

УДК 618.46:57.086.13:577.121.7:57.084-089.6 7123

О.С. Прокопюк¹, В.Ю. Прокопюк^{1*}, Н.М. Пасієшвілі³,
В.В. Чижевський², В.Ю. Трифонов⁴, В.Г. Карпенко⁵, О.О. Логінова⁵

Імплантація кріоконсервованих фрагментів плаценти людини відновлює прооксидантно-антиоксидантний баланс у експериментальних тварин пізнього онтогенезу

UDC 618.46:57.086.13:577.121.7:57.084-089.6 7123

O.S. Prokopyuk¹, V.Yu. Prokopyuk^{1*}, N.M. Pasiashvili³, V.V. Chyzhevskiy², V.Yu. Trifonov⁴, V.G. Karpenko⁵, O.O. Loginova⁵ Implantation of Cryopreserved Human Placental Fragments Restores Prooxidant-Antioxidant Balance in Experimental Animals of Late Ontogeny

Реферат: У результаті проведених досліджень було показано, що у щурів пізнього онтогенезу стан балансу про- та антиоксидантної системи сироватки крові, печінки та гонад порушено в бік прооксидантних процесів. Проте імплантація піддослідним тваринам кріоконсервованих фрагментів плаценти людини дозволяє підвищити активність ендогенної антиоксидантної системи та сприяє корекції патологічних змін, пов'язаних зі старінням. Аналіз отриманих даних свідчить, що відновлювальні процеси відбуваються переважно на клітинному та органному рівнях. Застосування кріоконсервованих фрагментів плаценти в похилому віці забезпечує поступову різновекторну корекцію сенильно-інволютивних змін, у саногенезі яких підвищення активності ендогенної антиоксидантної системи обґрунтовує перспективність створення профілактично-терапевтичних програм гериатричної патології.

Ключові слова: кріоконсервовані біооб'єкти плацентарного походження, про- та антиоксидантна система організму, старіння, гериатрія.

Реферат: В результате проведенных исследований было показано, что у животных позднего онтогенеза состояние баланса про- и антиоксидантной системы сыворотки крови, печени и гонад нарушено в сторону прооксидантных процессов. Однако имплантация подопытным животным кріоконсервированных фрагментов плаценты позволяет повысить активность эндогенной антиоксидантной системы и способствует коррекции патологических изменений, связанных со старением. Анализ полученных результатов свидетельствует о том, что восстановительные процессы происходят как на клеточном, так и на организменном уровне. Применение кріоконсервированных фрагментов плаценты в пожилом возрасте обеспечивает постепенную разновекторную коррекцию сенильно-инволютивных изменений, в саногенезе которых увеличение активности эндогенной антиоксидантной системы обосновывает перспективность создания профилактико-терапевтических программ для лечения гериатрической патологии.

Ключевые слова: кріоконсервированные биообъекты плацентарного происхождения, про- и антиоксидантная система, старение, гериатрия.

Abstract: The studies have shown that animals of late ontogeny had the misbalance in prooxidative-antioxidative system of blood serum, liver and gonads with shift to the prooxidant activity. Nevertheless, the implantation of cryopreserved human placenta fragments to experimental animals increased the activity of endogenous antioxidant system and contributed to the correction of pathological changes associated with aging. Analysis of the findings indicated that the restoration processes occurred both at cell and organism levels. The use of cryopreserved placental fragments in pre-senile age led to a gradual diverse correction of senile involutions, and an increased activity of endogenous antioxidant system during their sanogenesis substantiated the perspective of preventive and therapeutic protocols to treat geriatric pathologies.

Key words: cryopreservation bioobjects of placental origin, pro- and antioxidant system, aging, geriatrics.

¹Відділ кріобіології систем репродукції, Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

²Сектор «Низькотемпературний банк біологічних об'єктів», Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

³КЗОЗ «Харківський обласний клінічний перинатальний центр»

⁴ДП «Міжвідомчий науковий центр кріобіології і кріомедицини НАН, АМН, МОЗ України»

⁵Харківська медична академія післядипломної освіти МОЗ України

¹Department of Cryobiology of Reproduction System, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

²Low Temperature Bank of Biological Objects, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

³Kharkiv Regional Clinical Perinatal Center, Kharkiv, Ukraine

⁴Interdepartmental Scientific Center for Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences, Academy of Medical Sciences, Ministry of Health Care of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

⁵Kharkiv Medical Academy of Postgraduate Education of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:

вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61016;
тел.: (+38 057) 373-74-35, факс: (+38 057) 373-59-52,
електронна пошта: cryo@online.kharkov.ua

*To whom correspondence should be addressed:

23, Pereyaslavska str., Kharkiv, Ukraine 61016;
tel.: +380 57 373 7435, fax: +380 57 373 5952,
e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Надійшла 05.10.2015

Прийнята до друку 07.12.2016

Received October, 05, 2015

Accepted December, 07, 2016

© 2017 O.S. Prokopyuk et al., Published by the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

За даними ВОЗ демографічна ситуація в Європі характеризується суттєвим збільшенням кількості людей похилого віку. Бажання продовжити активне життя, зберегти працездатність, фізичну, творчу та сексуальну активність, репродуктивну функцію, а також знизити важкість перебігу хвороб, пов'язаних зі старінням зумовлює розвиток нових медичних технологій у галузі геріатрії [9]. Складність патогенезу сенильно-інволютивних процесів і коморбідність геріатричної патології є причинами багатокомпонентного фармакологічного навантаження на організм людини в процесі лікування, що призводить до негативних наслідків [8]. Боротьба зі старінням, як з еволюційно обумовленим процесом, не може мати позитивного ефекту при використанні фармакологічних засобів. Тому актуальним є пошук нових системних геропротекторів природного походження з мультикомпонентною дією [1, 8, 9].

На нашу думку, цим вимогам відповідає клітинно-тканинна терапія, що ґрунтується на використанні біооб'єктів раннього онтогенезу, серед яких помітну біологічну дію мають біопрепарати плацентарного походження [7, 15, 16]. Ця дія обумовлена властивостями плаценти як структури, яка бере участь у системо- й органогенезі, пренатальному розвитку організму в цілому, а також його захисті від ушкоджуючих факторів [15].

Потенційна здатність плацентарних структур активізувати та відновлювати біологічні процеси в клітинах і тканинах при імплантації [1, 8, 16] визначає перспективи їх використання для корекції дистрофічних процесів і репарації морфофункціональних ушкоджень, які розвиваються в організмі з віком.

На основі результатів попередніх досліджень нами було зроблено висновок, що серед кріоконсервованих біооб'єктів плацентарного походження для корекції патологічних порушень, пов'язаних зі старінням, найбільш ефективними та безпечними є фрагменти плаценти [14]. Механізмам саногенезу при використанні похідних фрагментів плаценти у пізньому онтогенезі присвячено значну кількість досліджень, проте визначення впливу плацентарної терапії на стан прооксидантно-антиоксидантного балансу в організмі старіючої людини, залишається актуальною науково-практичною задачею [1, 15, 16].

Відомо, що в патогенезі сенильно-інволютивних змін суттєву роль відіграють активні форми кисню та вільні радикали. Численні дані щодо негативного впливу окислювального стресу під час старіння організму були узагальнені у вільнорадикальну теорію старіння. Типовим результатом впливу активних форм кисню є окислені білки, які утворюються та накопичуються внаслідок метаболічних процесів у клітинах організму. Механізми

The current European demography is characterized by a significant increase in numbers of elderly people. The development of novel medical approaches in geriatrics is driven by peoples' desire to prolong the active life, keeping the performance, physical, creative and sexual activities, reproductive function, and reducing the severity of the diseases, associated with aging [8]. Due to severe pathogenesis of senile involutions and comorbidity of a geriatric pathology any treatment will be associated with multi-component pharmacological loading on a human organism, and as a consequence will result in negative drug aggression [6]. The fight against aging as a naturally preconditioned process can not acquire any positive effect if the pharmaceutical products will be applied. That is why the screening for novel system-level geroprotective agents of natural origin with a multi-component effect is vitally important [1, 6, 8].

We believe that these requirements are fitting with cell-tissue therapy involving the biological objects of early ontogenesis, for example biological products of placental origin with strong biological effects [4, 14, 16]. These are provided by placenta features as the structure, involved into system and organogenesis, prenatal development of an organism in general as well as in its protection against damaging factors [14].

The potential ability of placental structures to activate and restore biological processes in cells and tissues following implantation [1, 6, 15] determines the prospects of their use to correct degenerative changes as well as structural damages, which are usually developing during ageing.

Previously we have found that among cryopreserved biological objects of placental origin the placental fragments were the most effective and safe products during treatment of pathological disorders associated with aging [13]. Many researches are conducted to study the sanogenesis mechanisms arising following application of the cryopreserved placental fragments (CPF) in late ontogenesis, nevertheless assessing how placental therapy acts in terms of prooxidant-antioxidant balance in aging human body is still relevant both as scientific or applied task [1, 14, 16].

It is known that the pathogenesis of senile involutive changes is associated with severe activity of reactive oxygen species and free radicals. Numerous data on negative effects of oxidative stress during aging are combined in a comprehensive free radical theory of aging. Typical products of reactive oxygen species activity are oxidized proteins, usually formed and accumulated as a result of metabolic processes in cells. Reparative mechanisms can not identify and neutralize all these proteins, and with ageing their effectiveness diminishes due to a reduced activity of proteases. If the modified proteins become the part of cell membrane, a threat to the integrity of cells and their orga-



репарації не завжди можуть ідентифікувати та знешкодити такі білки, оскільки з віком їх ефективність зменшується за рахунок зниження активності протеаз. У випадках, коли змінені білки стають частиною клітинної мембрани, може виникнути загроза для цілісності клітини та її органел. Ушкоджені білки накопичуються в організмі людей похилого віку і є складовою патогенезу катаракти, хвороб Альцгеймера, Паркінсона тощо [1, 8, 9]. Визначення впливу кріоконсервованих фрагментів плаценти (КФП) на процеси вільнорадикального окислення (ВРО) й активність антиоксидантної системи (АОС) у пізньому онтогенезі обумовлює патогенетичну спрямованість та ефективність плацентарної терапії геріатричної патології [16].

Метою даної роботи було вивчення стану прооксидантно-антиоксидантного балансу у тканинах печінки, статевих залоз та крові 18-місячних щурів після імплантації кріоконсервованих фрагментів плаценти людини.

Матеріали та методи

Плаценту після фізіологічних пологів отримували від породіль із їх попередньої інформованої згоди. Кріоконсервовані фрагменти плаценти людини отримували і кріоконсервували відповідно до раніше розробленої методики [12, 14]. Дана методика передбачала асептичність технології, використання в експерименті переважно синцитіохоріальної частини плаценти, максимальне звільнення фрагментів плаценти від клітин крові, фібриноїду, децидуальної оболонки та елементів, які не належать до ворсин плаценти, проте можуть бути отримані разом з ними. У якості кріоконсерванта застосовували суміш розчинів гідроксиетилкрохмалю та диметилсульфоксиду, заморожували фрагменти за двоетапною програмою з застосуванням ініціації кристалоутворення та зберігали в кріобанку при -196°C . Термін від отримання плаценти до занурення КФП в азот не перевищував 8 годин. Розморожували КФП стандартним методом на водяній бані за температури 41°C до появи рідкої фази [11].

В експерименті використовували 5- та 18-місячних самців і самиць щурів лінії Вістар, яких розділили на групи: 1 – 18-місячні самиці з імплантацією КФП; 2 – 18-місячні хібнооперовані самиці; 3 – 18-місячні самці з імплантацією КФП; 4 – 18-місячні хібнооперовані самці; 5 – 5-місячні самці; 6 – 5-місячні самиці. У групах спостереження (1 та 3) було використано по 20, а у групах порівняння (2, 4–6) – по 15 тварин. Імплантацію здійснювали під інфільтраційною анестезією 1,0 мл 0,25%-го розчину новокаїну. На зовнішній ділянці правого стегна робили розріз довжиною 1 см та формували підшкірну кишеньку, у якій розташовували КФП, після

nelles may appear. The damaged proteins are accumulated in the body of the elderly people contribute to the pathogenesis of cataract, Alzheimer's, Parkinson's diseases, etc. [1, 6, 8]. Examining the influence of CPF on the processes of free radical oxidation (FRO) and activity of antioxidant system (AOS) in late ontogeny specifies a pathogenic focus and efficiency of placental therapy to treat a geriatric pathology [16].

This research aim was to study the state of prooxidant-antioxidant balance in tissues of liver, gonads and blood in 18-month-old rats after implantation of cryopreserved human placental fragments.

Materials and methods

Placenta was obtained after physiological labors from women with their preliminary informed consent. The fragments of human placenta were obtained and cryopreserved according to the previously developed method [11, 13]. This technique is aseptic, utilizes mainly syncytio-chorial part of the placenta, provides the maximum release of placental fragments of blood cells, fibrinoid, decidual membrane and the elements which are not referred to the placenta villi, but can be derived together. As a cryopreservative we have used the mixture of the hydroxyethyl starch and dimethyl sulfoxide solutions, the fragments were frozen by two-step program with initiation of crystal formation and stored in the cryobank at -196°C . The term from the moment of placenta deriving to the plunging of CPF into liquid nitrogen did not exceed 8 hrs. The CPF were thawed by standard method in a water bath at a temperature of 41°C up to a liquid phase appearance [10].

In the experiment we have used 5- and 18-month-old male and female Wistar rats, which were divided into following groups: 1 – 18-month-old females with implanted CPF; 2 – 18-month-old sham-operated females; 3 – 18-month-old males with implanted CPF; 4 – 18-month-old sham-operated males; 5 – 5-month-old males; 6 – 5-month-old females. In observation groups (1 and 3) 20 animals were used and the comparison groups (2, 4–6) comprised 15 animals. Implantation was performed under infiltration anesthesia with 1.0 ml of 0.25% Novocaine solution. The outer section of right thigh was cut with 1 cm length and a subcutaneous pocket was formed wherein CPF were placed, afterwards the incision was catgut sutured. Sham-operated animals from the comparison groups (2 and 4) were subjected to a similar intervention, but without implanting the CPF. The doses were calculated by the method from pre-clinical study of geriatric drugs [15].

Examining the impact of CPF on animals of late ontogenesis was performed with special emphasis on the peculiarities of the organism, mostly changed during aging and reflected its dynamics, as well as significantly affected the life quality in elderly age. The tests

цього розріз ушивали кетгуттом. Хибнооперованим тваринам у групах порівняння (2 та 4) проводили аналогічне втручання, але без імплантації КФП. Дози препаратів розраховували за методикою доклінічного вивчення геріатричних препаратів [2].

Під час визначення впливу КФП на організм тварин пізнього онтогенезу звертали увагу на ті особливості організму, які, перш за все, змінюються у процесі старіння, віддзеркалюють його динаміку та суттєво впливають на якість життя в похилому віці. Для дослідження обрали кров, печінку та статеву систему (гонади). Оцінювали стан прота антиоксидантної систем у органах і сироватці крові.

Усі процедури з дослідними щурами виконували керуючись міжнародними правилами та нормами. Експерименти на тваринах проводили відповідно до «Загальних принципів експериментів на тваринах», ухвалених VI Національним конгресом із біоетики (Київ, 2016) та узгоджених із положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986). Протоколи експериментів були затверджені комітетом з біоетики Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (протокол №2 від 03.06.2013).

Вимірювання вмісту гідроперекисів ліпідів у мікросомах печінки проводили за методом H. Ohkawa [10], а у плазмі крові – за методом T. Asakawa [5]. Вміст гідроперекисів ліпідів у мітохондріях печінки визначали в екстрагованих за Фолчем загальних ліпідах [10]. Спектр поглинання забарвленого продукту реєстрували на двопроменевому спектрофотометрі «Specord UV VIS» («Solar», Білорусь) та вимірювали різницю екстинкцій при $\lambda = 535$ і 520 нм. Вміст гідроперекисів ліпідів розраховували в еквівалентній кількості малонового диальдегіду (МДА), коефіцієнт молярної екстинкції приймали рівним $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ на 1 мг білка мікросом, 1 мл плазми крові або 1 мг загальних ліпідів мітохондрій.

Вимірювання швидкості накопичення МДА при перекисному окисленні ліпідів (ПОЛ) проводили у гомогенатах тканин, ізольованих мітохондріях і мікросомах. Для вимірювання швидкості накопичення МДА при спонтанному ПОЛ до 1,8 мл інкубаційного середовища, яке містить 100 мМ трис-НСІ буфер (рН 7,4), додавали 0,2 мл гомогенату досліджуваної тканини. У випадку аскорбат-індукованого ПОЛ середовище додатково містило 0,5 мМ аскорбат, а аскорбат-ADP- Fe^{2+} -індукованого ПОЛ – 0,5 мМ аскорбат, 4 мМ ADP, 12 мкМ солі Мора. При дослідженні інтенсивності ПОЛ в ізольованих мітохондріях і мікросомах, окрім наведених вище, використовували середовище, яке містило 100 мМ

were performed in blood, liver and reproductive system (gonads). The state of pro- and antioxidant systems in organs and blood serum were evaluated.

All the procedures in experimental rats were performed according the international regulations, in particular in compliance with to the General Principles of Experiments in Animals, approved by the 6th National Congress in Bioethics (Kyiv, 2016) and the statements of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986). Protocols of the experiments were approved by the Committee in Bioethics of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine (Protocol №2, dated of June 03, 2013).

Lipid hydroperoxides content in liver microsomes were measured as reported by H. Ohkawa [9] and those in plasma were assessed by the method of T. Asakawa [2]. The content of lipid hydroperoxides in liver mitochondria was determined by Folch extraction procedure [9]. The absorption spectrum of the stained product was recorded with the double-beam spectrophotometer Specord UV VIS (Solar, Belarus) and an extinction difference was measured at $\lambda = 535$ and 520 nm. The content of lipid hydroperoxides was calculated as the equivalent amount of malondialdehyde (MDA), assuming the molar extinction coefficient equal to $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ per 1 mg microsomal protein, 1 ml of plasma or 1 mg total lipids of mitochondria.

Rate of MDA accumulation during lipid peroxidation (LPO) was measured in homogenates of tissues, isolated mitochondria and microsomes. To measure the accumulation rate of MDA during spontaneous lipid peroxidation the incubation medium of 1.8 ml, containing 100 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), was supplemented with 0.2 ml homogenate of the studied tissue. In ascorbate-induced LPO the medium additionally contained 0.5 mM ascorbate, and in case of ascorbate-ADP- Fe^{2+} -induced LPO the additives were 0.5 mM ascorbate, 4 mM ADP and 12 μM Mohr's salt. When investigating the LPO intensity in isolated mitochondria and microsomes, in addition to the above, we used the medium that contained 100 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4), 1 mM NADPH, 4 mM ADP, 12 μM Mohr's salt. The method of G.I. Klebanov [3] was used to find the content of MDA. Herewith the absorption spectrum of TBA-reactive substances was recorded with the double-beam spectrophotometer Specord UV VIS (Solar), the extinction difference was measured at 535 nm and 580 nm and the amount of MDA was calculated, assuming the extinction coefficient equal to $1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Catalase activity was measured in post-mitochondrial fraction of liver homogenate and red blood cells with spectrophotometric method at $\lambda = 240$ nm [7] in 10 mM K^+ -phosphate buffer (pH 7.4) with 0.1 mM EDTA, 15 mM H_2O_2 (37°C).



трис-НСІ буфер (рН 7,4), 1 мМ NADPH, 4 мМ ADP, 12 мкМ солі Мора. За методом Г.И. Клебанова [3] визначали вміст МДА. При цьому записували спектр поглинання ТБК-активних продуктів на двопробневу спектрофотометрі «Specord UV VIS» («Solar»), вимірювали різницю екстинкції при довжині хвиль 535 і 580 нм і розраховували кількість МДА, приймаючи коефіцієнт екстинкції рівним $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

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

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

Глутатіонредуктазну активність у постмітохондріальній фракції печінки вимірювали спектрофотометричним методом за зменшення рівня NADPH [4, 5] у середовищі, яке містило 50 мМ K^+ -фосфатний буфер (рН 7,4), 1 мМ EDTA, 0,16 мМ NADPH, 1 мМ GSSG та 0,2% тритон X-100 за температури 37°C. Активність визначали в наномолях NADPH/хв·мг білка з використанням коефіцієнта молярної екстинкції $6,22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Вміст церулоплазміну (ЦП) визначали у плазмі крові з використанням середовища, яке містило 0,1 М ацетатного буфера (рН 5,5) і 0,1% парафенілендіаміну [10]. Плазму крові додавали в кількості 0,02 мл на 2 мл реакційного середовища. Тривалість інкубації складала годину за температури 37°C. Реакцію зупиняли додаванням 0,01% азиду натрію. Коефіцієнт поглинання в зразках при $\lambda = 530 \text{ нм}$, вміст ЦП визначали в наномолях на мілілітр плазми крові, використовуючи коефіцієнт перерахунку 5,83.

Вміст шиффових основ (ШО) у гомогенатах тканин і мітохондріях печінки вимірювали флуориметричним методом після їх екстракції (хлороформом і метанолом у співвідношенні 1:2) з суспензії органел. Дані представляли у відносних одиницях, приймаючи інтенсивність флуоресценції 1 мкг хінінсульфату в 1 мл 0,1 N H_2SO_4 за 1950 од. [13].

Глутатіонпероксидазну (ГП) активність визначали в гомогенатах, цитозолі, мітохондріях тканин, еритроцитах, плазмі та сироватці крові спектрофотометрично при $\lambda = 340 \text{ нм}$ за методом D.E. Paglia в нашій модифікації [10] у 50 мМ K^+ ,

Glutathione-S-transferase activity was measured in mitochondria, microsomes and liver homogenate post-mitochondrial fraction with spectrophotometric method at $\lambda = 340 \text{ nm}$ [4, 5] in the medium with 0.1 M K^+ -phosphate buffer (pH 6.5), 1 μM 1-chloro-2,4-dinitrobenzene, 5 mM GSH and 0.2% Triton X-100 (37°C). The activity was calculated using a molar extinction coefficient of $9.6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

Glutathione reductase activity in post-mitochondrial fraction of liver was measured spectrophotometrically by decreasing of level of NADPH [2, 7] in the medium that contained 50 mM K^+ -phosphate buffer (pH 7.4), 1 mM EDTA, 0.16 mM NADPH, 1 mM GSSG and 0.2 Triton X-100 at 37°C. The activity was measured in nmol of NADPH/min×mg of protein using a molar extinction coefficient of $6.22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

The content of ceruloplasmin (CP) was examined in plasma using the medium that contained 0.1 M acetate buffer (pH 5.5) and 0.1% paraphenylenediamine [9]. Blood plasma was added in an amount of 0.02 ml per 2 ml of reaction medium. The duration of incubation was an hour at 37°C. The reaction was stopped by adding 0.01% sodium azide. The absorption coefficient in samples at $\lambda = 530 \text{ nm}$, the CP content was measured in nmol/ml of blood plasma using a conversion factor of 5.83.

The content of Schiff bases (SB) in homogenates of tissues and liver mitochondria was measured by flow cytometry after their extraction (chloroform and methanol in the 1: 2 ratio) from the suspension of organelles. The data are presented in relative units, assuming the fluorescence intensity of 1 mg quinine sulfate in 1 ml of 0.1 N H_2SO_4 for 1950 units [12].

Glutathione peroxidase (GP) activity was determined in homogenates, cytosol, mitochondria of tissues, red blood cells, plasma and blood serum spectrophotometrically at $\lambda = 340 \text{ nm}$ by the method of D.E. Paglia in our own modification [9] in 50 mM K^+ , Na^+ -phosphate buffer (pH 7.4) containing 1 mM EDTA, 0.15 mM NADPH, 1 unit of glutathione yeast, 0.2% Triton X-100 and 3 mM sodium azide to inhibit catalase. Cumene hydroperoxide was added at 37°C in a concentration of 1.2 mM and hydrogen peroxide at 0.4 mM. The activity was expressed as nmol NADPH /min per mg of protein or ml of serum, taking into account the molar extinction coefficient $6.22 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

In this research we used the following reagents: NADPH, GSH, GSSG, Tris(oxymethyl) aminomethane, adrenaline, human serum albumin, mannite (Reanal, Hungary); Triton X-100 (Ferak, Germany); cumene hydroperoxide, KH_2PO_4 , sodium azide (Merk, Germany); glutathione reductase, CaCl_2 , Na_2HPO_4 , NaHCO_3 (Sigma, USA); nitrotetrazolium blue (Chemapol, Czech Republic), xanthine oxidase (Serva, USA);



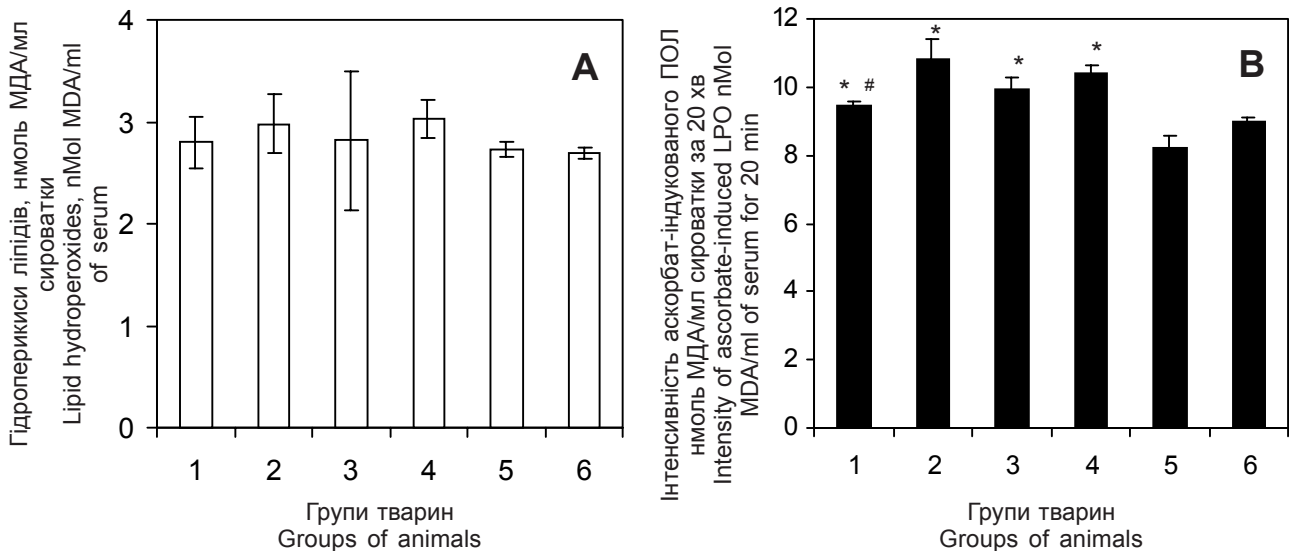


Рис. 1. Вміст гідроперекисів ліпідів (А) та інтенсивність аскорбат-Fe²⁺-індукованого ПОЛ (В) у сироватці крові молодих та старих щурів у контролі та після введення КФП: 1 – старі самиці з імплантацією КФП; 2 – старі хибнооперовані самиці; 3 – старі самці з імплантацією КФП; 4 – старі хибнооперовані самці; 5 – молоді самці; 6 – молоді самиці. Статистично значуща різниця показників молодих (*) та старих тварин (#), *p* < 0,05.

Fig. 1. Content of lipid hydroperoxides (A) and intensity of ascorbate-Fe²⁺-induced lipid peroxidation (B) in blood serum of young and aged rats in control and with introduction of CPF: 1 – aged females with implanted CPF, 2 – sham-operated aged females; 3 – aged males with implanted CPF; 4 – sham-operated aged males; 5 – young males; 6 – young females. Statistically significant difference of the indices in the groups of young (*) and aged (#) animals, *p* < 0.05.

Na⁺-фосфатному буфері (pH 7,4), який містив 1 мМ ЕДТА, 0,15 мМ NADPH, 1 од. глутатіонредуктази дріжджів, 0,2% тритон X-100 і 3 мМ азиду натрію для інгібування каталази. Гідроперекис кумолу додавали за температури 37°C у концентрації 1,2 мМ, перекис водню – 0,4 мМ. Активність виражали в наномолях NADPH/хв на 1 мг білка або 1 мл сироватки з урахуванням коефіцієнта молярної екстинкції 6,22 × 10³ М⁻¹·см⁻¹.

У роботі використовували такі реактиви: NADPH, GSH, GSSG, трис(оксиметил)амінометан, адреналін, людський сироватковий альбумін, манніт («Reanal», Угорщина); тритон X-100 («Ferak», Німеччина); гідроперекис кумолу, КН₂РO₄, азид натрію («Merk», Німеччина); глутатіонредуктазу, СаСl₂, Na₂НРO₄, NaHCO₃ («Sigma», США); нітротетразолій синій («Chemapol», Чехія), ксантинооксидаза («Serva», США); α-токоферол («ICN», США), а також реактиви вітчизняного виробництва кваліфікації «чда», «хч» та «осч».

Для перевірки статистичної значущості різниці між виборками застосовували критерій Стьюдента. Для статистичних розрахунків та обробки даних використовували комп'ютерну програму «Statgraphics V 2.1» («Statpoin Technologies Inc.», США).

Результати та обговорення

Відповідно до вільнорадикальної теорії старіння з віком суттєво змінюється інтенсивність процесів ВРО та функціональна активність АОС. Водночас наявні дані щодо впливу біопрепаратів плацен-

α-tocopherol (ICN, USA) and reagents of home production graded as ‘pure for analysis’, ‘chemically pure’ and ‘extra pure’.

To check the statistical significance of the differences between the samples the Student test was used. For statistical calculations and data processing we used the software Statgraphics V 2.1 (Statpoin Technologies Inc., USA).

Results and discussion

The free radical theory of aging supposes that the FRO intensity and functional activity of AOS undergo significant changes with age. At the same time, available data on the impact of biological products of placental origin stipulated the need of studying the effect of CPF on FRO/AOS in the late ontogenesis. The decisive role here was played by the features of the course and regulation of FRO in various systems and levels of organization. Our findings could be used not only to report the changes, but to describe the mechanisms and levels of regulatory action as well.

In particular, the investigation of the indices of prooxidant system in serum of experimental rats (Fig. 1) revealed that the content of lipid hydroperoxides in all the studied groups almost did not differ. The intensity of ascorbate-induced LPO in elderly females was increased significantly, after the implantation of CPF this value declined slightly, but did not reach the level of young animals. For aged males the ascorbate-induced LPO was significantly different from that of young animals regardless of the type of treatment.



тарного походження обумовили актуальність дослідження дії КФП на ВРО/АОС у період пізнього онтогенезу. Вирішальну роль відіграють особливості перебігу та регуляції ВРО у різних системах і рівнях організації. На основі отриманих даних можна не тільки констатувати виявлені зміни, а й описати механізми та рівні регуляторної дії.

Так, під час дослідження показників прооксидантної системи у сироватці експериментальних щурів (рис. 1) виявлено, що вміст гідроперексидів ліпідів в усіх досліджуваних групах майже не відрізнявся. Інтенсивність аскорбат-індукованого ПОЛ у самиць старшого віку вірогідно підвищувалася, після імплантації КФП цей показник незначно знижувався, але не досягав рівня молодих тварин. У старих самців рівень аскорбат-індукованого ПОЛ значуще відрізнявся від показників молодих тварин незалежно від лікування.

Під час вивчення активності АОС щурів досліджуваних груп було виявлено, що зі старінням значуще зменшувалися активність ГП і вміст ферментативно активного ЦП у сироватці крові. Після введення КФП ці показники вірогідно зростали, але не досягали рівня молодих тварин (рис. 2).

При дослідженні показників прооксидантної системи в печінці експериментальних тварин виявлено, що рівень первинних продуктів ПОЛ (гідроперексиди ліпідів) і кінцевих продуктів ПОЛ (ШО) з віком значуще збільшувався. Застосування КФП призводило до незначного зниження ($p > 0,05$) рівнів гідроперексидів ліпідів і значущого – ШО (табл. 1).

При визначенні активності антиоксидантних ферментів у пост'ядерній фракції печінки досліджуваних груп встановлено, що активність каталази, ГП та глутатіонредуктази у тварин пізнього онтогенезу значуще зменшувалася. Показники глутатіон трансферази не змінювалися. Виявленим зростанням вільнорадикальної активності при зменшенні антиоксидантного потенціалу пояснюється ушкодження мембран гепатоцитів, гіпоксія печінки, її деструктуризація. На фоні введення старим щурам КФП спостерігалось відновлення активності АОС практично до рівня молодих тварин (табл. 2).

Таблиця 1. Вміст гідроперексидів ліпідів та Шифових основ у пост'ядерній фракції гомогенатів печінки та статевих залозах молодих та старих щурів

Table 1. Content of lipid hydroperoxides and Schiff bases of post-nuclear fraction bases in homogenates of liver and gonads of young and aged rats

Групи тварин Groups of animals	Гідроперексиди ліпідів, нмоль МДА/мл сироватки Lipid hydroperoxides, nmol MDA/ml serum		ШО, ум. од./мг білка SB, arb. units protein	
	Печінка Liver	Статеві залози Gonads	Печінка Liver	Статеві залози Gonads
1	0,798 ± 0,074	2,08 ± 0,29	13,59 ± 1,54 *.&	17,87 ± 1,75
2	0,892 ± 0,055*	2,46 ± 0,53	17,93 ± 1,25*	20,08 ± 1,98
3	0,809 ± 0,054	2,06 ± 0,34	14,52 ± 1,33 #	15,85 ± 1,36 #
4	0,898 ± 0,046*	2,43 ± 0,43	17,31 ± 1,52*	19,89 ± 1,82*
5	0,758 ± 0,044	1,61 ± 0,29	12,80 ± 0,23	15,54 ± 0,71
6	0,749 ± 0,032	1,48 ± 0,16	12,01 ± 0,13	16,95 ± 0,07

Примітки: * – різниця значуща порівняно з групами молодих тварин, $p < 0,05$; & – різниця значуща порівняно з групами старих тварин, $p < 0,05$; # – різниця значуща порівняно з показниками в групах старих тварин, $p < 0,1$.

Note: * – significant of difference with indices in groups of young animals, $p < 0.05$; & – significant of difference in the groups of aged animals, $p < 0.05$; # – significant of difference with indices in groups of aged animals, $p < 0.1$.

Study of AOS activity in rats of the experimental groups showed that GP activity and the content of enzymatically active CP in serum significantly declined with aging. After administration of CP these values significantly increased, but did not reach the counts of young animals (Fig. 2).

During studying the indices of prooxidant system in liver of experimental animals we revealed that primary products of LPO (lipid hydroperoxides) and the final products of LPO (SB) were strongly elevated with age. Application of CPF led to insignificant decrease ($p > 0.05$) of the levels of lipid hydroperoxides and significant one in SB (Table 1).

Investigation of activity of antioxidant enzymes in liver post-nuclear fraction of the studied groups revealed a significantly decreased activity of catalase, GP and glutathione reductase in late ontogeny animals. The revealed rise in free radical activity together with reducing antioxidant potential could explain the injury of membranes of hepatocytes, hypoxia of liver and its changes in its structure. During introduction of CPF to aged rats we observed the restoration of the AOS response almost to the level of young animals (Table 2).

Analysis of the obtained indices of prooxidant system in the gonads (ovaries and testes) of the animals had shown that there were virtually no differences in the amount of lipid hydroperoxides in all the groups of



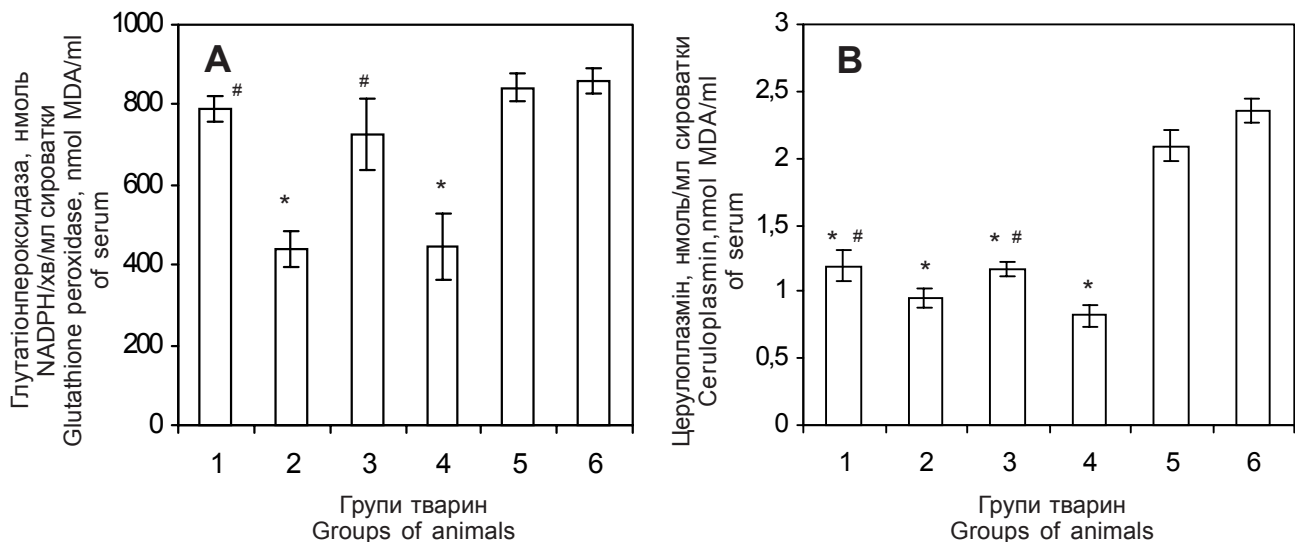


Рис. 2. Se-залежна глутатіонпероксидазна активність (А) та вміст ферментативно-активного церулоплазміну (В) в сироватці крові молодих та старих щурів у контролі та при дії КФП: 1 – старі самиці з імплантацією КФП; 2 – старі хібнооперовані самиці; 3 – старі самці з імплантацією КФП; 4 – старі хібнооперовані самці; 5 – молоді самиці; 6 – молоді самиці. Статистично значуща різниця показників із групами молодих (*) та старих (#) тварин, $p < 0,05$.

Fig. 2. Se-dependent glutathione peroxidase activity (A) and content of enzymatically-active ceruloplasmin (B) in serum of young and aged rats in the control and under the effect of CPF: 1 – aged female implanted with CPF; 2 – sham-operated aged females; 3 – aged males implanted with CPF; 4 – sham-operated aged males; 5 – young females; 6 – young females. Statistically significant difference of the indices in the groups of young (*) and aged (#) animals, $p < 0.05$.

Результати аналізу отриманих показників прооксидантної системи у статевих залозах (сім'яниках та яєчниках) тварин показали, що рівень гідроперекисів ліпідів майже не відрізнявся в усіх групах

animals. At the same time, the level of SB in the group of rats of late ontogeny males was significantly higher and after the application of CPF it was lowered to the level of young animals (see Table 1).

Таблиця 2. Активність антиоксидантних ферментів у пост'ядерній фракції клітин печінки та статевих залоз тварин у групах спостереження

Table 2. Activity of antioxidant enzymes in post-nuclear fraction of cells of liver and gonads of animals in the observation group

Групи тварин Groups of animals	Каталаза, мкмоль H_2O_2 /хв \times мг білка Catalase, $\mu\text{mol } H_2O_2/\text{min} \times \text{mg protein}$		ГП, нмоль NADPH/хв \times мг білка GP, $\text{nmol NADPH}/\text{min} \times \text{protein}$		Глутатіон S трансфераза, нмоль NADPH/хв \times мг білка Glutathione S Transferase, $\text{nmol NADPH}/\text{min} \times \text{mg protein}$		Глутатіонредуктаза, нмоль NADPH/хв \times мг білка Glutathione Reductase, $\text{nmol NADPH}/\text{min} \times \text{mg protein}$	
	Печінка Liver	Статеві залози Gonads	Печінка Liver	Статеві залози Gonads	Печінка Liver	Статеві залози Gonads	Печінка Liver	Статеві залози Gonads
1	419,8 \pm 14,68 ^{&}	389,7 \pm 13,78 ^{&}	227,4 \pm 16,7 ^{&}	225,7 \pm 11,2 ^{&}	750,2 \pm 98,9	750,0 \pm 14,5	96,4 \pm 3,4 [#]	93,5 \pm 2,2 [*]
2	321,3 \pm 17,5 [*]	331,4 \pm 18,5 [*]	149,0 \pm 22,1 [*]	177,0 \pm 23,7 [*]	714,7 \pm 26,3	719,6 \pm 22,1	78,2 \pm 9,0 [*]	88,2 \pm 9,1
3	422,2 \pm 16,89 ^{&}	382,2 \pm 15,90 ^{&}	219,4 \pm 14,8 ^{&}	217,9 \pm 11,8 ^{&}	746,2 \pm 58,9	756,2 \pm 18,5	92,4 \pm 3,9	92,8 \pm 4,1
4	329,3 \pm 13,2 [*]	311,2 \pm 14,2 [*]	178,0 \pm 13,8 [*]	186,5 \pm 18,1 [*]	736,3 \pm 27,2	730,5 \pm 23,9	84,5 \pm 7,3	85,6 \pm 8,7
5	387,4 \pm 10,2	392,4 \pm 8,3	228,6 \pm 6,6	230,6 \pm 7,5	769,9 \pm 12,1	767,8 \pm 11,2	97,3 \pm 3,1	98,4 \pm 2,1
6	390,0 \pm 13,4	391,6 \pm 11,1	238,6 \pm 4,5	233,4 \pm 6,5	755,0 \pm 12,9	759,2 \pm 11,9	103,9 \pm 4,1	100,6 \pm 3,3

Примітки: * – різниця значуща порівняно з групами молодих тварин, $p < 0,05$; & – різниця значуща порівняно з групами старих тварин, $p < 0,05$; # – різниця значуща порівняно з показниками в групах старих тварин, $p < 0,1$.

Note: * – significant of difference with indices in groups of young animals, $p < 0.05$; & – significant of difference in the groups of aged animals, $p < 0.05$; # – significant of difference with indices in groups of aged animals, $p < 0.1$.



тварин. У той самий час рівень ШО у групі самців пізнього онтогенезу був значущо вищим, а після застосування КФП знижувався до рівня молодих тварин (див. табл. 1).

При визначенні активності антиоксидантних ферментів у пост'ядерній фракції клітин статевих залоз досліджуваних груп суттєвого коливання активності глутатіонредуктази не виявлено. Активність каталази, ГП та глутатіонтрансферази у тварин пізнього онтогенезу значущо зменшувалася, а після застосування КФП відновлювалася практично до рівня контрольної групи тварин (табл. 2). Змін активності глутатіонтрансферази не виявлено в жодному випадку, деякі зміни глутатіонредуктази спостерігали у самиць, але вони були менш значущими.

Таким чином, при дослідженні показників прота антиоксидантної систем у сироватці крові, печінці та статевих залозах виявлено, що з віком спостерігається активація прооксидантних процесів, а після застосування КФП відновлюється активність основних антиоксидантних ферментів. Цей факт узгоджується з літературними даними [16]. Більш виражений ефект спостерігається у самців, що пояснюється рівномірним функціонуванням статевої та інших систем, а також більш короткою тривалістю життя. У самиць із віком активність статевої системи різко падає, та її неможливо відновити у зв'язку з закінченням фолікулярного резерву [6].

Висновки

У результаті проведеного дослідження виявлено, що з віком спостерігається активація прооксидантних процесів у сироватці крові, печінці та статевих залозах, особливо у самців. Застосування препаратів плаценти дозволяє нормалізувати прота антиоксидантний баланс в організмі за рахунок активації каталази, пероксидази, церулоплазміну.

Виявлене підвищення активності антиоксидантної системи під час застосування КФП можна визнати складовою механізму різновекторної корекції сенильно-інволютивних змін. Це дає змогу у майбутньому створювати терапевтичні програми геріатричної патології з використанням кріоконсервованих плацентарних структур. У подальшому планується вивчення механізмів впливу КФП на організм тварин різного віку.

Література

1. Анисимов В.Н. Молекулярные и физиологические механизмы старения: 2-е издание, перераб. и доп. – СПб.: Наука, 2008. – 481 с.
2. Доклінічні дослідження лікарських засобів: Методичні рекомендації / За ред. О.В. Стефанова. – К.: Авіцена, 2001. – 528 с.

Assessment of antioxidant enzymes activity in post-nuclear fraction of gonadal cells in the studied groups revealed no significant fluctuations in the activity of glutathione reductase. The activity of catalase, glutathione transferase and GP in late ontogeny animals was significantly reduced and after application of CPF it recovered almost to the level of the control group animals (Table 2). No changes of glutathione transferase were found in any case, some changes in glutathione reductase were observed in females, but the difference was statistically insignificant.

Thus, the study of indices of pro- and antioxidant systems in serum, liver and gonads revealed that ageing is accompanied with an activation of oxidative processes and applying of CPF resulted in restoration of activity of major antioxidant enzymes, that agreed with the reports on placental stem cells [16]. A more pronounced effect was observed in males, that could be explained by a uniform function of reproductive and other systems, as well as a shorter life span. Aging females suffer from a drop in reproductive system activity, and this can not be restored due to the exhausted follicular reserve [3].

Conclusions

The performed study enabled to reveal an age-dependent activation of pro- and antioxidant processes in blood serum, liver and gonads, especially in males. The application of placental preparations allowed to improve the pro-/antioxidant balance in an organism through the activation of catalase, peroxidase and ceruloplasmin.

The revealed increased activity of antioxidant system after application of CPF could be considered as a part of the mechanism of versatile correction of senile involutive changes. This allows the future creation of the protocols to treat the geriatric pathologies using the cryopreserved placental structures. We are planning to study the mechanisms of CPF effect on animals of various ages.

References

1. Anisimov V.N. Molecular and physiological mechanisms of aging: 2nd edition, revised and enlarged. Saint-Petersburg. Nauka; 2008.
2. Asakawa T., Matsushita S. Coloring condition of thiobarbituric acid test for detecting lipid hydroperoxides. *Lipids* 1980; 15(3): 137–140.
3. Farhat M.Y., Lavigne M.C., Ramwell P.W. The vascular protective effects of estrogen. *FASEB J* 1996; 10 (5): 615–624.
4. Jonathan R.C., Saltzman B.M., Yanke A.B., Cole B.J. Derived products in sports medicine: basic science, early results, and potential clinical applications. *Am J Sports Med* 2016; 44(9): 2425–2434.
5. Klebanov G.I., Babenkova I.V., Teselkin Yu.O. et al. Assessment of antioxidant activity of blood plasma. *Laboratornoye Delo* 1988; (5): 59–62.

3. Клебанов Г.И., Бабенкова И.В., Теселкин Ю.О. Оценка антиокислительной активности плазмы крови // Лабораторное дело. – 1988. – №5. – С. 59–62.
4. Ланкин В.З., Гуревич С.М. Ингибирование перекисления липидов и детоксикация липоперекисей защитными ферментными системами (супероксид-дисмутаза, глутатионпероксидаза и глутатион-редуктаза) при экспериментальном злокачественном росте // Доклады АН СССР. – 1976. – Т. 226, №3. – С. 705–708.
5. Asakawa T., Matsushita S. Coloring condition of thiobarbituric acid test for detecting lipid hydroperoxides // Lipids. – 1980. – Vol. 15, №3. – P. 137–140.
6. Farhat M.Y., Lavigne M.C., Ramwell P.W. The vascular protective effects of estrogen // FASEB J. – 1996. – Vol. 10, №5. – P. 615–624.
7. Jonathan R.C., Saltzman B.M., Yanke A.B., Cole B.J. Derived products in sports medicine: basic science, early results, and potential clinical applications // Am. J. Sports Med. – 2016. – Vol. 44, №9. – P. 2425–2434.
8. Kumara S., Lombard D.B. Finding Ponce de Leon's pill: challenges in screening for anti-aging molecules // F1000Rev. – 2016. – 06.
9. Lopez-Otin C., Blasco M.A., Partridge L. et al. The hallmarks of aging // Cell. – 2013. – Vol. 153, №6 – P. 1194–1217.
10. Ohkawa H., Ohahi N., Jadi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction // Anal. Biochem. – 1979. – Vol. 95, №2. – P. 351–358.
11. Pogozhykh D., Pogozhykh O., Mueller T., Prokopyuk O. Influence of factors of cryopreservation and hypothermic storage on survival and functional parameters of multipotent stromal cells of placental origin // PLoS One. – 2015. – Vol.10, № 10. – P. 1–25.
12. Prokopyuk V. Yu., Prokopyuk O.S., Musatova I.B. et al. Safety of placental, umbilical cord and fetal membrane explants after cryopreservation // Cell and Organ Transplantation. – 2015. – Vol. 3, №1. – P. 34–38.
13. Ravin H.A. Rapid test for hepatocellular degeneration // Lancet. – 1956. – Vol. 1. – P. 7267–7271.
14. Schevchenko N.O., Somova K.V., Prokopyuk V.Yu. et al. Dynamics of activity and duration of functioning of cryopreserved cryoextract, placental cells and fragments in the organism of experimental animals // Morphologia. – 2016. – Vol. 10, №2. – P. 93–98.
15. Silini A.R., Parolini O., Cargnoni A., Magatti M. et al. The long path of human placenta, and its derivatives, in regenerative medicine // Front. Bioeng. Biotechnol. – 2015. – Vol. 19, №3. – P. 162.
16. Xie C., Jin J., Lv X., Tao J. et al. Antiaging effect of transplanted amniotic membrane mesenchymal stem cells in a premature aging model of Bmi-1 deficiency // Sci. Rep. – 2015. – Vol. 5. – P. 13975.
6. Kumara S., Lombard D.B. Finding Ponce de Leon's pill: challenges in screening for anti-aging molecules. F1000Rev 2016; 06.
7. Lankin V.Z., Gurevich S.M. Inhibition of lipid peroxidation and detoxification of lipid peroxides with protective enzyme systems (superoxide dismutase, glutathione peroxidase and glutathione reductase) in experimental malignant growth. Reports of Academy of Sciences of USSR 1976; 226(3): 705–708.
8. Lopez-Otin C., Blasco M.A., Partridge L. et al. The hallmarks of aging. Cell 2013; 153(6): 1194–1217.
9. Ohkawa H., Ohahi N., Jadi R. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal Biochem 1979; 95(2): 351–358.
10. Pogozhykh D., Prokopyuk V., Pogozhykh O. et al. Influence of factors of cryopreservation and hypothermic storage on survival and functional parameters of multipotent stromal cells of placental origin. PLoS One 2015; 10(10): 1–25.
11. Prokopyuk V.Yu., Prokopyuk O.S., Musatova I.B. et al. Safety of placental, umbilical cord and fetal membrane explants after cryopreservation. Cell and Organ Transplantation 2015; 3(1): 34–38.
12. Ravin H.A. Rapid test for hepatocellular degeneration. Lancet 1956; 1: 7267–7271.
13. Schevchenko N.O., Somova K.V., Prokopyuk V.Yu. et al. Dynamics of activity and duration of functioning of cryopreserved cryoextract, placental cells and fragments in the organism of experimental animals. Morphologia 2016; 10(2): 93–98.
14. Silini A.R., Cargnoni A., Magatti M. et al. The long path of human placenta, and its derivatives, in regenerative medicine. Front Bioeng Biotechnol 2015; 19(3): 162.
15. Stefanov O.V., editor. Preclinical trials of medicines [guidelines]. Kyiv: Avitsena; 2001.
16. Xie C., Jin J., Lv X. et al. Antiaging effect of transplanted amniotic membrane mesenchymal stem cells in a premature aging model of Bmi-1 deficiency. Sci Rep 2015; 5: 13975.

