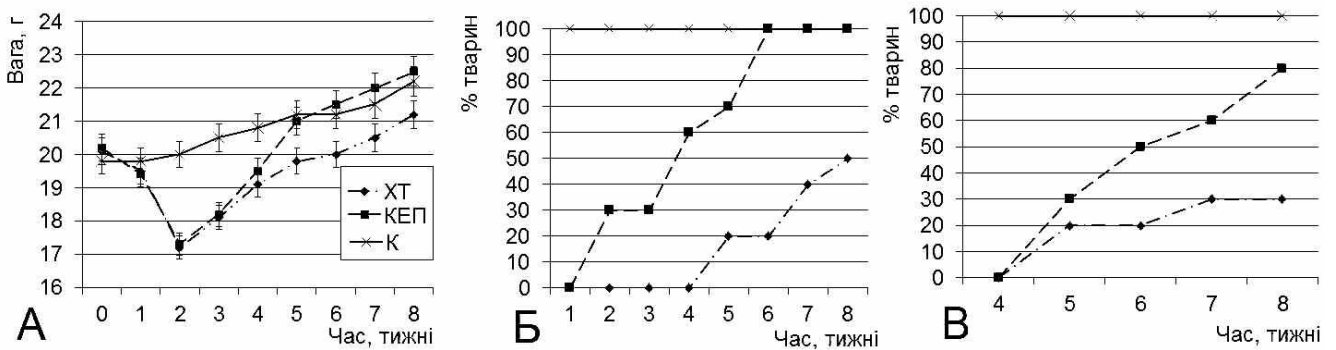


Рис. 14. Вага тварин (А), наявність естрального циклу (Б), статеві активність (В). ХТ – група після хіміотерапії без лікування. КЕП - група після хіміотерапії та введення КЕП. К – контроль.  $n=10$ . Примітка:\* – різниця статистично значуща у порівнянні з тваринами без хіміотерапії,  $p < 0,05$ .

При морфологічному дослідженні внутрішніх органів тварин одразу після хіміотерапії спостерігали різку атрофію яєчників (рис. 15, А) та маток (рис. 15, Б), набряк нирок, печінки.

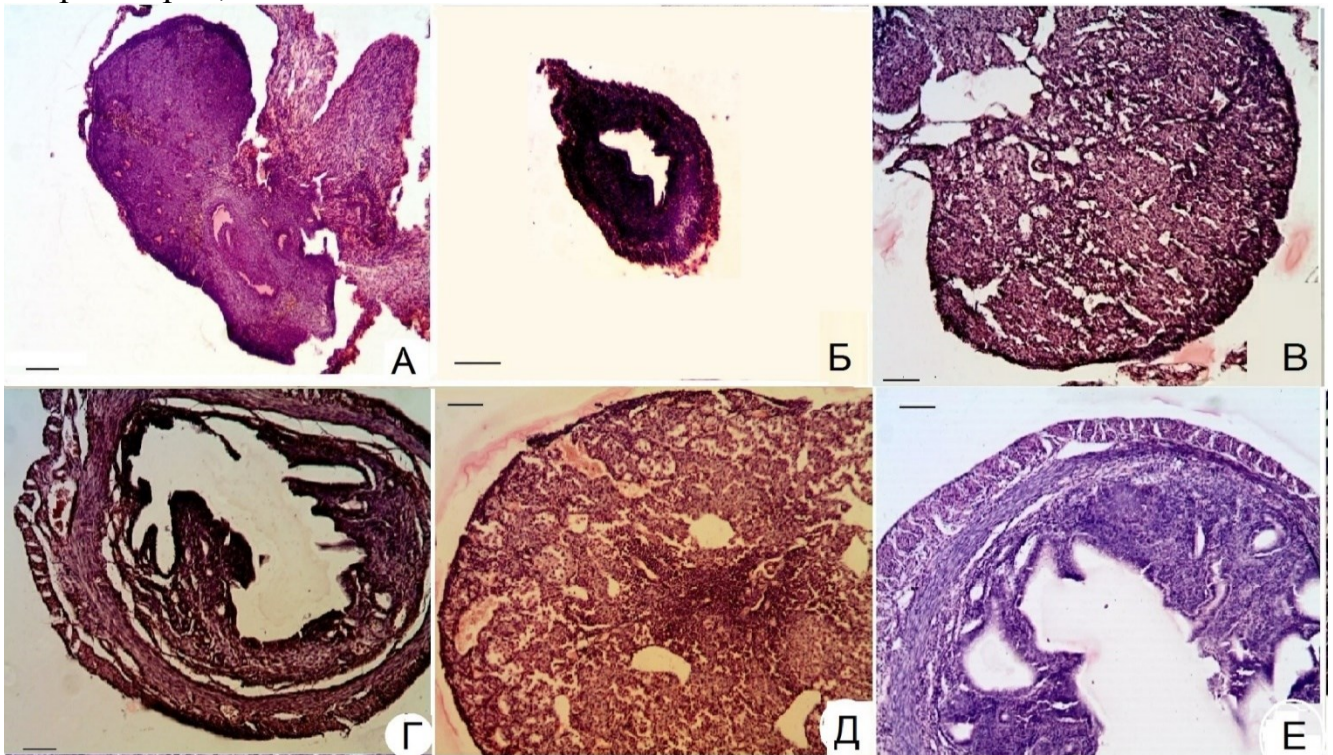


Рис. 15. Структура яєчників та маток тварин. А, Б – через тиждень після хіміотерапії без лікування, В, Г – через 12 тижнів після хіміотерапії без лікування, Д, Е – лікування КЕП через 12 тижнів. Забарвлення гематоксилін-еозин. Масштабні лінійка 100 мкм.

Через 12 тижнів у тварин після хіміотерапії без лікування спостерігали збільшення кількості жирової тканини, зменшення розмірів яєчників з загибеллю яйцеклітин та відсутністю фолікулів та жовтих тіл (рис. 15, В), атрофію маток

(рис. 15, Г), відновлення структури нирок та залишки циротичних змін в печінці. У тварин, яких лікували за допомогою КЕП яєчники збільшені у порівнянні з нелікованими тваринами, але яйцеклітини, фолікули та жовті тіла не відновлені, спостерігали окремі округлі утворення, можливо на місці фолікулів (рис. 15, Д), матка цих тварин мало відрізнялась від здорових (рис. 15, Е), нирки та печінка були збережені.

При дослідженні тривалості життя тварин виявлено підвищення ряду показників після застосування КЕП. Так, в групі інтактних тварин середня тривалість життя тварин складала ( $21,16 \pm 0,05$ ) місяців, медіана виживаності – 21, 80% виживаність – 18 місяців, максимальна виживаність – 30 місяців. У групі тварин з ХТ середня тривалість життя тварин складала ( $10,2 \pm 0,09$ ) місяців, медіана виживаності – 10, 80%, виживаність – 6 місяців, максимальна виживаність – 19 місяців. У групі тварин з ХТ та КЕП середня тривалість життя самиць мишей складала ( $15,6 \pm 0,06$ ) місяців, медіана виживаності – 18, 80%, виживаність – 10 місяців, максимальна виживаність – 24 місяці.

При моделюванні операційної травми матки з наступним її ушиванням виявлено, що в групах, які були проліковані з застосуванням КЕП формується більш повноцінний рубець на матці (рис. 16, А), практично не знижена кількість плодів в оперованій половині, але дещо збільшена кількість спайок. При лікуванні без похідних плаценти зміни в матці мають фіброзний характер (рис. 16, Б). У тварин в групах з використанням КЕП збільшена кількість жовтих тіл, що дещо компенсує репродуктивні втрати внаслідок травми та спайкоутворення. Це свідчить про необхідність профілактики спайкоутворення при застосуванні КЕП за умов оперативного втручання.

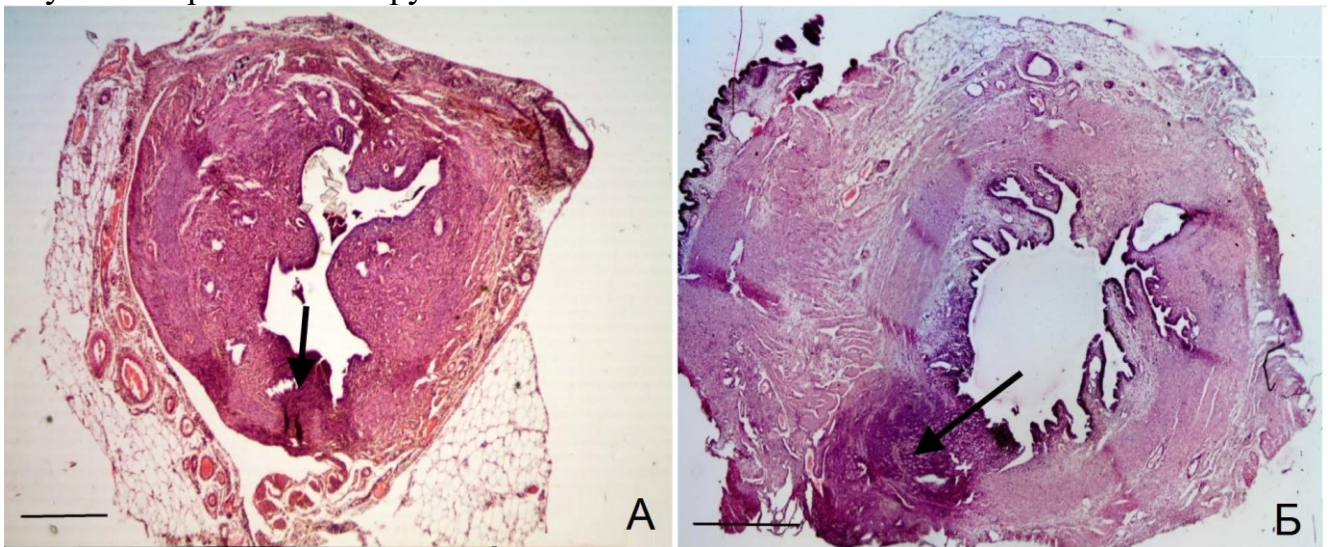


Рис. 16. Мікроскопічна оцінка відновлення оперованих рогів матки. А – повноцінний рубець у тварини після КЕП, Б – фіброзний рубець без лікування похідними плаценти. Стрілками позначені місця операції. Забарвлення гематоксилін-еозином. Масштабні лінійки 100 мкм.

Таким чином, експериментально доведено, що кріоконсервовані експланти плаценти не чинять негативного впливу на репродуктивну систему здорових тварин, призводять до деякої гіпертрофії матки, яєчників, можуть вести до

підвищеного спайкоутворення при гострому інфекційному процесі та операційній травмі, покращують перебіг синдрому полікістозних яєчників, синдрому передчасного виснаження яєчників, антифосфоліпідного синдрому, ішемічного ураження яєчника.

## ВИСНОВКИ

Дисертаційна робота містить теоретичне обґрунтування та експериментальне вирішення біотехнологічних проблем отримання, низькотемпературного зберігання похідних плаценти, їх ефективного диференційованого застосування при лікуванні експериментальної гінекологічної патології. На основі теоретичного обґрунтування, проведених досліджень та отриманих результатів сформульовані наступні висновки:

1. Отримані похідні плаценти, що можуть бути застосовані в медичній практиці. Встановлено, що експланти, клітини плаценти в суспензії та в альгінатних мікросферах зберігають структуру, життєздатність та метаболічні характеристики при культивуванні. Сфероїди, отримані з клітин плаценти є нестійкими, мають тенденцію до руйнування та адгезії. Клітини, виділені з ворсин плаценти, плідних оболонок мають характеристики МСК (імунофенотип CD90+, CD73+, CD105+, CD34-, здатні до індукованого диференціювання в адипогенному, хондрогенному та остеогенному напрямках).
2. Встановлено, що для скринінгової оцінки збереженості клітин плаценти ефективними є МТТ тест, забарвлення трипановим синім, тест споживання глюкози з середовища. Для оцінки збереженості багатоклітинних структур доцільно застосовувати тест відновлення резазурину, тест споживання глюкози з середовища, забарвлення FDA/EB.
3. Виявлено, що при субнормотермічних умовах (20°C) експланти, клітини плаценти в суспензії та в альгінатних мікросферах зберігають структуру, життєздатність та метаболічні характеристики 48 годин, сфероїди - 24 години. При зниженні температури до гіпотермічних умов (4°C) термін збереження знижується до 24 годин для всіх похідних плаценти.
4. На основі отриманих даних розроблено біотехнологічні підходи до зберігання різних похідних плаценти (експлантів, клітин в суспензії, сфероїдах та альгінатних сферах), протягом 24-48 годин без додаткового обладнання, що є достатнім для транспортування між клінічним закладом та біотехнологічною лабораторією. Клітини доцільно зберігати в середовищі культивування DMEM з антибіотиком при субнормотермічних умовах у концентрації  $1 \times 10^5$  /мл, а експланти в концентрації 0,1 г на 1 мл.
5. Механізмами кріоушкоджень для експлантів плаценти є розриви сполучної тканини та десквамація трофобласту внаслідок росту кристалів. Для сфероїдів з клітин плаценти характерне пошкодження кристалами міжклітинних зав'язків та загибель клітин по периферії сфероїдів. В альгінатних гранулах з клітинами плаценти кристалоутворення є нерівномірним через взаємодію кріопротектора з альгінатом. Максимальна збереженість клітин плаценти забезпечується кріопротекторами диметилсульфоксид, пропандіол та етиленгліколь. Застосування сахарози, гліцерину знижує збереженість клітин

до 70%. Заміна середовища DMEM сольовими розчинами NaCl, Рінгера чи Хенкса зменшує збереженість клітин після кріоконсервування. Наявність сироватки не впливає на кріозахисні властивості середовищ. Ефективним режимом є охолодження зі швидкістю 1°C/хв до -40°C, або нижче, з наступним зануренням у рідкий азот. Повторне заморожування клітин плаценти без рекультивування призводить до втрати близько 50% клітин. При коливанні температури в кріосховищі в межах -196°C ... -100°C до 20 разів збереженість клітин плаценти залишається незмінною. При більшій кількості коливань, або коливаннях температури до -80°C збереженість клітин різко знижується.

6. Для ефективного кріоконсервування похідних плаценти доцільно застосовувати повільне охолодження зі швидкістю 1 град/хв, до -40°C з наступним зануренням у рідкий азот під захистом 10% диметилсульфоксиду на середовищі культивування, що дозволяє отримати збереженість клітин та експлантів плаценти більш 90% за показниками структурної цілісності та життєздатності, клітин в альгінатних сферах – близько 70%, сфероїдів – близько 50% зі значним руйнуванням. Перспективними для кріоконсервування похідних плаценти в медичних цілях з метою зниження токсичності є пропандіол та розчин Рінгера. Декстран, полівінілпіролідон, сорбітол та гідроксиетилкрахмаль мають низькі кріопротекторні властивості.
7. У системі *in vitro* клітини та експланти плаценти підвищують метаболічну активність нейроклітин, органотипових культур матки, пригнічують її в культурах яєчників, спленоцитів та не впливають на метаболічну активність фібробластів. Дія нативних та кріоконсервованих похідних плаценти є подібною.
8. У системі *in vivo* імплантація кріоконсервованих експлантів плаценти здоровим експериментальним тваринам призводить до гіпертрофії яєчників, матки, затримки овуляції та часу настання вагітності, не впливає на репродуктивні показники. Імплантація кріоконсервованих експлантів плаценти при несанованому інфекційному процесі, знижує кількість тварин, що завагітніли з 80 до 40% та середню кількість плодів через підвищене спайкоутворення та активацію гострого запального процесу. При експериментальному антифосфоліпідному синдромі їхнє застосування дозволяє знизити активність лімфоцитів за реакцією бласттрансформації та швидкість згортання крові, підвищити кількість плодів. У моделі синдрому полікістозних яєчників застосування кріоконсервованих експлантів плаценти дозволяє відновити естральний цикл у 90% тварин, підвищити відсоток вагітних тварин з 0 до 40%. У моделі передчасного виснаження яєчників після хіміотерапії застосування кріоконсервованих експлантів плаценти відновлюється естральний цикл, статеві функції, структура матки, але не фертильність. У моделі ішемічного ураження яєчників після застосування кріоконсервованих експлантів плаценти значуще відновлюється кількість жовтих тіл та підвищується кількість плодів.
9. На основі отриманих даних визначено, що найбільш перспективними об'єктами для розробки методів лікування гінекологічної патології є кріоконсервовані клітини та експланти плаценти. Механізми їхньої дії можна

пояснити наявністю МСК та гормонпродукуючого трофобласту в їх складі. Показаннями до їхнього застосування можуть бути наявність ендокринної, аутоімунної, патології, дистрофічних процесів, протипоказанням є наявність несанованого інфекційного процесу.

## СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

### *Наукові публікації, які розкривають основний зміст дисертації.*

#### *Глави монографій.*

1. 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. (*Внесок здобувача: планування, аналіз отриманих даних, підготовка матеріалів до друку*).
2. 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. А.Н. Гольцев. – Харьков: издательский дом „Райдер”, 2012, с. 469-486. (*Внесок здобувача: планування, аналіз отриманих даних, підготовка матеріалів до друку*).
3. Прокопюк О.С. Сучасні біотехнології криоконсервування плацентарних біопрепаратів і перспективи їх клінічного застосування в геріатрії / О.С. Прокопюк, В.Ю. Прокопюк, М.В. Шевченко, І.Б. Мусатова, Л.В. Бабійчук // Холод у біології та медицині: сучасний стан і перспективи. За ред. О.Ю.Петренка. – Київ, «Видавництво «Наукова думка» НАН України», 2024. – С.227-236. (*Внесок здобувача: планування, аналіз отриманих даних, підготовка матеріалів до друку*).

#### *Статті у наукових виданнях, індексованих міжнародними наукометричними базами даних Scopus та Web of Science, SCImago Journal*

4. Prokopyuk V.Yu. Low temperature preservation and storage of placental biological derivatives / V.Yu. Prokopyuk , O.V. Falko, I.B. Musatova, O.S. Prokopyuk, O.O. Royenko, O.O. Terekhova, O.V. Chub // Probl. Cryobiol. Cryomed. – 2015. – V. 25, № 4. – P. 291-310. (**Scopus Q4**. Категорія А. *Внесок здобувача: планування, аналіз отриманих даних, підготовка матеріалів до друку*).
5. Pogozhykh D. Influence of factors of cryopreservation and hypothermic storage on survival and functional parameters of multipotent stromal cells of placental origin [Електронний ресурс] / D. Pogozhykh, V. Prokopyuk, O. Pogozhykh, T. Mueller, O. Prokopyuk // PLoS One. – 2015. – Vol.10, №10. – Режим доступу до журн.: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0139834> (**Scopus Q1**. *Внесок здобувача: планування, проведення експериментів з криоконсервування, аналіз отриманих даних*).
6. Kozub M.M. Comparison of various of tissue and cell therapy approaches when restoring ovarian, hepatic and kidney`s function after chemotherapy-induced ovarian failure /M.M. Kozub, V.Yu. Prokopyuk, K.P. Skibina, O.V. Prokopyuk, N.I. Kozub //



- Exp Oncol.– 2017. – V.39, № 3. – P. 181-185. (**Scopus Q3. Категорія А. Внесок здобувача: проведення експериментів з клітинами та експлантами, аналіз отриманих даних**).
7. Pogozhykh D. Influence of temperature fluctuations during cryopreservation on vital parameters, differentiation potential, and transgene expression of placental multipotent stromal cells [Електронний ресурс] / D. Pogozhykh, O. Pogozhykh, V. Prokopyuk, L. Kuleshova, A. Goltsev, R. Blasczyk, T. Mueller // Stem Cell Research & Therapy. – 2017. V.8, № 66. – Режим доступу до журн.: <https://stemcellres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13287-017-0512-7> (**Scopus Q1. Внесок здобувача: проведення експериментів з кріоконсервування, аналіз отриманих даних**).
  8. Prokopyuk V.Yu. Cryopreserved placental explants increase lifespan of male mice and change survival features of female mice / V.Yu.Prokopyuk , O.V.Chub, N.A.Shevchenko, O.V.Falko, I.B.Musatova, V.V.Lazurenko , A.N.Tischenko, O.S. Prokopyuk // Probl. Cryobiol. Cryomed. – 2017. – V. 27, № 2. – С. 143-150. (**Scopus Q3. Категорія А. Внесок здобувача: проведення експериментів з експлантами, аналіз отриманих даних**).
  9. Prokopyuk V.Yu. Effect of cryopreserved placental explants on female reproductive system under normal and pathological conditions (experimental study) / V.Yu.Prokopyuk, O.V.Grischenko, O.V.Prokopyuk, N.O. Shevchenko, O.V. Falko, A.V.Storchak, A.O.Schedrov // Probl Cryobiol Cryomed. – 2017. – V.28, № 3. – P. 250-265. (**Scopus Q3. Категорія А.Внесок здобувача: планування, проведення експериментів, аналіз отриманих даних**).
  10. Pogozhykh O. Placenta and placental derivatives in regenerative therapies: experimental studies, history and prospects [Електронний ресурс] / O. Pogozhykh, V. Prokopyuk, C. Figueiredo, D.Pogozhykh // Stem Cells International.– 2018.– V. 2018, №14. – Режим доступу до журн. : <https://www.hindawi.com/journals/sci/2018/4837930/> (**Scopus Q2. Внесок здобувача: планування, аналіз отриманих даних, підготовка матеріалів українською мовою**).
  11. Prokopiuk V.Yu. Influence of media conditioned by cryopreserved and fresh placental explants and cells on murine uterine and ovarian organotypic cultures / V.Yu. Prokopiuk // Probl Cryobiol Cryomed. – 2018. – V. 28, № 2. – P. – 139-150. (**Scopus Q3. Категорія А. Внесок здобувача: планування, проведення експериментів, аналіз отриманих даних**).
  12. Pogozhykh O. Towards biobanking technologies for natural and bioengineered multicellular placental constructs / V. Prokopyuk, O. Prokopyuk, L. Kuleshova, A. Goltsev, C. Figueiredo, D. Pogozhykh // Biomaterials. – 2018. – V. 185. – P. 39-50. (**Scopus Q1. Внесок здобувача: планування, проведення експериментів, аналіз отриманих даних, підготовка матеріалів українською мовою**).
  13. Прокопюк В.Ю. Вплив кріоконсервованих експлантів плаценти на відновлення яєчників після лікування перекруту / О.О. Логінова, О.В. Прокопюк, Є.В. Сомова // Світ біології та медицини. – 2018. – Т. 63, № 1. – С. 150 - 153. (**Web of Science Core Collection. Категорія А. Внесок здобувача: планування, проведення експериментів, аналіз отриманих даних**).

14. Prokopiuk O.S. Isolation and cryopreservation of placental cells: search for optimal biotechniques in experimental and regenerative medicine / O.S. Prokopiuk, M.V. Shevchenko, V.Yu. Prokopiuk, I.B. Musatova, R.A. Safonov, O.V. Prokopiuk // *Probl. Cryobiol. Cryomed.* – 2021. – V.31, №1. – P. 82-88. <https://doi.org/10.15407/cryo31.01> (**Scopus Q4**. Категорія А. Внесок здобувача: планування, проведення експериментів, аналіз отриманих даних)
15. Prokopiuk V. Cryopreserved placental derivatives increase survival of mice with cyclophosphamide-induced ovarian failure / V.Prokopiuk, M. Shevchenko, A. Kaverinska, T. Mykhalchuk, O. Prokopiuk // *Probl. Cryobiol. Cryomed.* – 2023. – V33, N.1. – P. 059-063. <https://doi.org/10.15407/cryo33.01.059> (**Scopus Q4**. Категорія А. Внесок здобувача: планування, проведення експериментів, аналіз отриманих даних)

#### **Статті у фахових виданнях України**

16. Прокопюк О.С. Вплив кріоконсервованих біоб'єктів плацентарного походження на культуру клітин / О.С.Прокопюк, Н.О. Шевченко, В.Ю. Прокопюк, О.В. Чуб, О.О. Терехова // *Вісник проблем біології і медицини.* – 2015. – Вип. 3, Том 1 (122). – С. 160 - 164. (*Фахове видання. Внесок здобувача: планування, проведення експериментів, аналіз отриманих даних*).
17. Prokopyuk V.Yu. Safety of placental, umbilical cord and fetal membrane explants after cryopreservation / V.Yu. Prokopyuk, O.S. Prokopyuk, I.B. Musatova, N.A. Shevchenko, A.A. Roenko, E.A. Terehova, V.V. Volina // *Cell and organ transplantology.* – 2015. – Vol.3, №1. – P. 34-38. (*Фахове видання. Внесок здобувача: планування, проведення експериментів з кріоконсервування експлантів, аналіз отриманих даних*).
18. Prokopyuk V.Yu. Placental stem cells, organotypic culture and human placenta extract have neuroprotective activity /V.Yu.Prokopyuk, O.V.Chub, M.V.Shevchenko, O.S. Prokopyuk // *Cell and Organ Transplantology.* – 2017. – V.5, № 1. – P. 39-42. (*Фахове видання. Внесок здобувача: проведення експериментів з експлант ами, клітинами аналіз отриманих даних*).
19. Прокопюк В.Ю. Корекція інволютивних змін репродуктивної системи самиць старих щурів імплантацією кріоконсервованих фрагментів плаценти / В.Ю. Прокопюк, О.С. Прокопюк, І.Б. Мусатова, І.В. Сорокіна, О.О. Логінова, К.В. Сомова // *Фізіол. журн.* – 2018. – Т. 64, № 4. – С. 74-81. (*Фахове видання. Внесок здобувача: планування, проведення експериментів, аналіз отриманих даних*).
20. Прокопюк В.Ю. Вплив кріоконсервованих експлантів плаценти на перебіг експериментального синдрому полікістозних яєчників / А.М. Гольцев, О.С. Прокопюк, К.В. Сомова, О.О. Логінова // *Вісник проблем біології і медицини.* – 2018. – Т. 142, № 1. – С. 167-171. (*Фахове видання. Внесок здобувача: планування, проведення експериментів, аналіз отриманих даних*).
21. Prokopiuk V.Yu. Influence of native and cryopreserved placental derivatives on the splenocyte functional characteristics in vitro / O.V. Falko, V.G. Karpenko, O.V. Chub, O.O. Loginova // *Bulletin of problems in biology and medecine.* – 2018.– V. 144, № 2. – P. 221-223. (*Фахове видання. Внесок здобувача: планування, проведення експериментів, аналіз отриманих даних*).

22. Прокопюк В. Ю. Вплив кріоконсервованих експлантів плаценти на прояви ускладнень після операціях на матці в експерименті / В.Ю. Прокопюк, Н.М. Пасієшвілі, О.В. Прокопюк, В.Г. Карпенко, О.О. Логінова // Вісник проблем біології і медицини. – 2019. – Т. 2, № 151. С. 151-155. (*Категорія Б. Внесок здобувача: планування, проведення експериментів, аналіз отриманих даних*).
23. Prokopiuk V.Yu. Characterization of placental mesenchymal stem cells spheroids after generation hypothermic and subnormothermic storage / V.Yu. Prokopiuk, N.S. Hloba, O.S. Prokopiuk, A.O. Shchedrov, I.B. Musatova // Innov Biosyst Bioeng. – 2019. – V.3, N3. – P.146-151 doi: 10.20535/ibb.2019.3.3.172604 (*Категорія Б. Внесок здобувача: планування, проведення експериментів, аналіз отриманих даних*)
24. Прокопюк В.Ю. Оцінка можливості гіпотермічного та субнормотермічного зберігання мезенхімальних стовбурових клітин плаценти в альгінатних носіях / В.Ю.Прокопюк, В.Ю.Трифонов, Р.Я.Сафонов, В.В.Лазуренко, О.С. Прокопюк // Experimental and clinical physiology and biochemistry. – 2019. – V.3, N.87. P. 51–55. (*Категорія Б. Внесок здобувача: планування, проведення експериментів, аналіз отриманих даних*)
25. Prokopyuk V.Yu. Experience in clinical application of cryopreserved placental derivatives: cells, tissue, membranes, extract, and cord blood serum / V.Yu. Prokopyuk, V.G. Karpenko, M.V. Shevchenko, R.A. Safonov, N.M. Pasieshvili, V.V. Lazurenko, O.S. Prokopyuk // Innov Biosyst Bioeng – 2020. – V4, N3. – P. 160-168. (*Категорія Б. Внесок здобувача: планування, проведення експериментів, аналіз отриманих даних*).
- Опубліковані праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації**
26. Prokopyuk O.S. Cryopreservation effect on morfofunctional integrity of human placental tissue / O.S. Prokopyuk, V.Yu. Prokopyuk, V.V. Volina, V.V. Chizevsky // Speaker Abstract 47<sup>th</sup> Annual Meeting of Cryobiology “Cryo-2010”, 17-20 July 2010. – Bristol, 2010 – P. 77.
27. Прокопюк В.Ю. Механизмы влияния кріоконсервированных препаратов плаценты на репродуктивную функцию в периоде позднего онтогенеза / В.Ю. Прокопюк, О.С. Прокопюк // Холод в биологии и медицине. – Тезисы докладов 36-й ежегодной конференции молодых учёных «Холод в биологии и медицине», Харьков, 22-24 мая 2012. – Харьков, 2012. – С. 31.
28. Prokopyuk O.S. Morphofunctional integrity of placental fragments after using different cryopreservation protocols / O.S. Prokopyuk, V.Yu. Prokopyuk // Problems of cryobiology. – 2012. – V. 22, № 3. – С. 264.
29. Прокопюк О.С. Использование кріоконсервированных препаратов плаценты для коррекции возрастных изменений / Прокопюк О.С., Прокопюк В.Ю. // Матеріали конференції «Актуальні питання геронтології та гериатрії», присвяченій пам'яті В.В. Фролькіса. – Київ, 25 січня 2013 року. – Київ, 2013. – С.48.
30. Прокопюк В.Ю. Етико-правові проблеми отримання, дослідження і застосування плацентарних препаратів / В.Ю. Прокопюк // Тези п'ятого конгресу з біоетики – 23-25 вересня, 2013, Київ. – Київ, 2013. – С. 146-147.
31. Prokopyuk V.Yu. Preservation assay for placental, umbilical and membrain tissues in

- low temperature bank /V.Yu.Prokopyuk, O.S.Prokopyuk, I.B.Musatova, A.N.Roenko, E.A. Terekhova // Abstracts and program «Freezing biological time» Society for Low Temperature Biology 50th Anniversary Celebration, Annual Scientific Conference & AGM 2014 London 8-10 October 2014. – London, 2014. – P.74.
- 32.Pogozhykh O. Parametrs for accurate estimation of survival rates of multipotent stromal cells after long-term criopreservation simulation /O. Pogozhykh, D. Pogozhykh, V. Prokopiuk, T. Muller // Abstracts and program «Freezing biological time» Society for Low Temperature Biology 50th Anniversary Celebration, Annual Scientific Conference & AGM 2014 London 8-10 October 2014. – London, 2014. – P.80.
- 33.Pogozhykh D. Mimicked long term cryopreservation of transgenic multipotent stromal cells affects viability but not transgene expression / D. Pogozhykh, O. Pogozhykh, V. Prokopiuk, T. Mueller// Abstracts and program «8th International Meeting Stem Cell Network North Rhine-Westphalia» April 21-22, 2015, Bonn, Germany. – Bonn, 2015. – P.95.
- 34.Prokopuk V.Y. Placental cryoextract rescue ovarian function of mice with premature ovarian failure induced by chemotherapy / V.Y. Prokopuk, N.I. Kozub, K.P. Skybina, M.N. Kozub // *Prezegląd lekarski*. – 2016. – № 73, Supplement 1. – P5.
- 35.Skybina K. P. Placental factors protects neural cells from glutamate-induced toxicity / K.P. Skybina, O.V. Chub, V.Yu. Prokopyuk, M.V. Shevchenko // *Topical issues of new drugs development: Abstracts of XXIII International Scientific And Practical Conference Of Young Scientists And Student (April 21, 2016) in 2 vol. V. 2.* – Kharkiv: Publishing Office NUPh, 2016. – P. 106.
- 36.Прокопюк В.Ю. Экстракт плаценты ускоряет восстановление половой и репродуктивной функции после химиотерапии в эксперименте (пилотное исследование) / В.Ю.Прокопюк, К.П.Скибина, А.В.Прокопюк, М.Н.Козуб // *Український радіологічний журнал*. – 2016. – Т. XXIV, вып.1, доп. 1 – С. 159.
- 37.Чуб О.В. Нейропротекторный эффект факторов плацентарного происхождения в модели глутамат-индуцированной токсичности клеток головного мозга новорожденных крыс / О.В. Чуб, М.А. Шевченко, В.Ю. Прокопюк // *Тези доповідей 40 щорічної конференції молодих учених «Холод в біології та медицині»*, Харків, 23-24 травня 2016. – Харків, 2016. – С. 26.
- 38.Pogozhykh D. Mimicking long-term biobanking of placental multipotent stromal cells by temperature fluctuations during cryopreservation /D. Pogozhykh, O.Pogozhykh, V. Prokopyuk, A. Goltsev, C. Figueiredo, T.Müller // *SLTB 2016 in Dresden on Wednesday September 7th.* – Dresden, 2016.– P.7.
- 39.Prokopyuk V.Yu. Influence of cryopreservation on survival of placental, umbilical cord, and fetal membrane explants, as well as placental cells within spheroids and alginate microspheres /V.Yu. Prokopyuk, D. Pogozhykh, O. Pogozhykh, I.B. Musatova, L.G. Kuleshova, O.S. Prokopyuk // *SLTB 2016 in Dresden on Wednesday September 7th.* – Dresden, 2016.– P.27.
- 40.Прокопюк В.Ю. Глутаматна ексайтотоксичність як метод вибору оцінки нейропротекторної дії лікарських препаратів in vitro / В.Ю. Прокопюк, О.В. Чуб, М.А. Шевченко // *Патофізіологія і фармація: шляхи інтеграції: тези*

доповідей VII Національного конгресу патофізіологів України з міжнародною участю 5 – 7 жовтня 2016. – Харків.: Вид-во НФаУ, 2016. – С. 187.

41. Чуб О.В. Кріоконсервовані плацентарні біопрепарати в профілактиці і корекції дисфункцій ЦНС в пізньому онтогенезі (експериментальне дослідження) / О.В. Чуб, В.Ю. Прокопюк, О.С. Прокопюк, І.Б. Мусатова, М.В. Шевченко // Проблемы старения и долголетия. – 2016. – Т.25. – С. 44.
42. Чуб О. В. Кріоконсервовані експланти плаценти підвищують тривалість життя самців і знижують імовірність смерті самиць в репродуктивний період / О.В. Чуб, В.Ю. Прокопюк, І.Б. Мусатова, О.С. Прокопюк // Тези доповідей XIV Міжнародної наукової конференції студентів, аспірантів, докторантів, молодих вчених та фахівців «Актуальні питання сучасної медицини» 30–31 березня 2017 року, м. Харків, Україна. – Харків, 2017. – С. 88-89.
43. Prokopiuk V. Yu. Placental MSCs, explants, extract protect neural cells against glutamate-induced toxicity / V. Yu. Prokopiuk, I. B. Musatova, M.V. Shevchenko, O.V. Chub, N.O. Shevchenko, O.S. Prokopiuk // Program and Abstract Book 8 th International Symposium on Experimental and Clinical Neurobiology Kosice, Slovakia June 18 – 21, 2017. – Kosice, 2017. – P. 72.
44. Pogozhykh O. Characterisation of cells derived from cryopreserved placental tissues / O.Pogozhykh, D. Pogozhykh, V. Prokopyuk, C. Figueiredo // Abstract book: SLTB Science meeting Cambridge 19 - 20 th September 2017. – Cambridge, 2017.
45. Prokopiuk V.Yu. Experimental study of cell and tissue therapy protocols in rehabilitation after chemotherapy-induced ovarian failure / V.Yu. Prokopiuk, M.M. Kozub, K. P.Skibina , O.V. Prokopyuk // Exp Oncol. – 2017. – Vol. 39, № 3. P. – 250-251.
46. Прокопюк В.Ю. Вплив кріоконсервованих мезенхімально стромальних клітин та експлантів плаценти на ізольовані тканини та клітини жіночої репродуктивної системи *in vitro* / В.Ю. Прокопюк, А.М. Гольцев , О.В. Прокопюк, О.В. Фалько, М.В. Шевченко // «Досягнення та перспективи експериментальної і клінічної ендокринології» (Сімнадцяті данілевські читання). – 1-2 березня 2018 року. – Харків, 2018. – С.115.
47. Pogozhykh D, Prokopyuk V, Pogozhykh O, Goltsev A, Blasczyk R, Börgel M, Figueiredo C Low temperature storage of natural and bioengineered multicellular placental constructs. The International Journal of Artificial Organs. Volume 42 Issue 8, August 2019. P. 398.
48. Prokopiuk O.V. Hepatoprotective effect of placental adhesive cells in model of cyclophosphamide-induced cytotoxicity / O.V.Prokopiuk, N.M.Pasieshvili, V.Yu.Prokopiuk, V.G.Karpenko // Experimental Oncology. – 2019. – V. 41. –P. 275.
49. Прокопюк В.Ю. Стратегія застосування методів клітинного та органотипового культивування для комплексної оцінки дії біологічно активних сполук на жіночий організм в експерименті / Прокопюк В.Ю., Бабийчук Л. В., Прокопюк О.В., Сафонов Р.А., Прокопюк О.С. // Збірник наукових праць. Випуск 6. VIII Міжнародна науково-практична конференція «Сучасні досягнення фармацевтичної технології та біотехнології», Харків, 7-8 листопада, 2019. – Харків, 2019. – С. 391-392.
50. Прокопюк В.Ю. Вплив кріоконсервованих клітин та експлантів плаценти на

морфофункційні властивості яєчників в моделі циклофосфамідіндукованої оваріальної недостатності / В.Ю.Прокопюк, В.В.Лазуренко, О.В.Прокопюк, Р.А.Сафонов, О.С. Прокопюк // Проблеми ендокринної патології. 2019. Спеціальний випуск. Тези доповідей ІХ з'їзду ендокринологів України, присвяченого 100-річчю інституту проблем ендокринної патології ім. В.Я. Данилевського НАМН України. 19-22 листопада 2019. – Харків, 2019. – С. 335-336.

- 51.Prokopiuk O.S. Development of cryotechnologies for obtaining placental cells as biomaterial for experimental medicine / O.S. Prokopiuk, M.V.Shevchenko, V.Yu. Prokopiuk, I.B. Musatova, D.Yu. Tertyshnyk // Abstract book. «Biomedical perspectives II» International Scientific Conference of Students, Postgraduates and Young Scientists, Sumy, October 20-22, 2020. – Sumy, 2020. – P. 86
- 52.Prokopiuk V.Yu. The possibility of hypothermic and subnormothermic storage of placental explants, cells in suspension, spheroids and cell encapsulated in alginate beads / V.Yu. Prokopiuk, I.B. Musatova, O.S. Prokopiuk, M.V. Shevchenko, O.V. Prokopiuk // Cryobiology. – 2020 V. 97. – P. 278. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2020.10.112>
- 53.Прокопюк В. Ю. Экспериментальне изучение возможностей клеточной и тканевой терапии в реабилитации после химиотерапии / В.Ю. Прокопюк, К.П. Скибина, Н.И. Козуб, И.Б. Мусатова, М.В. Шевченко, О.С. Прокопюк // Тези Всеукраїнської науково-практичної інтернет-конференції «Фізіологія, валеологія, медицина: сучасний стан та перспективи розвитку» 06 квітня 2021. – Харків, 2021. – С. 158.
- 54.Прокопюк В. Ю. Оцінка можливостей використання клітинних технологій в медичних дослідженнях /В.Ю. Прокопюк// Тези доповідей XVIII міжнародної наукової конференції студентів, молодих вчених та фахівців «Актуальні питання сучасної медицини», 22-23 квітня 2021 року. – Харків. – С. 132-133.
- 55.Prokopiuk V. Cryomicroscopic features of damage to various placental tissues and tissue engineering-related structures / Prokopiuk V. Tkachenko A. Onishchenko A. Kaverinska A. Prokopiuk O.// Cryobiology. – 2022; V.109. –P.56.
56. Mykhalchuk, T. Study of cryopreserved placental cells biological effect on organotypic uterine culture / M. Shevchenko, V. Prokopiuk, O. Prokopiuk // Probl. Cryobiol. Cryomed. – 2022. – V.32,N4. – P.307. <https://doi.org/10.15407/cryo32.04.307a>
- 57.Shevchenko M., Prokopyuk V., Mykhalchuk T., Prokopyuk O., Lazurenko V. Chemotherapy-induced murine ovarian failure treatment with cryopreserved placental explants Abstract book of conference “Cryo 2023 – 60 annual meeting” 25-27 July 2023, Minneapolis, MN, United States. – Minneapolis, 2023. – P. 116-117.

***Публікації, які додатково відображають наукові результати дисертації.***

***Статті у інших періодичних виданнях України***

- 58.Shevchenko N.O. Dynamics of activity and duration of functioning of cryopreserved cryoextract, placental cells and fragments in the organism of experimental animals / N.O.Shevchenko, K.V. Somova, V.V.Volina, V.Yu.Prokopiuk, O.S. Prokopiuk // Morphologia.– 2016.– Vol.10, № 2. – P. 93-98. (Внесок здобувача: планування, проведення експериментів з клітинами та фрагментами, аналіз отриманих

даних).

59. Prokopyuk V.Y. The influence of cryopreserved placental explants on ovaries and uterus recovery after pelvic inflammatory disease in the experiment / V.Y. Prokopyuk, M.V. Shevchenko, A.O. Shchedrov, O.V. Prokopyuk // Eastern Ukrainian Medical Journal. – 2019. – V.7,N.3. – P. 285-289. *(Внесок здобувача: планування, проведення експериментів, аналіз отриманих даних)*
60. Прокопюк В.Ю. Оцінка можливості короткочасного зберігання експлантів плаценти для регенеративної медицини / В.Ю. Прокопюк, М.В. Шевченко, О.С. Прокопюк, І.Б. Мусатова, К.Ю. Смоляник // Вісник наукових досліджень. – 2019. – № 2. С. 53-57. *(Внесок здобувача: планування, проведення експериментів, аналіз отриманих даних).*

#### **Патенти.**

61. Патент № 62029 Україна, МПК G09B23/28. Спосіб моделювання акушерського антифосфоліпідного синдрому / Прокопюк В.Ю., Прокопюк О.С., Трифонов В.Ю., Зайченко Г.В., Фалько О.В.; Заявник і патентовласник ІПКіК НАН України - № 201100372; заявл. 12.01.11; опубл. 10.08.11, Бюл. № 15.
62. Патент № 72117 Україна, МПК А61В 17/00, А61Р 15/00 Спосіб корекції вікових порушень репродуктивної функції/ Прокопюк В.Ю., Прокопюк О.С., Карпенко В.Г., Пасієшвілі Н.М., Фалько О.В.; Заявник і патентовласник ІПКіК НАН України - № 201200310; заявл. 10.01.2012, опубл. 10.08.2012, Бюл. № 15, 2012.
63. Патент № 79009 Україна, МПК А01N 1/2 Спосіб кріоконсервування тканини плаценти / Прокопюк В.Ю., Прокопюк О.С., Чижевський В.В.; Заявник і патентовласник ІПКіК НАН України - № 201210931; заявл. 19.09.2012, опубл. 10.04.2013, Бюл. № 7.
64. Патент № 91122 Україна, МПК А61К 35/16, А61Р 15/06 Спосіб профілактики первинної плацентарної недостатності / Прокопюк В.Ю., Пасієшвілі Н.М., Прокопюк О.В., Карпенко В.Г., Прокопюк О.С Патент на корисну модель.; Заявник і патентовласник ІПКіК НАН України - № 201315049; заявл. 23.12.2013, опубл. 25.06.2014 Бюл. № 12.
65. Патент № 107968 Україна, МПК А61К 35/50 , А61Р 15/08 Спосіб лікування передчасної недостатності яєчників / Прокопюк В.Ю., Скібіна К.П., Козуб М.М., Прокопюк О.В., Пасієшвілі Н.М.; Заявник і патентовласник ІПКіК НАН України - № 201600058; заявл. 04.01.2016. опубл. 24.06.2016, Бюл.№ 12.

#### **АНОТАЦІЯ**

**Прокопюк В.Ю. Біотехнологія отримання та низькотемпературного зберігання похідних плаценти для лікування гінекологічної патології. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.**

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – «біотехнологія». Дисертація виконана в інституті проблем кріобіології та кріомедицини НАН України, Харків. Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського» МОН України, Київ, 2025.

Дисертаційна робота присвячена розробленню наукових основ створення нових біотехнологій одержання та низькотемпературного зберігання препаратів похідних плаценти для лікування гінекологічної патології. Застосування

кріоконсервованих похідних плаценти для клітинної та тканинної терапії гінекологічної патології обумовлена біологічною тропністю плаценти до структур жіночої статеві системи, низькою імуногенністю, великою кількістю матеріалу, можливістю аутобанкінгу.

На першому етапі роботи досліджено властивості природних та отриманих методами клітинної інженерії похідних плаценти (експлантів, сфероїдів, клітин у суспензії та альгінатних сферах). Виявлена можливість ефективного кріоконсервування похідних плаценти з застосуванням диметилсульфоксиду 1,2-пропандіолу, полівінілпіролідону. Показані особливості кріоушкоджень в залежності від типу об'єкту, міжклітинних контактів та взаємодії кріопротектору з матеріалом скафолду. Виявлено, що більш стійкими до дії субнормотермічних (+20°C), гіпотермічних (+4°C) та низьких (-196°C) температур є клітини та експланти, що робить їх більш перспективними об'єктами для медичного застосування. На основі отриманих даних запропоновані біотехнологічні підходи до отримання та зберігання похідних плаценти.

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

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

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

**Ключові слова:** плацента, біотехнологія, кріоконсервування, низькотемпературне зберігання, регенеративна медицина, стовбурові клітини, клітинні культури, гінекологія.

## SUMMARY

**Prokopiuk V.Yu. Biotechnology of obtaining and low-temperature storage of placental derivatives for the treatment of gynecological pathology. - The qualifying scientific paper as a manuscript.**

Dissertation for the doctor of biological science degree in specialty 03.00.20-«biotechnology». Completed in Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv. National Technical University of Ukraine «Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute», Ministry of Education and Science of Ukraine, Kyiv, 2025.



The dissertation work is devoted to the development of scientific foundations for the creation of new biotechnologies for obtaining and low-temperature storage of placenta-derived preparations for the treatment of gynecological pathology. The application of cryopreserved placental derivatives for treatment of gynecological pathology is conditioned by the natural placenta's biological tropism to the female reproductive system, low immunogenicity, a large amount of material, the possibility of auto-banking.

At the first stage of the study, the properties of natural and artificial placental derivatives (explants, spheroids, cells in suspension and in alginate spheres) were studied. The possibility of effective cryopreservation of placental derivatives using dimethyl sulfoxide and less toxic ones, allowed for clinical application propanediol, polyvinylpyrrolidone was proved. Mechanisms of cryoinjury depended on the type of object, intercellular contacts, interaction of the cryoprotectant with the scaffold's material. Cells and explants are more resistant to subnormothermic (20°C), hypothermal (4°C) and low (-196°C) temperatures, which makes them more perspective objects. Biotechnological approaches to obtaining and storing placenta derivatives are proposed on the basis of the obtained data.

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

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

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

**Key words:** placenta, biotechnology, cryopreservation, low-temperature storage, regenerative medicine, stem cells, cell cultures, gynecology.

**СПИСОК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ**

DMEM – Dulbecco's modified eagle medium

EB – etidium bromide

FDA – fluorescein diacetate

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

PBS – Phosphate buffer saline

АФС – антифосфоліпідний синдром

ДМСО – диметилсульфоксид

ЕП – експланти плаценти

КЕП – кріоконсервовані експланти плаценти

ККП – кріоконсервовані клітини плаценти

КП – клітини плаценти

МСК – мезенхімальні стовбурові клітини

Од ОЩ – одиниці оптичної щільності

РБТЛ – реакція бласттрансформації лімфоцитів

СПКЯ – синдром полікістозних яєчників

УО – умовні одиниці

ХТ – хіміотерапія