

УДК 612.681: 611.013.85+ 615.361

В.Ю. Прокопюк^{1*}, О.В. Чуб¹, Н.А. Шевченко¹, О.В. Фалько¹,
И.Б. Мусатова¹, В.В. Лазуренко², А.Н. Тищенко², О.С. Прокопюк¹

Криоконсервированные экспланты плаценты увеличивают продолжительность жизни мышей-самцов и изменяют показатели выживаемости мышей-самок

UDC 612.681: 611.013.85+ 615.361

V.Yu. Prokopyuk^{1*}, O.V. Chub¹, N.A. Shevchenko¹, O.V. Falko¹,
I.B. Musatova¹, V.V. Lazurenko², A.N. Tischenko², O.S. Prokopyuk¹

Cryopreserved Placental Explants Increase Lifespan of Male Mice and Change Survival Features of Female Mice

Реферат: По данным ВОЗ продолжительность жизни в современном мире увеличивается за счет снижения детской смертности, а не длительности и качества жизни старшего поколения. Большинство геропротекторов с доказанной эффективностью влияют на иммунную и нервную систему, клеточный цикл, метаболизм углеводов, стимулируют аутофагию. Подобными свойствами обладают биообъекты плацентарного происхождения. В настоящей работе исследовали влияние криоконсервированных эксплантов плаценты человека на продолжительность жизни мышей линии BALB/c, анализировали кривые выживаемости Каплана-Мейера, рассчитывали показатели выживаемости. Отличия определяли с помощью Log-rank теста. Показано, что имплантация криоконсервированных эксплантов плаценты экспериментальным животным значительно увеличивает следующие показатели у самцов: медиану продолжительности жизни – на 17,6%; среднюю продолжительность жизни – на 18,1%; 90%-ю выживаемость – на 20,8%; максимальную продолжительность жизни – на 17,9%. Введение эксплантов плаценты самкам не влияло на продолжительность их жизни, однако снижало вероятность смерти в репродуктивный период.

Ключевые слова: продолжительность жизни, выживаемость, мыши, плацента, криоконсервированные препараты.

Реферат: За даними ВООЗ тривалість життя у сучасному світі збільшується за рахунок зниження дитячої смертності, а не тривалості та якості життя старшого покоління. Більшість геропротекторів із доведеною ефективністю впливають на імунну та нервову систему, клітинний цикл, метаболізм вуглеводів, стимулюють аутофагію. Подібні властивості мають біооб'єкти плацентарного походження. У даній роботі досліджували вплив криоконсервованих експлантів плаценти людини на тривалість життя мишей лінії BALB/c, аналізували криві виживання Каплана-Мейера, розраховували різні показники виживаності. Різницю визначали за допомогою Log-rank тесту. Показано, що імплантація криоконсервованих експлантів плаценти експериментальним тваринам значущо збільшує наступні показники у самців: медіану тривалості життя – на 17,6%; середню тривалість життя – на 18,1%; 90%-ву виживаність – на 20,8%; максимальну тривалість життя – на 17,9%. Введення експлантів плаценти самицям не впливало на тривалість їхнього життя, однак знижувало ймовірність смерті у репродуктивний період.

Ключові слова: тривалість життя, виживаність, миші, плацента, криоконсервовані препарати.

Abstract: According to the WHO data, to date the population lifespan is increasing worldwide due to infant mortality decrease, rather than the duration and life quality of elderly people. Most effective geroprotectors affect the immune and nervous systems, cell cycle, metabolism of carbohydrates, stimulate autophagy. Bioobjects of placental origin possess similar properties. The research aim was to study the effect of cryopreserved human placental explants on lifespan of BALB/c mice. Kaplan-Meier survival curves were analyzed and survival indices were calculated. The differences were determined using the Log-rank test. It has been shown that implantation of cryopreserved placental explants to experimental animals significantly increases the indices in male mice as follows: median of lifespan – by 17.6%; average life expectancy – by 18.1%; 90% survival rate – by 20.8%; maximum lifespan – by 17.9%. The administration of placental explants to female mice did not affect their lifespan, but reduced the probability of death in the reproductive period.

Key words: lifespan, survival, mice, placenta, cryopreserved products.

На протяжении всей истории науки и, в частности, медицины, вопрос продления жизни остается самым сложным и интересным. Современная наука рассматривает данную проблему с точки зрения

Throughout the history of science and, in particular, medicine, the issue of extending the life span remains the most difficult and interesting. Modern science considers this problem from the point of view of pre-

¹Отдел криобиологии систем репродукции, Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

²Харьковский национальный медицинский университет, г. Харьков

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

²Kharkiv National Medical University, Kharkiv, Ukraine

*Автор, которому необходимо отправлять корреспонденцию:

ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61016;
тел.: (+38 057) 373-74-35, факс: (+38 057) 373-59-52,
электронная почта: v.yu.prokopiuk@gmail.com

*To whom correspondence should be addressed:

23, Pereyaslavskaya str., Kharkiv, Ukraine 61016;
tel.: +380 57 373 7435, fax: +380 57 373 5952,
e-mail: v.yu.prokopiuk@gmail.com

Поступила 20.12.2016

Принята в печать 27.01.2017

Received December, 20, 2016

Accepted January, 27, 2017

© 2017 V.Yu. 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.

сохранения качества жизни человека, его социальной активности и работоспособности. По данным ВОЗ продолжительность жизни сейчас увеличивается в основном за счет снижения показателя смертности детей в возрасте до пяти лет и в меньшей мере за счет продления жизни взрослого населения [20].

Основными причинами старения человека считаются генетическая детерминированность, укорочение теломер, эпигенетические факторы, нарушение протеостаза, метаболизма углеводов и клеточных взаимодействий, а также митохондриальная дисфункция, истощение запаса стволовых клеток [14].

Существующая база данных геропротекторов (<http://www.geroprotectors.org/>) содержит около 260 веществ, обладающих способностью продлевать жизнь различным организмам. Большинство геропротекторов с доказанной эффективностью влияют на иммунную и нервную систему, клеточный цикл, метаболизм углеводов, стимулируют аутофагию. Они по-разному действуют на женские и мужские особи, при этом в большей степени увеличивая продолжительность жизни последних. Многие геропротекторы (рапамицин, метформин, акарбоза, 17- α -эстрадиол, нордигидроауреновая кислота, спермидин, антиоксиданты, полипептиды) имеют выраженные побочные эффекты и используются в основном для лечения тяжелых заболеваний [8, 11–13]. Механизм действия рапамицина – препарата, назначаемого для предотвращения отторжения трансплантата, – связывают с ингибированием mTOR-рецепторов, воздействием на клеточный цикл, иммуносупрессией и регулированием аутофагии [7, 8]. Он позволяет увеличить показатель продолжительности жизни мышей на 10–26%, однако имеет ряд побочных действий: метаболическая дисфункция, гормональные нарушения, тестикулярная атрофия, онкопатология. Метформин применяется для лечения сахарного диабета 2 типа, поскольку его действие основано на активизации протеинкиназы и замедлении глюконеогенеза. Его применение увеличивает показатель продолжительности жизни мышей на 3,5–14%. Побочными эффектами метформина являются желудочно-кишечные расстройства, гипотиреоз, снижение уровня тестостерона [15]. Акарбоза – препарат для лечения сахарного диабета 2 типа, который является ингибитором глюкозидазы. При использовании этого лекарственного средства продолжительность жизни мышей увеличивается на 2–20% [11, 13]. Побочные реакции акарбозы чаще всего наблюдаются со стороны ЖКТ и печени. Действие 17- α -эстрадиола прежде всего связывают с нейропротекторным эффектом. После применения данного препарата показатель продолжительности жизни

сerving the quality of human life, social activity and professional performance. According to the WHO data, life expectancy is now increasing mainly due to a decrease in mortality rate of children under five years and, to a lesser extent, by extending the life of adult population [20].

Genetic determinism, telomere shortening, epigenetic factors, disruption of proteostasis, metabolism of carbohydrates and cellular interactions, as well as mitochondrial dysfunction, stem cell pool depletion are the main reasons for the aging of modern humans [10].

The comprehensive geroprotector database (<http://www.geroprotectors.org/>) contains information about 260 substances having the ability to prolong life to different organisms. Most geroprotectors with the proven effectiveness affect the immune and nervous systems, cell cycle, metabolism of carbohydrates, stimulate autophagy. They affect differently female and male individuals, in particular increasing the lifespan of the latter more effectively. Many geroprotectors (Rapamycin, Metformin, Acarbose, 17- β -estradiol, nordihydroguaiaretic acid, spermidine, antioxidants, polypeptides) have pronounced side effects and are used mainly to treat severe diseases [3, 7–9]. The mechanism of Rapamycin action, a drug prescribed for prevention of transplant rejection, is associated with inhibition of mTOR-receptors, cell cycle effects, immunosuppression and autophagy regulation [2, 3]. It allows to increase murine lifespan by 10–26%, but has a number of side effects such as metabolic dysfunction, hormonal disorders, testicular atrophy, oncopathology. Metformin is used for the treatment of type 2 diabetes whereas its action is based on the activation of protein kinase and deceleration of gluconeogenesis. Its application increases murine lifespan by 3.5–14%. Gastrointestinal disorders, hypothyroidism, testosterone level reduction are side effects of Metformin intake [11]. Acarbose is a product for the treatment of type 2 diabetes, which is an inhibitor of glucosidase. When using this drug, murine lifespan is increased by 2–20% [7, 9]. Adverse reactions of Acarbose are most often observed in gastrointestinal tract and liver. The action of 17- α -estradiol is primarily associated with a neuroprotective effect. After administration of this drug the life expectancy of mice increases by 3–14%. Disordered ovarian-menstrual cycle and a decrease in the level of male sex hormones are side effects of estrogens application [7, 9].

Previously, there was demonstrated the geroprotective activity of placental extracts, cells and tissues, realized due to antioxidant, anti-inflammatory, anti-oncogenic, neuroprotective activity, stimulation of osteo- and angiogenesis, regulation of apoptosis [1, 4, 5, 15, 22]. The mechanism of this effect is associated with a



мышей увеличивается на 3–14%. Побочными эффектами действия эстрогенов являются нарушение овариально-менструального цикла и снижение уровня мужских половых гормонов [11, 13].

Ранее была показана геропротекторная активность экстрактов, клеток и ткани плаценты, реализуемая за счет антиоксидантной, противовоспалительной, антионкогенной, нейропротекторной активности, стимуляции osteo- и ангиогенеза, регуляции апоптоза [1, 4, 5, 9, 22]. Механизм такого влияния связывают со снижением уровня TGF- β , PDGF- α , PDGF- β , TNF- α , IFN- γ , IL-6, Bcl-2 протеина и экспрессии генов *Wnt16, p16, p19, p27*; активацией каспаз в опухолях; переходом от ответа Th1 к Th2; активацией каталазы, супероксиддисмутазы; регенерацией отдельных тканей, а также синтезом VEGF [9, 22]. Кроме того установлено, что рожавшие женщины, особенно в позднем репродуктивном периоде, живут дольше нерожавших [19]. На основании этих наблюдений сделано следующее предположение: производные плаценты могут влиять на продолжительность жизни. Из возможных препаратов плаценты (экстракт, клетки, экспланты) нами были выбраны экспланты плаценты, обладающие наиболее длительным периодом действия, что целесообразно при длительной терапии [6]. Поскольку клеточная и тканевая терапия невозможна без всесторонней оценки безопасности материала, то в нашей работе были использованы криоконсервированные экспланты плаценты (КЭП) [3].

Целью работы было исследование влияния криоконсервированных эксплантов плаценты человека на продолжительность жизни мышей.

Материалы и методы

Эксперименты проводили на 100 мышах линии BALB/c, которые были разделены на 4 группы по 25 в каждой: 1 – самки с введением КЭП; 2 – самки без введения КЭП; 3 – самцы с введением КЭП; 4 – самцы без введения КЭП. Препарат вводили внутримышечно по 10 мг через толстую иглу, начиная с 5-го месяца жизни раз в 3 месяца. Доза и режим введения соответствовали методическим рекомендациям доклинических исследований лекарственных средств по исследованию геропротекторов [2]. Криоконсервированные экспланты взвешивали на весах «Axis AD 50» («Axis», Польша) с дискретностью 0,5 мг. Для проведения статистического анализа регистрировали дату и причину смерти (в случае наступления таковой).

Плаценту получали с информированного согласия женщин после операции кесарева сечения. Для получения биологического материала использовали наш метод [3], криоконсервировали по ра-

decrease in the level of TGF- β , PDGF- α , PDGF- β , TNF- α , IFN- γ , IL-6, Bcl-2 protein and expression of *Wnt16, p16, p19, p27* genes; activation of caspases in tumors; transition from Th1 to Th2 response; activation of catalase, superoxide dismutase; regeneration of different tissues, as well as the synthesis of VEGF [5, 22]. In addition, it was found that parous women, especially in the late reproductive period, live longer than nonparous ones [18]. On this basis there was assumed that placental derivatives can affect life expectancy. We have chosen the placental explants from the spectrum of placental preparations (extract, cells, explants), as potentially possessing the longest period of action, that is useful if long-term therapy is necessary [17]. Whereas cell and tissue therapy is impossible without a comprehensive assessment of material safety, cryopreserved placental explants (CPEs) have been used in our work [16].

The research aim was to study the effect of cryopreserved human placental explants on murine lifespan.

Materials and methods

The experiments were carried out in 100 BALB/c mice, which were divided into 4 groups of 25 in each: the 1st – female mice with CPE administration; the 2nd – female mice without CPE administration; the 3rd – male mice with CPE administration; the 4th – male mice without CPE administration. The product was administered intramuscularly in a dose of 10 mg through a thick needle, starting from the 5th month of life every 3 months. The dose and protocol of administration corresponded to the methodical recommendations of preclinical studies of drugs for the study of geroprotectors [19]. Cryopreserved explants were weighed on Axis AD 50 scales (Axis, Poland) with 0.5 mg resolution. The date and cause of death were recorded (in case of occurrence) for the statistical analysis.

The placenta was derived with the informed consent of women after a Caesarean section. Biological material was obtained according to the method developed by us earlier [16], cryopreserved according to the previously developed program [14, 16]. In this regard human placenta delivered within three hours after Cesarean section was washed with phosphate-buffered saline, disintegrated into 0.5–2 mm fragments. There was used 10% dimethyl sulfoxide as cryoprotective medium (Sigma, USA) in high glucose DMEM medium with *L*-glutamine (BioWest, France) enriched with 10% fetal bovine serum (Lonza, Germany). The samples were frozen in Nunc cryogenic tubes (Nunc, USA) using Mr. Frosty™ Freezing containers (Thermo Fisher Scientific, USA) at the rate of 1 deg/min down to –70°C with the following immersion into liquid nitrogen. They were warmed in a water bath



нее разработанной программе [3, 18]. Для этого плаценту человека, доставленную в течение трех часов после операции кесаревого сечения, промывали фосфатно-солевым буфером, измельчали на фрагменты 0,5–2 мм. В качестве криозащитной среды применяли 10%-й раствор диметилсульфоксида («Sigma», США) на среде DMEM с *L*-глутамином и высоким содержанием глюкозы («Bio-West», Франция), обогащенной 10%-й фетальной бычьей сывороткой («Lonza», Германия). Образцы замораживали в криопробирках «Nunc» («Nunc», США) с использованием контейнеров «Mr. Frosty™ Freezing Container» («Thermo Fisher Scientific», США) со скоростью 1 град/мин до –70°C при последующем погружении в жидкий азот. Размораживали на водяной бане (37°C) с дальнейшим отмыванием средой без криопротектора.

Для оценки влияния КЭП на продолжительность жизни строили кривые Каплана-Мейера, отличия между выборками определяли с помощью теста Log-rank, рассчитывали медиану продолжительности жизни (возраст, до которого доживает 50% популяции), определяли возраст, до которого доживает 90% популяции. Статистически результаты обрабатывали с использованием программного обеспечения «Past V. 3.15» (Норвегия) (online service: www.evanmiller.org).

Животные содержались в условиях вивария ИПКиК НАН Украины при естественном световом режиме на стандартном рационе *ad libitum*. Исследования были проведены в соответствии с «Общими принципами экспериментов на животных», одобренными VI Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, 2016) и согласованными с положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986). Протоколы работы утверждены Комитетом по биоэтике Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины (протокол №2 от 3.06.2013).

Результаты и обсуждение

Анализ кривых выживаемости самцов и самок мышей в группах без применения КЭП (рисунок, А) показал, что до 8 месяцев показатель смертности был минимальным, далее кривая выживаемости самцов имела линейный характер. Показатель средней продолжительности жизни составил (14,52 ± 0,068) месяцев. У самок в период с 10 до 23 месяцев показатель смертности резко снижался, далее кривая выживаемости изменялась линейно, как и у самцов, а до 25 месяцев резко повышалась. Средняя продолжительность жизни составила (20,48 ± 0,048) месяцев.

(37°C) with following washing by the medium without cryoprotectant.

Kaplan-Meier curves were plotted to evaluate the effect of CPEs on lifespan, the differences between the samples were determined with the Log-rank test, the lifespan median was estimated (the age up to which 50% of population survived), there was determined the age up to which 90% of population survived. The results were statistically processed using Past V. 3.15 (Norway), (online service: www.evanmiller.org).

The animals were kept at the animal facilities of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine with natural light/dark cycle and the standard diet *ad libitum*. All the experiments were performed according 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 of the National Academy of Sciences of Ukraine (Protocol №2, dated of June 03, 2013).

Results and discussion

Analysis of curves of male and female mice survival in the groups without CPEs (Fig. A) showed that mortality rate was minimal up to 8 months, then the survival curve of male mice was linear. The average lifespan was (14.52 ± 0.068) months. In female mice, from 10 to 23 months, the death rate was sharply decreased, then the survival curve was changed linearly, as in male mice, and up to 25 months it was sharply increased. The average life expectancy made (20.48 ± 0.048) months.

V.V. Frolkis [19] divided the life cycle of mice into three periods: adult (7–10 months), presenile (11–15 months) and geriatric (16–20 months). Most of researchers associate the nonlinear nature of survival curves in female mice with the protective action of estrogens, primarily on the cardiovascular system, this effect terminates in menopausal age [6, 12]. The death rate increases when functional and morphological changes are followed by biochemical ones at a decompensation stage, *i. e.* in gerontic age (deep menopause). Comparing two survival curves of male and female mice using the log-rank method revealed significant differences ($z = 3.88, p < 0.001$). It has been established that mice females had more increased major indices if compared with males: the average lifespan – by 29.1%; median of life expectancy – by 30%; 90% survival rate – by 29.6%; the maximum

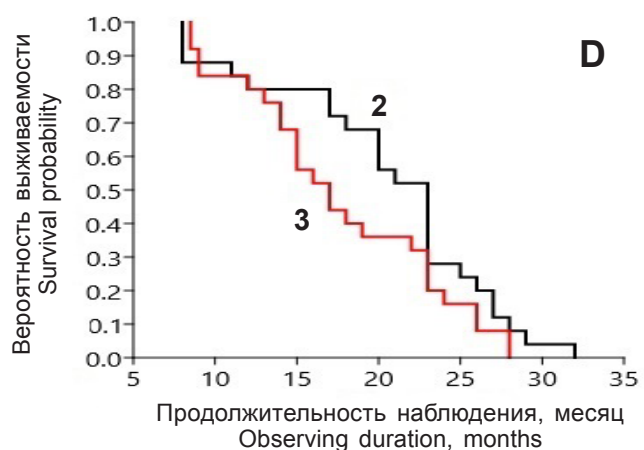
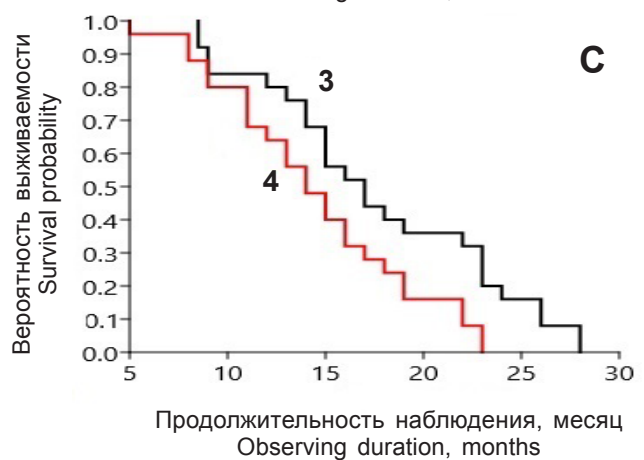
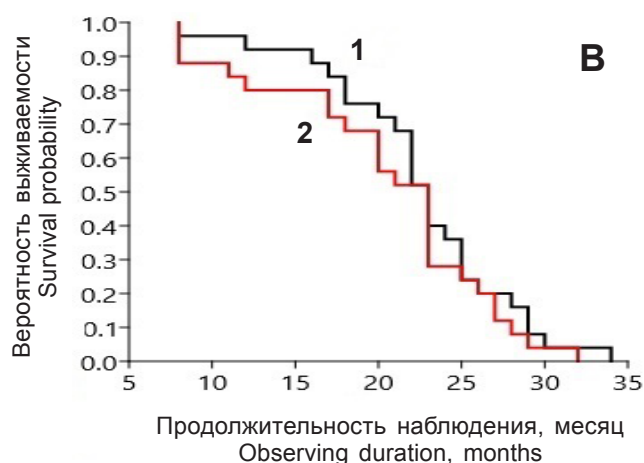
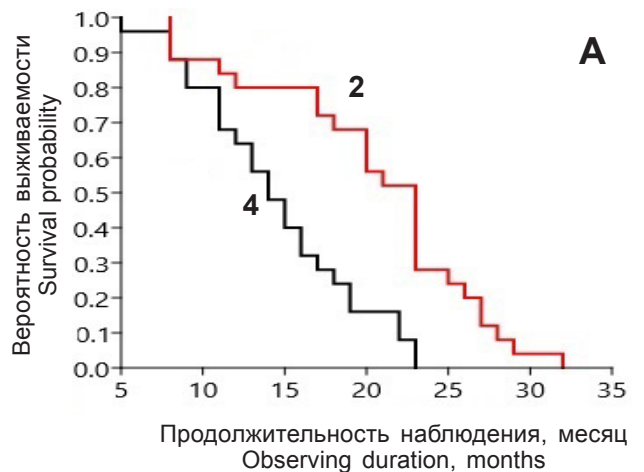


Показатели выживаемости мышей в экспериментальных группах: **A** – интактные самки (2) и самцы (4); **B** – интактные самки (2) и самки с введением КЭП (1); **C** – интактные самцы (4) и самцы с введением КЭП (3), **D** – интактные самки (2) и самцы с введением КЭП (3).

The survival rates of mice in the experimental groups: **A** – intact female (2) and male mice (4); **B** – intact female mice (2) and females with CPE administration (1); **C** – intact male mice (4) and males with CPE administration (3), **D** – intact female mice (2) and males with CPE administration (3).

В.В. Фролькис [2] разделил жизненный цикл мышей на три периода: взрослый (7–10 месяцев), предстарческий (11–15 месяцев) и старческий (16–20 месяцев). У мышей-самок нелинейный характер кривых выживаемости большинство исследователей связывают с протекторным действием эстрогенов, прежде всего на сердечно-сосудистую систему, которое прекращается в климактерическом возрасте [10, 16]. Показатель смертности возрастает в том случае, когда за биохимическими следуют функциональные морфологические изменения в стадии декомпенсации, т. е. в старческом возрасте (глубокая менопауза). При сравнении двух кривых выживаемости самцов и самок по методу log-rank были выявлены выраженные значимые различия ($z = 3,88, p < 0,001$). Установлено, что у самок по сравнению с самцами повышаются основные показатели: средняя продолжительность жизни – на 29,1%; медиана продолжительности жизни – на 30%, 90%-я выживаемость – на 29,6%; максимальная продолжительность жизни – на 28,1%. Полученные на мышах результаты были сходны с таковыми для человеческой популяции, что подтверждается данными ВОЗ, согласно которым показатель продолжительности жизни женщин больше, чем мужчин [20].

При сравнении кривых выживаемости групп мышей-самок (рисунок, B) значимых различий не обнаружено (log-rank тест: $z = 0,78, p = 0,44$). Следует отметить, что кривые, описывающие первую половину жизни животных (до медианы 23 месяцев), имели тенденцию к различию (log-rank test: $z = 1,84, p = 0,065$), т. е. в репродуктивный период применение КЭП незначительно влияло на показатель выживаемости животных. Была выявлена тенденция к увеличению средней продолжительности жизни после введения КЭП – до $(22,48 \pm 0,044)$ месяцев. Это может быть связано с функционированием репродуктивной системы и, в частности, с предотвращением негативного влияния, вызванного истощением яичникового резерва. Подобный эффект описан для амниотических клеток в модели преждевременного истощения функции яичников [21]. По дан-



ным Национального центра здоровья женщин и детей Великобритании [17] проведение заместительной гормонотерапии в глубокой старости нецелесообразно в поздний репродуктивный период. Так, в нашем эксперименте введение КЭП не приводило к улучшению показателей у старых мышей-самок.

На протяжении всей жизни кривые выживаемости самцов (рисунок, С) имеют значимые отличия (log-rank test: $z = 2,27, p = 0,0233$). Показатель средней продолжительности жизни после введения КЭП повысился до ($17,72 \pm 0,056$); медиана продолжительности жизни – на 17,6%; средняя продолжительность жизни – на 18,1%; 90%-я выживаемость – на 20,8%; максимальная продолжительность жизни – на 17,9%. Обе зависимости имели линейный характер, и с увеличением возраста животных несколько отличались. Следует отметить, что после применения КЭП показатель продолжительности жизни мышей-самцов статистически значимо повышался независимо от их возраста.

В результате нашей работы было получено большее увеличение показателя продолжительности жизни мышей по сравнению с данными Д.Е. Харрисона и соавт. [11], которые использовали для этой цели эстрогены. Данный факт может свидетельствовать о комплексном влиянии КЭП. Важно отметить, что ранее полученные нами данные о положительном влиянии КЭП на мужскую репродуктивную систему [4] определяют перспективность их применения в клинической практике, поскольку большинство известных геропротекторов угнетают мужскую половую систему [11, 13].

При дальнейшем анализе показателя выживаемости было установлено, что у самцов после имплантации КЭП он был сходен с таковым у самок без введения КЭП (рисунок D, log-rank test: $z = 1,6, p = 0,11$), однако отличался от самок с применением КЭП (log-rank test: $z = 2,4, p = 0,0165$). При этом у самок без имплантации КЭП с 12 по 23 месяц (старческий период, но не глубокая старость) вероятность гибели была значимо меньше (log-rank test $z = 3,68, p < 0,001$), чем у самцов с применением КЭП. В конце жизни кривые показателя выживаемости самцов, которым вводили КЭП, и самок без аналогичного лечения совпадают.

Анализ данных выживаемости всех групп животных показал, что кривые выживаемости мышей-самцов линейны, не зависят от возраста и значимо отличаются от кривых выживаемости мышей-самок. В то же время показатель выживаемости самок имеет нелинейный характер (значительно ниже в репродуктивный период), что может быть объяснено защитным действием эстрогенов [10, 11, 16]. Использование КЭП у самок в целом не влияет

lifespan – by 28.1%. The results obtained in mice were similar to those for human population, as confirmed by the WHO data, according to which the life expectancy of women is higher than that of men [20].

Comparing survival curves of female mice groups (Fig. B) did not reveal any significant differences (log-rank test: $z = 0.78, p = 0.44$). It should be noted that the curves describing the first half of animal life (prior to median of 23 months) had a tendency to differ (log-rank test: $z = 1.84, p = 0.065$), *i. e.* in the reproductive period, the use of CPEs insignificantly affected the survival of animals. There was a tendency to increase in the average life expectancy after CPE administration, it reached (22.48 ± 0.044) months. This may be associated with the function of the reproductive system, and, in particular, with prevention of negative impact caused by the depletion of ovarian reserve. A similar effect is described for amniotic cells in the model of premature depletion of ovarian function [21]. According to the UK National Center for Women's and Children's Health [13], hormone replacement therapy in extreme old age is not reasonable in the late reproductive period. So, in our experiment, CPE administration did not lead to an improvement of indices in old female mice.

Throughout life, the survival curves of male mice (Figure C) have significant differences (log-rank test: $z = 2.27, p = 0.0233$). The average lifespan after CPE administration approached to (17.72 ± 0.056); median of life expectancy – by 17.6%; average lifespan – by 18.1%; 90% survival rate – by 20.8%; the maximum life expectancy – by 17.9%. Both dependencies were linear, and with an increase in age of animals were slightly different. It should be noted that after CPE administration, the life expectancy of male mice was significantly increased irrespective of their age.

As a result of our work, a higher increase of murine lifespan index was obtained if compared with the data of D.E. Harrison *et al.* [7] who used estrogens. This fact testifies to a complex effect of CPEs. It is important to note that previously obtained data of CPE positive effect on male reproductive system [15] determine the prospect of their use in clinical practice, whereas most of known geroprotectors inhibit the male reproductive system [7, 9].

Further analysis of survival revealed similarities in its levels in male mice after CPE implantation and females without CPE administration (Fig. D, log-rank test: $z = 1.6, p = 0.11$), and differences if compared with female mice treated with CPE (log-rank test: $z = 2.4, p = 0.0165$). Moreover the female mice without CPE implantation had significantly lower death probability (log-rank test $z = 3.68, p < 0.001$) from 12 to 23 months (senile period, but not extreme old age), the than males with CPEs. At the end of life, the survival rate curves



на продолжительность жизни, однако увеличивает данный показатель в репродуктивный период, что, вероятно, обусловлено стимулирующим влиянием препаратов плаценты, прежде всего на яичники и органы мишени, а окончание эффекта – с возрастным истощением яичникового резерва (фолликулов, способных к развитию) [17, 21]. При этом в возрасте 20–25 месяцев показатель смертности самок резко увеличивался, возможно, вследствие стресса, связанного с переходом к менопаузе. Резкое изменение данного показателя не зависит от использования КЭП. Несмотря на то, что у самцов функция половой и эндокринной систем практически не зависит от возраста, введение КЭП значительно увеличивает продолжительность их жизни. При длительном использовании КЭП показатель выживаемости самцов приближается к таковому у самок без применения КЭП. На основании полученных данных можно предположить, что механизм действия КЭП реализуется при активном участии половой системы.

Выводы

Имплантация криоконсервированных эксплантов плаценты значимо увеличивала показатель выживаемости мышей-самцов: медиану продолжительности жизни – на 17,6%; среднюю продолжительность жизни – на 18,1%; 90%-ю выживаемость – на 20,8%; максимальную продолжительность жизни – на 17,9%. Имплантация криоконсервированных эксплантов плаценты не влияла на выживаемость жизни мышей-самок, однако снижала вероятность смерти в репродуктивный период.

В дальнейшем планируется провести анализ качества жизни животных после применения КЭП и изучить возможные механизмы полученного эффекта.

Литература

1. Анисимов В.Н. Молекулярные и физиологические механизмы старения: 2-е изд. перераб. и доп. – СПб.: Наука, 2008. – 481 с.
2. Доклінічні дослідження лікарських засобів: Метод. рекомендації / За ред. О.В. Стефанова. – К.: Авіцена, 2001. – 528 с.
3. Прокопюк В.Ю., Прокопюк О.С., Мусатова И.Б. и др. Оценка сохранности эксплантов плаценты и плодных оболочек после криоконсервирования // Клітинна та органна трансплантологія. – 2015. – Т. 3, №1. – С. 28–33.
4. Прокопюк О.С., Прокопюк В.Ю., Пасієшвілі Н.М. та ін. Імплантація криоконсервованих фрагментів плаценти людини відновлює прооксидантно-антиоксидантний баланс у експериментальних тварин пізнього онтогенезу // Проблеми криобіології та криомедицини. – 2017. – Т. 27, № 1. – С. 61–70.
5. Чуб О.В., Шевченко М.В., Прокопюк В.Ю. Нейропротекторний ефект факторів плацентарного походження на клітки головного мозку новонароджених крис в моделі глутамат-індукованої токсичності // Проблеми криобіології та криомедицини. – 2016. – Т. 26, № 2. – С. 176.

of male mice injected with CPEs and female ones without similar treatment were the same.

Analysis of survival data in all the animal groups showed that survival curves of male mice were linear, did not depend on age, and significantly differed from the survival curves of female mice. At the same time, the survival rate of female mice was of nonlinear character (much lower in reproductive period), that can be explained by protective effect of estrogens [6, 7, 12]. The use of CPEs in female mice generally did not affect a lifespan, but increased it in reproductive period, that is probably stipulated by stimulating effect of placental preparations, especially on the ovaries and other target organs, and an effect termination was associated with age-related ovarian pool exhaustion (of follicles, capable of development) [13, 21]. At the age of 20–25 months, the mortality rate of female mice was increased sharply, possibly due to the stress associated with menopausal transition. A sharp change of this index did not depend on the use of CPEs. Despite the fact that in male mice the function of sexual and endocrine systems depended almost not all on age, CPE administration significantly increased the duration of their life. Using of CPEs for a long period resulted in approaching of males' survival rate the indices of female mice without CPE treatment. Basing on obtained data we can assume that mechanism of CPE action was strongly associated with a reproductive system function.

Conclusions

Thus, the performed studies allowed to conclude that implantation of cryopreserved placental explants significantly increased the survival rate of male mice: median of lifespan – by 17.6%; the average life expectancy – by 18.1%; 90% survival rate – by 20.8%; the maximum lifespan – by 17.9%. Implantation of cryopreserved placental explants did not affect the survival of female mice, but reduced the probability of their death in reproductive period.

Prospect studies would be associated with analysis of the quality of animal's life after CPE administration and investigation of possible mechanisms of the obtained effect.

References

1. Anisimov V.N. Molecular and physiological mechanisms of aging. Saint-Petersburg: Nauka; 2008.
2. Bitto A., Ito T.K., Pineda V.V., et al. Transient rapamycin treatment can increase lifespan and healthspan in middle-aged mice. *Elife* 2016; 5: e16351.
3. Bravo-San Pedro J.M., Senovilla L. Immunostimulatory activity of lifespan-extending agents. *Aging (Albany NY)* 2013; 5 (11): 793–801.
4. Chub O.V., Shevchenko M.V., Prokopyuk V.Yu. Neuroprotective effect of placental factors in model of glutamate induced toxicity



6. Шевченко Н.О., Сомова К.В., Волина В.В. та ін. Динаміка активності та тривалості функціонування кріоконсервованих кріоекстракту, клітин та фрагментів плаценти в організмі експериментальних тварин // *Морфологія*. – 2016. – Т. 10, №2. – С. 93–98.
7. Bitto A., Ito T.K., Pineda V.V. et al. Transient rapamycin treatment can increase lifespan and healthspan in middle-aged mice // *eLife*. – 2016. – Vol. 5. – e16351.
8. Bravo-San Pedro J.M., Senovilla L. Immunostimulatory activity of lifespan-extending agents // *Aging (Albany NY)*. – 2013. – Vol. 5, №11. – P. 793–801.
9. Di Germanio C., Bernier M., de Cabo R., Barboni B. Amniotic epithelial cells: a new tool to combat aging and age-related diseases // *Front. Cell Dev. Biol.* – 2016. – Vol. 4. – P. 135.
10. Farhat M.Y., Lavigne M.C., Ramwell P.W. The vascular protective effects of estrogen // *FASEB J.* – 1996. – Vol. 10, №5. – P. 615–624.
11. Harrison D.E., Strong R., Allison D.B. et al. Acarbose, 17-estradiol, and nordihydroguaiaretic acid extend mouse lifespan preferentially in males // *Aging Cell*. – 2014. – Vol. 13, № 2. – P. 273–282.
12. Junnila R.K., Duran-Ortiz S., Suer O. et al. Disruption of the growth hormone receptor gene in adult mice increases maximal lifespan in females // *Endocrinology*. – 2016. – Vol. 157, №12. – P. 4502–4513.
13. Kumar S., Lombard D.B. Finding ponce de Leon's pill: challenges in screening for anti-aging molecules in screening for anti-aging molecules // *F1000Res*. – 2016. – Vol. 5.
14. Lopez-Otin C, Blasco M.A., Partridge L. et al. The Hallmarks of Aging // *Cell*. – 2013. – Vol. 153, №6. – P. 1194–1217.
15. Martin-Montalvo A., Mercken E.M., Mitchell S.J. et al. Metformin improves healthspan and lifespan in mice // *Nat. Commun.* – 2013. – Vol. 4. – P. 2192.
16. Mendelsohn M. E. Protective effects of estrogen on the cardiovascular system // *Am. J. Cardiol.* – 2002. – Vol. 20, № 2. – P. 12–18.
17. Menopause: Full Guideline. National collaborating centre for women's and children's health. – London: National Institute for Health and Care Excellence, 2015. – 283 p.
18. Pogozhykh D., Pogozhykh O., Prokopyuk V. et al. Influence of temperature fluctuations during cryopreservation on vital parameters, differentiation potential, and transgene expression of placental multipotent stromal cells // *Stem Cell Research & Therapy*. – 2017. – Vol. 8. – P. 66.
19. Shadyab A.H., Gass M.L., Stefanick M.L. et al. Maternal age at childbirth and parity as predictors of longevity among women in the united states: The Women's Health Initiative // *Am. J. Public Health*. – 2017. – Vol. 107, № 1. – P. 113–119.
20. World health statistics 2016: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals // [веб-сайт] http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/206498/1/9789241565264_eng.pdf?ua=1 (доступ 23 мая 2016 г.).
21. Xiao G.Y., Liu I.H., Cheng C.C. et al. Amniotic fluid stem cells prevent follicle atresia and rescue fertility of mice with premature ovarian failure induced by chemotherapy // *PLoS One*. – 2014. – Vol. 9, №9. – e106538.
22. Xie C., Jin J., Lv X. et al. Anti-aging effect of transplanted amniotic membrane mesenchymal stem cells in a premature aging model of Bmi-1 deficiency // *Sci. Rep.* – 2015. – Vol. 5. – P. 13975.
- in newborn rat brain cells. *Probl Cryobiol Cryomed* 2016; 26 (2): 176.
5. Di Germanio C., Bernier M., de Cabo R., Barboni B. Amniotic epithelial cells: a new tool to combat aging and age-related diseases? *Front Cell Dev Biol* 2016; 4: 135.
6. Farhat M.Y., Lavigne M.C., Ramwell P.W. The vascular protective effects of estrogen. *The FASEB J* 1996; 10(5): 615–624.
7. Harrison D.E., Strong R., Allison D.B., et al. Acarbose, 17- α -estradiol, and nordihydroguaiaretic acid extend mouse lifespan preferentially in males. *Aging Cell* 2014; 13(2): 273–282.
8. Junnila R.K., Duran-Ortiz S., Suer O. et al. Disruption of the GH receptor gene in adult mice increases maximal lifespan in females. *Endocrinology* 2016; 157(12): 4502–4513.
9. Kumar S., Lombard D.B. Finding ponce de Leon's pill: challenges in screening for anti-aging molecules. *F1000 Res* 2016; 5 (F1000 Faculty Rev): 406.
10. Lopez-Otin C, Blasco M.A., Partridge L. et al. The hallmarks of aging. *Cell* 2013; 153(6): 1194–1217.
11. Martin-Montalvo A., Mercken E.M., Mitchell S.J. et al. Metformin improves healthspan and lifespan in mice. *Nat Commun* 2013; 4: 2192.
12. Mendelsohn M.E. Protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *Am J Cardiol* 2002; 89(12A): 12E–17E.
13. Menopause: Full Guideline. London, 2015.
14. Pogozhykh D., Pogozhykh O., Prokopyuk V. et al. Influence of temperature fluctuations during cryopreservation on vital parameters, differentiation potential, and transgene expression of placental multipotent stromal cells. *Stem Cell Res Ther* 2017; 8: 66.
15. Prokopyuk O.S., Prokopyuk V.Yu., Pasieshvilii N.M. et al. Implantation of cryopreserved human placental fragments restores prooxidant-antioxidant balance in experimental animals of late ontogeny. *Probl Cryobiol Cryomed* 2017; 27(1): 61–70.
16. 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.
17. Schevchenko N.O., Somova K.V., Volina V.V. 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.
18. Shadyab A.H., Gass M.L., Stefanick M.L. et al. Maternal age at childbirth and parity as predictors of longevity among women in the United States: the women's health initiative. *Am J Public Health* 2017; 107(1): 113–119.
19. Stefanov O.V., editor. Preclinical trials of medicines [guidelines]. Kyiv: Avitsena; 2001.
20. World health statistics 2016: monitoring health for the SDGs. Available from: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/206498/1/9789241565264_eng.pdf?ua=1 [posted on 19.05.2016] (May, 23, 2016).
21. Xiao G.Y., Liu I.H., Cheng C.C. et al. Amniotic fluid stem cells prevent follicle atresia and rescue fertility of mice with premature ovarian failure induced by chemotherapy. *PLoS One* 2014; 9(9): e106538.
22. Xie C., Jin J., Lv X. et al. Anti-aging effect of transplanted amniotic membrane mesenchymal stem cells in a premature aging model of Bmi-1 deficiency. *Sci Rep* 2015; 5: 13975.

