

УДК 618.11-008.64:[615.361:618.46]:57.086.13

М.В. Шевченко^{1*}, Т.В. Михальчук¹, О.С. Прокопюк¹,
В.Г. Карпенко², В.Ю. Прокопюк^{1,2}

Кріоконсервовані похідні плаценти покращують якість життя та поведінкові реакції мишей з моделлю хіміотерапевтично-індукованої оваріальної недостатності

UDC 618.11-008.64:[615.361:618.46]:57.086.13

M.V. Shevchenko^{1*}, T.V. Mykhalchuk¹, O.S. Prokopiuk¹,
V.G. Karpenko², V.Yu. Prokopiuk^{1,2}

Cryopreserved Placental Derivatives Improve Quality of Life and Behavioral Responses in Mice with Chemotherapy-Induced Ovarian Failure

Ключові слова: хіміотерапевтично-індукована оваріальна недостатність, кріоконсервовані клітини, фрагменти плаценти, якість життя.

Key words: chemotherapy-induced ovarian failure, cryopreserved placental cells, fragments, quality of life.

Синдром передчасного виснаження яєчників призводить до зниження рівня продукції естрогенів, які відіграють ключову роль у забезпеченні якості життя жінки, а саме: сприяють збереженню серотонінергічної функції після менопаузи, запобігають розвитку серцево-судинних захворювань, остеопорозу та деменції, беруть участь у регуляції ліпідного профілю плазми крові, знижують ризик розвитку хвороби Альцгеймера та вікової втрати пам'яті [3, 5, 10]. У сучасній медицині тривалість та якість життя є одними з основних критеріїв ефективності лікування. Саме ці критерії забезпечують емоційну стабільність жінки, її психічне здоров'я, фізичну працездатність, повноцінні соціальні відносини та діяльність [8].

Передчасна оваріальна недостатність (ОН), за якої знижується продукція естрогенів та відсутній нормальний оваріальний цикл, призводить до зміни маси тіла та зовнішнього вигляду, розладів в емоційній сфері (тривожність, депресія), збільшення в період менопаузи кількості захво-

Premature ovarian failure (OF) leads to a decreased estrogen production, which plays a key role in ensuring the quality of life of a woman, namely, the estrogens contribute to the preservation of serotonergic function after menopause, prevent the development of cardiovascular diseases, osteoporosis and dementia, take part in the regulation of the plasma lipid profile, reduce the risk of developing Alzheimer's disease and age-related memory loss [3, 5, 10]. In modern medicine, the duration and quality of life are one of the main criteria of the treatment effectiveness. The very these criteria that ensure a woman's emotional stability, her mental health, physical capacity, full-fledged social relationships and activities [8].

A decrease in estrogen production and the absence of a normal ovarian cycle in premature OF lead to the changes in weight and appearance, emotional disorders (anxiety, depression), an increased number of the diseases during the menopausal period associated with a reduced protective

¹Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків, Україна

²Харківській національний медичний університет, м. Харків, Україна

*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: mariia_shevchenko1981@ukr.net

Надійшла 13.07.2023

Прийнята до друку 08.11.2023

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

²Kharkiv National Medical University, Kharkiv, Ukraine

*To whom correspondence should be addressed:

23, Pereyaslavka str., Kharkiv, Ukraine 61016;
tel.: +380 57 373 7435, fax: +380 57 373 5952
e-mail: mariia_shevchenko1981@ukr.net

Received 13, July, 2023

Accepted 08, November, 2023

рювань, пов'язаних зі зменшенням захисного впливу естрогенів [1, 5]. В умовах експерименту вищевказані зміни екстраполюються на лабораторних тварин, у яких при синдромі виснаження яєчників змінюються маса тіла, загальний стан, фізичні характеристики та поведінка. У попередніх роботах нами була визначена дія кріоконсервованих похідних плаценти на морфофункціональні показники печінки, нирок, яєчників і маток самиць мишей з моделлю ОН, а також досліджено вплив похідних плаценти на їхню фертильність, репродуктивну функцію та тривалість життя [2, 6].

Мета роботи — визначення впливу кріоконсервованих клітин і фрагментів плаценти на поведінку та якість життя самиць мишей в моделі хіміотерапевтично-індукованої оваріальної недостатності.

Експерименти виконували відповідно до загальних принципів роботи на тваринах, узгоджених із положенням «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986). Плаценти отримували після операції кесарів розтин за інформованою згодою жінок, із дотриманням принципів Гельсінської декларації, прийнятої Генеральною асамблеєю Всесвітньої медичної асоціації. Дизайн експерименту затверджено комісією з біоетики Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (м. Харків).

У роботі були використані 5-місячні самиці мишей лінії BALB/c ($n = 40$) масою ($20,0 \pm 1,3$) г. Тварини були розділені на групи: 1 — контрольну (інтактні самиці); 2 — модель хіміотерапевтично-індукованої оваріальної недостатності (МХІОН); 3 — МХІОН після введення кріоконсервованих клітин плаценти (ККП); 4 — МХІОН після введення кріоконсервованих фрагментів плаценти (КФП).

Хіміотерапевтично-індуковану ОН у мишей моделювали за раніше описаним методом шляхом інтраперитонеального введення 200 мг/кг циклофосфаміду («Сандоз», Австрія) та 20 мг/кг бусульфана (Accord Healthcare Limited, Польща) [2, 6, 9]. Оваріальну недостатність підтверджували за відсутністю естрального циклу (відсутність поверхневих клітин при кольпоцитологічному дослідженні). Клітини та фрагменти плаценти отримували та кріоконсервували за раніше описаними методами; через 2 тижні після підтвердження ОН застосовували КФП у розрахунку 10 мг на тварину, ККП — у розрахунку 100000 клітин на тварину інтраперито-

effect of estrogens [1, 5]. Under experimental conditions, the above-mentioned changes are extrapolated to laboratory animals, in which, with OF syndrome, changes in body weight, general health, physical characteristics, and behavior occur. In previous works, we have determined the effect of cryopreserved placental derivatives on morphofunctional indices of the liver, kidneys, ovaries, and uterus of female mice with OF and also we studied the effect of placental derivatives on their fertility, reproductive function, and life expectancy [2, 6].

The aim of this study was to determine the effect of cryopreserved placental cells as well as the fragments on the behavior and quality of life of female mice in a model of chemotherapy-induced ovarian failure.

Experiments were carried out in accordance with the general principles of animal care in accordance with the provisions of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986). Placentas were obtained after cesarean section with an informed consent of the women, in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki, adopted by the General Assembly of the World Medical Association. The design of the experiment was approved by the Bioethics Committee of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the NAS of Ukraine (Kharkiv).

Five-month-old female BALB/c mice ($n = 40$) weighing (20.0 ± 1.3) g were used in the research. The animals were divided into groups: 1 – control (intact females); 2 – model of chemotherapy-induced ovarian failure (MCIOF); 3 – MCIOF after administration of cryopreserved placental cells (CPC); 4 – MCIOF after administration of cryopreserved placental fragments (CPF).

Chemotherapy-induced OF was modeled according to the previously described method by intraperitoneal administration of 200 mg/kg cyclophosphamide (Sandoz, Austria) and 20 mg/kg busulfan (Accord Healthcare Limited, Poland) [2, 6, 9]. Ovarian failure was confirmed by the absence of an estrous cycle (absence of surface cells during colpocytological examination). Placental cells as well as the fragments were isolated and cryopreserved according to previously described methods; two weeks after OF confirmation CPF were administered at the rate of 10 mg per animal and CPC – at the rate of 100 thousand cells per animal intraperitoneally [2, 6]. During the experiment, the general and



неально [2, 6]. Протягом експерименту оцінювали загальний і фізичний стан тварин (зовнішній вигляд, маса тіла, фізична сила за методом динамометрії, добове споживання їжі та води) [4]. Поведінкові реакції досліджували за тестом «відкрите поле» (горизонтальна та вертикальна локомоторна активність), трикамерним тестом (зоосоціальна активність з тваринами протилежної статі) та тестом «підведений хрестоподібний лабіринт» (анксиолітична поведінка).

Статистичну обробку даних проводили за t-критерієм Стьюдента, аналіз даних — із застосуванням програмного забезпечення «Past V.3.25» (University of Oslo, Норвегія), критичний рівень значущості приймали при $p \leq 0,05$.

Протягом перших 2-х тижнів після моделювання ОН спостерігали погіршення загального стану тварин (гіподинамія, звяліність хутра, помутніння очей), значуще зменшення добового споживання їжі (з $(3,22 \pm 0,26)$ до $(2,73 \pm 0,21)$ г) та води (з $(3,49 \pm 0,35)$ до $(2,89 \pm 0,28)$ мл), маси тіла (з $(20,6 \pm 1,5)$ до $(17,3 \pm 1,4)$ г) та показників динамометрії (з $(67,4 \pm 6,1)$ до $(55,2 \pm 5,2)$ г). Через 3 тижні загальний та фізичний стан тварин поступово покращувався. Повне відновлення вказаних показників до рівня контрольної групи у тварин групи 2 відмічали через 8 тижнів спостереження, групи 3 — через 7 тижнів, групи 4 — через 5 тижнів.

Тест «відкрите поле» відображає ступінь рухово-пошукової активності мишей в умовах новизни [7]. Результати тесту показали суттєве зниження горизонтальної локомоторної активності тварин групи 2 (рисунок, А): зменшення кількості відвіданих квадрантів та пересічених ліній, збільшення часу знаходження у бічних ділянках поля та біля стінки, що вказує на підвищення рівня тривожності. Протягом спостереження поступово збільшувалася кількість відвіданих квадратів, проте вона не досягала рівня контрольної групи. У тварин груп 3 і 4 горизонтальна локомоторна активність відновлювалася протягом 8 тижнів. Вертикальна локомоторна активність мишей після формування МХІОН знижувалась (рисунок, В). За період спостереження число вставань тварин на задні лапи (стійок) збільшувалось, однак цей показник не досягав значення контрольної групи, незалежно від застосування як ККП, так і КФП. Проте у групах із введенням похідних плацент вертикальна локомоторна активність тварин наприкінці періоду спостереження була значуще вищою, ніж у групі 2.

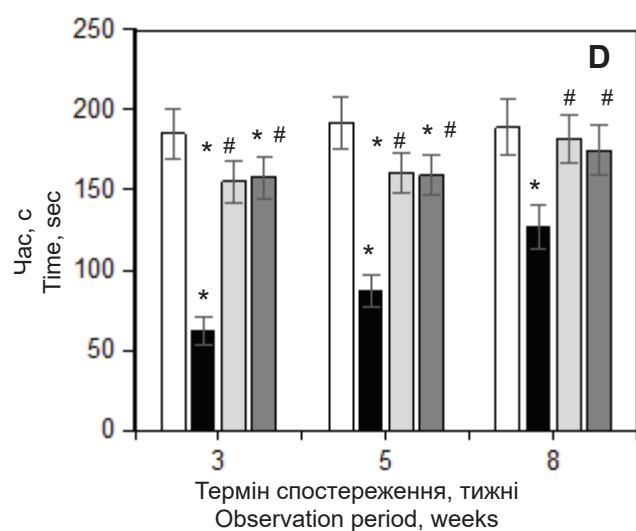
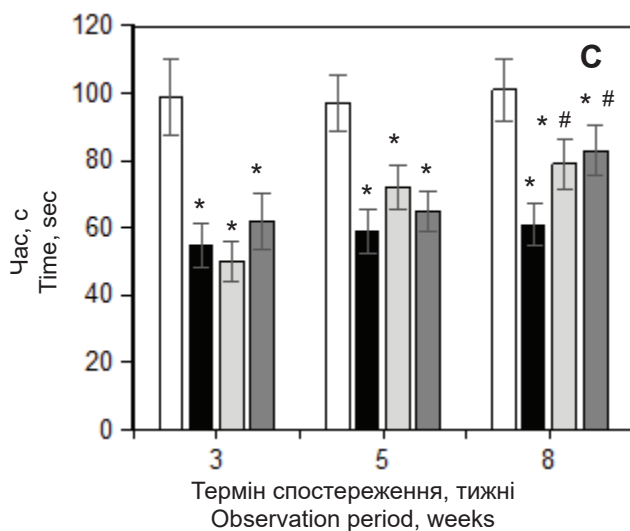
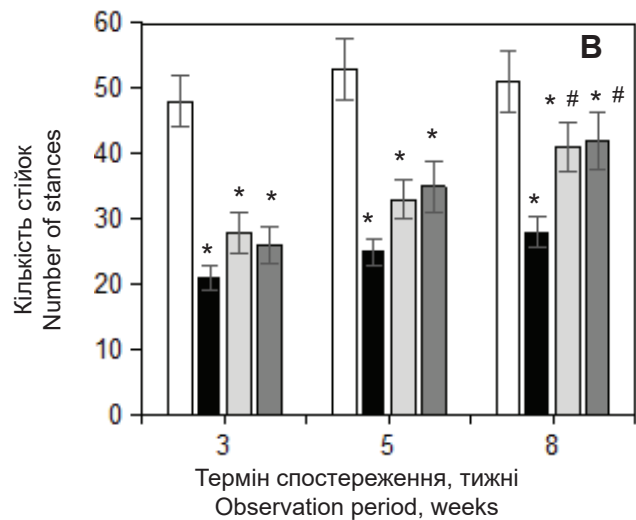
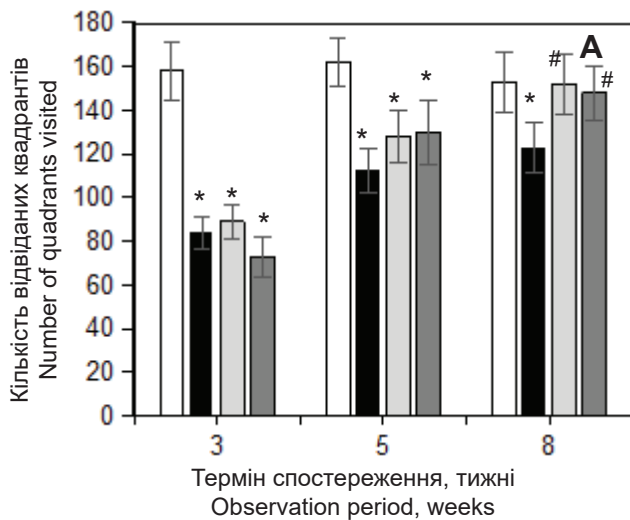
physical condition of the animals was assessed (appearance, body weight, physical strength using the dynamometry method, daily food and water consumption) [4]. Behavioral responses were studied using ‘the open field test’ (horizontal and vertical locomotor activity), the three-chamber test (zoosocial activity with opposite-sex animals) and ‘the elevated plus maze test’ (anxiolytic behavior).

For statistical data processing, the Student’s t-test was used, data analysis was performed using Past V.3.25 software (University of Oslo, Norway), critical significance level was assumed at a value of $p \leq 0.05$.

During the first two weeks after OF modeling we observed deterioration in the general health of the animals (hypodynamia, fallen fur, blurred eyes), a significant decrease in daily consumption of food (from (3.22 ± 0.26) to (2.73 ± 0.21) g) and water (from (3.49 ± 0.35) to (2.89 ± 0.28) ml), body weight (from (20.6 ± 1.5) to (17.3 ± 1.4) g) and dynamometry indicators (from (67.4 ± 6.1) to (55.2 ± 5.2) g). In three weeks, the general and physical condition of the animals began to gradually improve. Full restoration of the listed indices to the level of the control group in animals of group 2 was determined after 8 weeks of observation, in animals of group 3 – after 7 weeks and in animals of group 4 – after 5 weeks.

The ‘open field test’ reflects the degree of motor-exploration activity of mice in conditions of novelty [7]. The test results showed a significant decrease in the horizontal locomotor activity of animals of group 2 (Figure, A): reducing the number of visited quadrants and crossed lines, increasing the time spent in the side areas of the field and near the wall, which indicated an increase in the level of anxiety. During the observation period, there was a gradual increase in the number of squares visited, but this index did not reach the level of the control group. In animals of groups 3 and 4, horizontal locomotor activity of animals was restored within 8 weeks. The vertical locomotor activity of mice decreased after MCIOF formation (Figure, B). During the observation period, the number of animals’ stands (standing up on hind legs) increased, but this index did not reach the level of the control group, regardless of CPC or CPF administration. However, in the groups after administration of placental derivatives, the vertical locomotor activity of the animals at the end of the observation period was significantly higher than in group 2.





Структура поведінки самиць мишей з МХІОН після застосування кріоконсервованих похідних плацентарного походження: **A** — горизонтальна локомоторна активність; **B** — вертикальна локомоторна активність; **C** — час перебування у відкритому рукаві «підведеного хрестоподібного лабіринту»; **D** — час перебування у камері самиць групи 1 (□), групи 2 (■), групи 3 (▒), групи 4 (■) з самцем. Різниця значуща порівняно з групою 1 (*) та групою 2 (#), $p \leq 0,05$.

The structure of the behavior of female mice with MCIOF after administration of cryopreserved placental derivatives: **A** – horizontal locomotor activity; **B** – vertical locomotor activity; **C** – time spent in the open arm of ‘the elevated plus maze test’; **D** – time spent in the chamber of females of group 1 (□), group 2 (■), group 3 (▒), group 4 (■) with a male. The difference is significant compared to group 1 (*) and group 2 (#), $p \leq 0.05$.

Результати тесту «підведений хрестоподібний лабіринт» показали зменшення часу, проведеного мишами групи 2 у відкритому рукаві «хрестоподібного підведеного лабіринту» (рисунок, C). Така поведінка характерна для тварин у стані стресу або при патологічних станах і є ознакою збільшення тривожності та порушення здатності організму до адаптації [7]. Протягом періоду спостереження час, проведений тваринами у відкритому рукаві «підведеного хрестоподібного лабіринту», поступово збільшувався, проте не досягав значення групи контролю незалежно від застосування як ККП, так і КФП. Проте у тварин груп 3 і 4 цей показник був зна-

The results of ‘the elevated plus maze test’ showed a decrease in the time spent by mice of group 2 in the open arm of the elevated plus maze test (Figure, C). Such behavior is typical for animals under stress or pathological conditions and is a sign of increased anxiety and impaired ability of the organism to adapt [7]. During the observation period, the time spent by the animals in the open arm of the elevated plus maze test gradually increased, but did not reach the level in control, regardless of CPC or CPF administration. However, in animals of groups 3 and 4, this index was significantly higher than in group 2. Thus, the use of placenta derivatives reduced the level of animals’ anxiety,

чуше вищий, ніж у групі 2. Таким чином, введення похідних плаценти зменшувало рівень тривожності тварин, що проявлялося у підвищенні ефективності дослідницької поведінки, а саме — у збільшенні часу їхнього перебування у відкритих зонах лабіринту.

Дослідження зоосоціальної активності самиць мишей у трикамерному тесті після формування МХІОН виявило різке зменшення часу, проведеного із самцями (рисунок, D). Через 5 тижнів спостерігали незначне збільшення часу перебування самиць із самцями, проте наприкінці експерименту зоосоціальна активність самиць групи 2 залишалась значуще нижчою, ніж у групі контролю. У групах із застосуванням похідних плаценти було відзначено менш суттєве зниження зоосоціальної активності. Наприкінці періоду спостереження час перебування самиць мишей цих груп із самцями не відрізнявся від такого у контрольній групі, що свідчить про високий рівень соціальної активності й збереженість статевої поведінки [7].

Таким чином, проведене дослідження показало, що моделювання у самиць мишей хіміотерапевтично-індукованої оваріальної недостатності призводить до погіршення загального стану та фізичних параметрів (зовнішній вигляд, добове споживання корму/води, маса тіла, фізична сила), зниження фізичної активності та змін у структурі поведінки (збільшення рівня тривожності, зниження рухово-пошукової та дослідницької активності, зменшення зоосоціальної активності). Застосування кріоконсервованих клітин та фрагментів плаценти позитивно впливає на фізичні параметри та орієнтаційно-дослідницьку поведінку самиць мишей в моделі оваріальної недостатності, що наближає досліджувані показники до норми.

Література

1. Benetti-Pinto CL, De Almeida DM, Makuch MY. Quality of life in women with premature ovarian failure. *Gynecol Endocrinol.* 2011; 27(9): 645–9.
2. Kozub MM, Prokopiuk VY, Skibina KP, et al. Comparison of various tissue and cell therapy approaches when restoring ovarian, hepatic and kidney's function after chemotherapy-induced ovarian failure. *Exp Oncol.* 2017; 39(3): 181–5.
3. Nie G, Yang X, Wang Y. The effects of menopause hormone therapy on lipid profile in postmenopausal women: a systematic review and meta-analysis. *Front Pharmacol* [Internet]. 2022 Apr 12. [cited 2023 May 10]; 13:850815. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9039020/>

which was manifested in an increased efficiency of their exploratory behavior, namely, in a rise in the time they spent in the open areas of the maze.

The study of the zoosocial activity of female mice with MCIOF in a three-chamber test revealed a sharp decrease in the time spent with opposite-sex animals (Figure, D). After 5 weeks, there was a slight increase in the time spent by females with males, but at the end of the experiment, the zoo-social activity of females of group 2 remained significantly lower than in the control group. In groups after administration of placental derivatives there was a less significant decrease in zoo-social activity. At the end of observation period, the time spent by female mice of these groups with males did not differ from the control, that indicated a high level of their social activity and sexual behavior maintaining [7].

Thus, the study showed that modeling of chemotherapy-induced ovarian failure in female mice led to a deterioration in their general condition and physical indices (appearance, daily food and water consumption, body weight, physical strength), a decrease in physical activity and changes in their behavior structure (an increased level of anxiety, reduced motor-exploratory and zoosocial activities). Application of cryopreserved placental cells and fragments positively affects the physical parameters and orientation-exploratory behavior of female mice in the model of ovarian failure, approximating the studied indices closer to the norm.

References

1. Benetti-Pinto CL, De Almeida DM, Makuch MY. Quality of life in women with premature ovarian failure. *Gynecol Endocrinol.* 2011; 27(9): 645–9.
2. Kozub MM, Prokopiuk VY, Skibina KP, et al. Comparison of various tissue and cell therapy approaches when restoring ovarian, hepatic and kidney's function after chemotherapy-induced ovarian failure. *Exp Oncol.* 2017; 39(3): 181–5.
3. Nie G, Yang X, Wang Y. The effects of menopause hormone therapy on lipid profile in postmenopausal women: a systematic review and meta-analysis. *Front Pharmacol* [Internet]. 2022 Apr 12. [cited 2023 May 10]; 13:850815. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9039020/>
4. Palliyaguru DL, Vieira Ligo Teixeira C, Duregon E, et al. Study of longitudinal aging in mice: presentation of experimental techniques. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2021; 76(4): 552–60.
5. Pinkerton JV, Santen R. Alternatives to the use of estrogen in postmenopausal women. *Endocrine Reviews.* 1999; 20(3): 308–20.



4. Palliyaguru DL, Vieira Ligo Teixeira C, Duregon E, et al. Study of longitudinal aging in mice: presentation of experimental techniques. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2021; 76(4): 552–60.
5. Pinkerton JV, Santen R. Alternatives to the use of estrogen in postmenopausal women. *Endocrine Reviews*. 1999; 20(3): 308–20.
6. Prokopiuk V, Shevchenko M, Kaverinska A, et al. Cryopreserved placental derivatives increase survival of mice with cyclophosphamide-induced ovarian failure. *Probl Cryobiol Cryomed* 2023; 33(1): 59–63.
7. Prut L, Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol*. 2003; 463(1–3): 3–33.
8. Skevington SM, Lotfy M, O'Connell RA. The World Health Organization's WHOQOL-BREF quality of life assessment: Psychometric properties and results of the international field trial. A Report from the WHOQOL Group. *Qual Life Res* 2004; 13(2): 299–310.
9. Xiao GY, Liu IH, Cheng CC, et al. Amniotic fluid stem cells prevent follicle atresia and rescue fertility of mice with premature ovarian failure induced by chemotherapy. *PLoS One* [Internet]. 2014 Sep 8 [cited 2023 May 10]; 9(9): e106538. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0106538>
10. Yaffe K, Sawaya G, Lieberburg I, Grady D. Estrogen therapy in postmenopausal women: effects on cognitive function and dementia. *JAMA*. 1998; 279(9): 688–95.
6. Prokopiuk V, Shevchenko M, Kaverinska A, et al. Cryopreserved placental derivatives increase survival of mice with cyclophosphamide-induced ovarian failure. *Probl Cryobiol Cryomed* 2023; 33(1): 59–63.
7. Prut L, Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol*. 2003; 463(1–3): 3–33.
8. Skevington SM, Lotfy M, O'Connell RA. The World Health Organization's WHOQOL-BREF quality of life assessment: Psychometric properties and results of the international field trial. A Report from the WHOQOL Group. *Qual Life Res* 2004; 13(2): 299–310.
9. Xiao GY, Liu IH, Cheng CC, et al. Amniotic fluid stem cells prevent follicle atresia and rescue fertility of mice with premature ovarian failure induced by chemotherapy. *PLoS One* [Internet]. 2014 Sep 8 [cited 2023 May 10]; 9(9): e106538. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0106538>
10. Yaffe K, Sawaya G, Lieberburg I, Grady D. Estrogen therapy in postmenopausal women: effects on cognitive function and dementia. *JAMA*. 1998; 279(9): 688–95.