

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І КРІОМЕДИЦИНИ

ЧУБ ОЛЕГ ВОЛОДИМИРОВИЧ

УДК 615.361.013.85.014.41: 616.831-005-02: 618.173

**ВПЛИВ КРІОКОНСЕРВОВАНИХ ЕКСПЛАНТІВ
ПЛАЦЕНТИ НА ПЕРЕБІГ ДИСЦИРКУЛЯТОРНОЇ
ЕНЦЕФАЛОПАТІЇ В ПОСТМЕНОПАУЗІ
(експериментальне дослідження)**

14.01.35 – кріомедицина

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата медичних наук

Харків - 2019

Дисертацією є рукопис.

Робота викона в Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України

Науковий керівник: доктор медичних наук, професор,
Прокопюк Ольга Степанівна,
Інститут проблем кріобіології і кріомедицини
НАН України, м. Харків
головна наукова співробітниця
відділу кріобіології системи репродукції

Офіційні опоненти: доктор медичних наук, професор
Товажнянська Олена Леонідівна,
Харківський національний медичний університет
МОЗ України, завідувачка кафедри неврології №2

доктор медичних наук, професор,
Дьомін Юрій Альбертович,
Харківська медична академія післядипломної освіти
МОЗ України, завідувач кафедри офтальмології

Захист відбудеться «24» вересня 2019 року о 13.30 годині на засіданні спеціалізованої Вченої ради Д 64.242.01 в Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України за адресою: 61016, м. Харків, вул. Переяславська, 23

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України за адресою: 61016, м. Харків, вул. Переяславська, 23

Автореферат розісланий «21» серпня 2019 р.

Вчений секретар
спеціалізованої Вченої ради
Д 64.242.01

Фалько О.В.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Дослідженнями останніх років доведено, що кріомедичні технології з використанням плацентарних структур позитивно впливають на саногенез ряду патологічних станів ендокринної, нервової, жіночої статеві та інших систем організму (Pirino C. et al., 2013, Астреліна Т.А., 2013, Silini A.R., Parolini O., 2018, Park K.M., 2018). Широкий спектр біологічно активних речовин у складі об'єктів плацентарного походження сприяють репарації, регулюють гомеостаз та проліферативні процеси в тканинах. Успіхи клітинно-тканинної терапії відкривають нові можливості в лікуванні малокурабельних захворювань та багато в чому визначені досягненнями кріобіології: створенням кріоконсервованих біоматеріалів, у тому числі кріоконсервованих експлантів плаценти (КЕП), забезпечуючи їх високу збереженість (Грищенко В.І., 2000; Гольцев А.М., 2012; Прокопюк О.С., 2014, Giwa S. et al., 2017).

Проблема корекції дисциркуляторної енцефалопатії (ДЕ) в постменопаузі (ПМП) заслуговує особливої уваги, оскільки ДЕ істотно знижує якість життя і працездатність, супроводжується порушеннями психоемоційної сфери, є чинником ризику мозкового інсульту – однієї з головних причин інвалідизації та смертності. Тому лікування хронічних цереброваскулярних захворювань у жінок в старшому віці має велике соціальне та економічне значення (WHO: World Health Statistics, 2018).

Сучасні протоколи терапії ДЕ в ПМП передбачають лікування проявів ДЕ з використанням великої кількості лікарських препаратів, що є фармакологічно агресивним і недостатньо ефективним. Основна ж складова патогенезу – гормональний дисбаланс і супутній дефіцит нейротрофічних, нейропротекторних та інших важливих для функціонування центральної нервової системи (ЦНС) речовин – корегуються недостатньо (Paszkowski T., 2019, Mohney N., et al., 2019).

Питанням використання плацентарних препаратів в геріатрії присвячені роботи Коркушко О.В., 1979; Шатило В.Б., 2009; Прокопюк О.С., 2014; Liu W. et al., 2019; Hellwig S., Domschke K., 2019 та інших дослідників. Однак, характер біологічної дії плацентарних біоматеріалів при ДЕ в ПМП не з'ясовано, тому дослідження, спрямовані на розробку методів лікування та визначення механізмів терапевтичних ефектів з використанням КЕП при означеній коморбідній патології, залишаються актуальними.

Зв'язок з науковими програмами, планами, темами, грантами. Робота виконана в рамках відомчої науково-дослідної теми Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України «Дослідження геропротекторної та геротерапевтичної дії кріоконсервованих плацентарних біооб'єктів» (шифр 2.2.6.89, № держреєстрації 0114U001319), договорів № 2Н /11-14, № 2Н /11-15 та № 2Н /11-16 на виконання робіт зі збереження та забезпечення належного функціонування низькотемпературного банку, як наукового об'єкта, що становить національне надбання Держави, українсько-словацького наукового проекту «Нейропротективний потенціал кріоконсервованих плацентарних МСК, екстракту, сироватки плацентарної крові при ушкодженнях спинного мозку».

Мета і завдання дослідження. Мета роботи – визначити вплив кріоконсервованих експлантів плаценти на перебіг дисциркуляторної енцефалопатії у постменопаузі в експериментальних моделях. Для досягнення поставленої мети передбачалося вирішити наступні завдання:

1. Дослідити нейротропну дію середовищ, кондиційованих з КЕП на культуру нервових клітин головного мозку в моделях *in vitro*.
2. Оцінити вплив імплантації КЕП на виживання, тривалість життя, фізичний стан піддослідних тварин.
3. Дослідити показники якості життя, орієнтаційно-дослідницьку, зоосоціальну та анксиолітичну поведінку піддослідних тварин на тлі введення КЕП.
4. Визначити гістологічні ознаки змін в зовнішній пластинці моторної кори півкуль головного мозку і зубчастій звивини Амонова рогу гіпокампу мишей після імплантації КЕП.
5. Дослідити вплив імплантації КЕП на цитоархітектоніку зовнішньої пластинки моторної кори півкуль головного мозку і зубчастої звивини Амонова рогу гіпокампа піддослідних мишей в моделі ДЕ в ПМП.
6. Вивчити функціональний стан ЦНС мишей в експериментальній моделі ДЕ в ПМП за допомогою оцінки їх поведінкових реакцій, міжпівкульної асиметрії та когнітивних функцій після імплантації КЕП.

Об'єкт дослідження: перебіг дисциркуляторної енцефалопатії в постменопаузі під впливом імплантації кріоконсервованих експлантів плаценти.

Предмет дослідження: показники нейротрофічної, нейропротекторної біологічної активності КЕП; фізичний стан, нейрофізіологічні та морфологічні показники ЦНС самиць мишей з моделлю ДЕ в ПМП та їх динаміка на тлі імплантації КЕП.

Методи дослідження. В роботі використані сучасні методи кріобіології і кріомедицини, експериментальної медицини (моделювання ексайтотоксичності, ПМП, ДЕ, імплантація КЕП); культуральні (культивування клітин головного мозку (ГМ) експериментальних тварин); дослідження загальних фізичних характеристик експериментальних тварин; нейрофізіологічні: дослідження поведінкових реакцій експериментальних тварин, оцінка міжпівкульної асиметрії, когнітивно-мнестичних функцій експериментальних тварин; гістологічне, морфометричне дослідження тканин ГМ тварин; статистичний аналіз отриманих даних.

Наукова новизна отриманих результатів. В роботі вперше виявлено нейропротекторну дію КЕП на культуру нервових клітин (НК) головного мозку. Визначено, що біологічно активні речовини КЕП в середовищі, нагрітому до 95°C, інактивуються.

Показано, що дія КЕП на тривалість та якість життя старіючих мишей залежить від статі тварин: введення КЕП самицям мишей не змінює тривалість їх життя, однак значуще збільшує виживання у репродуктивному віці, покращує показники орієнтаційно-дослідницької, зоосоціальної та анксиолітичної поведінки. Вперше виявлено, що тривалість життя, зовнішній

вигляд і фізична сила самців після імплантації КЕП покращуються, проте погіршуються поведінкові реакції та стресостійкість.

Вперше визначено позитивні морфологічні зміни в гіпокампі та моторній корі самиць мишей в моделі досліджуваної коморбідної патології під впливом введення КЕП, що проявляється в відновленні цитоархітекtonіки, мікроциркуляторного русла, нейронів зовнішньої пластинки моторної кори і зубчастої звивини Амонова рогу гіпокампа. Вперше встановлено, що імплантація КЕП позитивно впливає на зміни орієнтаційно-дослідницької поведінки мишей. Після введення КЕП мишам з моделлю ДЕ в ПМП спостерігається істотне (на 56 %) збільшення часу дослідження нового об'єкта, що свідчить про відновлення когнітивно-мнестичних функцій у піддослідних тварин. На основі отриманих результатів вперше патогенетично обґрунтовано і розроблено метод корекції ДЕ в ПМП за допомогою імплантації КЕП в експерименті.

Практичне значення отриманих результатів. Виявлена в роботі нейропротекторна дія КЕП на нервові клітини *in vitro* обґрунтовує використання середовищ, кондиційованих з КЕП, для ефективного відновлення культур НК в протоколах їх кріоконсервування і низькотемпературного зберігання.

Встановлений позитивний вплив імплантації КЕП на фізичні показники, тривалість життя, поведінку, стресостійкість і когнітивно-мнестичні функції мишей в моделі ДЕ в ПМП з відновленням у них мікроциркуляції та цитоархітекtonіки в гіпокампі та моторній корі доводять перспективність використання КЕП для корекції цереброваскулярних геріатричних змін та вдосконалення методів терапії ДЕ в ПМП.

Отримані нові наукові дані про дію КЕП на експериментальних тварин з модельованою ДЕ в ПМП, можуть бути використані в освітніх програмах з кріобіології, кроїмедицини, геронтології, гінекології та неврології.

Результати дослідження дозволили патогенетично обґрунтувати і розробити «Спосіб лікування когнітивних порушень при дисциркуляторній енцефалопатії в постменопаузі» (Патент України № 124910).

Особистий внесок дисертанта. Дисертаційна робота є самостійним і оригінальним науковим дослідженням. Основна частина експериментальних досліджень виконана здобувачем особисто. Самостійно проведено патентно-інформаційний пошук, проаналізовано сучасну вітчизняну і закордонну наукову літературу з досліджуваної проблеми, обґрунтовано мету і завдання роботи, проведено аналіз і статистичну обробку отриманих даних. Спільно з науковим керівником обговорені та інтерпретовані отримані дані, сформульовані висновки. Допомога співавторів у статтях була спрямована на виконання окремих методичних задач, або консультування. В опублікованих зі співавторами роботах особистий внесок здобувача полягає:

– у роботах [1, 2, 3, 8, 11, 12, 16] – в дослідженні нейропротекторного впливу КЕП на нервові клітини *in vitro* в моделі глутамат-індукованої ексайтотоксичності, в обговоренні та узагальненні результатів; окресленні питань, які потребують додаткового вивчення;

– у роботах [4, 10, 14, 15] – в дослідженні впливу імплантації КЕП на тривалість життя та показники виживання самиць та самців мишей в порівняльному аспекті; в узагальненні результатів та формулюванні висновків;

– у роботах [5, 6, 7, 9, 13, 17] – в проведенні порівняльного оцінювання орієнтаційно-дослідницької, зоосоціальної, анксиолітичної поведінки та морфологічних показників моторної кори півкуль головного мозку і зубчастій звивини Амонова рогу гіпокампу мишей в залежності від віку та статі на тлі імплантації КЕП, в тому числі в моделі ДЕ в ПМП, в аналізі даних та формулюванні висновків.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертації доповідались і обговорювались на наукових форумах: конференціях молодих вчених ІПК і К НАН України «Холод в биологии и медицине» (Харків, 2015; 2016; 2017), на VI Національному конгресі геронтологів і геріатрів України (Київ, 2016), 23-ій міжнародній науково-практичній конференції молодих вчених та студентів «Topical issues of new drugs development» (Харків, 2016), Національному конгресі патофізіологів України з міжнародною участю «Патофізіологія і фармація: шляхи інтеграції» (Харків, 2016), науково-практичній конференції за участю міжнародних спеціалістів «Стратегії профілактики неінфекційних хвороб та шляхи їх реалізації: від постулатів минулого в майбутнє» (Харків, 2016), XIV Міжнародній науковій конференції студентів, аспірантів, докторантів, молодих вчених та фахівців «Актуальні питання сучасної медицини» (Харків, 2017), I Всеукраїнському конкурсі наукових робіт студентів та молодих вчених медико-фармацевтичного профілю (Київ, 2017), 8-th International Symposium on Experimental and Clinical Neurobiology (Kosice, Slovakia, 2017).

Публікації. Основні положення дисертації опубліковано в 17 наукових працях: 6 статей, з них 5 статей – у фахових наукових виданнях України (3 – у виданнях, включених до міжнародної наукометричної бази даних Scopus), 1 стаття – в матеріалах міжнародної конференції (за кордоном), 10 тез доповідей на наукових конференціях, Національних конгресах, симпозіумі (3 з них – у виданнях, включених до міжнародної наукометричної бази даних Scopus, 1 – за кордоном), отримано 1 патент України на корисну модель.

Обсяг і структура дисертації. Дисертаційна робота викладена на 184 сторінках (з яких 146 сторінок – основної частини) і складається з анотації, вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів дослідження, 4 розділів власних досліджень, узагальнення, висновків, практичних рекомендацій, списку літератури та 3 додатків. Список літератури містить 312 джерел, у тому числі 138 – кирилицею та 172 – латиницею. Робота ілюстрована 7 таблицями та 29 рисунками, в яких представлена 41 мікрофотографія.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Огляд літератури. У розділі представлено аналіз наукової літератури, яка стосується кріоконсервування структур плаценти та питань їх біологічної дії на організм при модельних патологіях, в клініці, а також інформації про плацентарні сполуки. Проаналізовано особливості нейрофізіологічних процесів

в організмі жінки в ПМП, відображені сучасні уявлення про етіопатогенез та проблему корекції ДЕ в ПМП. На підставі проведеного аналізу наукової літератури доведена актуальність дослідження впливу КЕП на перебіг експериментальної ДЕ в ПМП та застосування КЕП для корекції досліджуваної коморбідної патології.

Матеріали та методи дослідження. Основну частину досліджень виконано на базі наукових підрозділів ІПК і К НАН України, м. Харків. Експерименти проводили відповідно до Закону України „Про захист тварин від жорстокого поводження” (№ 3447-IV від 21.02.06), „Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей” (Страсбург, 1986), з дозволу Комітету з біоетики ІПК і К НАН України (протокол № 4 від 25.11.2014 р.).

Плаценти для виготовлення КЕП отримували з інформованої згоди жінок. Експланти плаценти (відокремлені ворсини вагою до 1 г) кріоконсервували під захистом 10% розчину диметилсульфоксиду по двохетапній програмі заморожування – зі швидкістю 1 град/хв до -70°C з наступним зануренням в рідкий азот. Деконсервування КЕП проводили їх відігріванням на водяній бані при $37\text{...}40^{\circ}\text{C}$.

Суспензію клітин ГМ новонароджених безпородних щурів отримували за Sukach A.N. et al., 2014, методом механічно-ферментативної дезагрегації впродовж 15 хв. в 0,125 %-му розчині трипсину у фосфатно-сольовому буфері при 37°C з наступним їх культивуванням протягом 5 діб.

Визначення нейропротекторного та нейротерапевтичного впливу КЕП на НК проводили в моделі глутамат-індукованої ексайтотоксичності за Kanno H., et al. (2014) з модифікаціями, яка відповідає стану метаболічних порушень і виснаження НК при дициркуляторній енцефалопатії. Клітини висівали в культуральний планшет на 24 години, після чого додавали глутамат (Sigma, США) в концентрації 10 мМ та інкубували протягом доби. Для дослідження нейропротекторної дії КЕП нервові клітини попередньо інкубували в середовищі, кондиційованому з КЕП, після чого додавали глутамат. Для дослідження відновлювальної дії КЕП на НК спочатку моделювали ексайтотоксичність, після чого додавали середовище, кондиційоване з КЕП. Після доби культивування оцінювали метаболічну активність НК за допомогою МТТ-тесту (Niks M., Otto M., 1990). Для з'ясування природи діючих речовин КЕП, середовище, кондиційоване з КЕП, нагрівали до 95°C впродовж 10 хв. і проводили аналогічне дослідження його дії на нервові клітини.

Дію імплантації КЕП на організм тварин (240 мишей лінії BALB/c вагою $32,4\pm 7,5$ г) визначали залежно від статі, віку, в моделях ПМП, ДЕ, коморбідної патології (ДЕ+ПМП). Моделювання постменопаузальних порушень в організмі експериментальних тварин проводили шляхом двохсторонньої оваріоектомії (Renata Rusa et al., 1999). ДЕ у піддослідних мишей моделювали за допомогою оклюзії сонних артерій (Jae-Chul Lee et al., 2013).

Імплантацію КЕП мишам проводили ін'єкційно в передню поверхню стегна в дозі 10 мг, з 6-го місяця життя 1 раз на 3 місяці. Дозу КЕП розраховували, виходячи з видового рівня обміну речовин за

Стефановим О.В. (2001), спираючись на данні літератури (В.І. Грищенко та ін., 2011). Для оцінки впливу КЕП на виживання та тривалість життя реєстрували дату і причину смерті мишей (при виявленні такої), будували криві Каплана-Мейєра, їх відмінності визначали за допомогою Log-rank тесту. Розраховували медіану тривалості життя (вік, до якого доживає 50 % популяції) та вік, до якого доживає 90 % популяції. Якість життя тварин оцінювали по загальним фізичним характеристикам за Донцовим В. І. (2011).

Дію імплантації КЕП на когнітивно-мнестичні функції та поведінку мишей оцінювали нейрофізіологічними методами (Вороніна Т.А. та інш., 1998; Faizi M. et al., 2012; Jerry J. Buccafusco (ed.), 2009; Буреш Я. та інш., 1991). При вивченні орієнтаційно-дослідницької поведінки в тесті «відкрите поле» визначали кількість відвіданих квадратів поля, стійок та актів грумінгу. При дослідженні зоосоціальної активності з одно- та різностатевими тваринами в трикамерному тесті та анксиолітичної поведінки в хрестоподібному лабіринті фіксували час, який проводила тварина з іншою твариною та час в закритому рукаві лабіринту, відповідно. Для дослідження когнітивних здібностей тварини реєстрували час дослідження твариною об'єктів та їх нового положення. Коефіцієнт міжпівкульної асиметрії обчислювали за Орловим В.І. та співавт. (2004) з урахуванням сумарної кількості лівосторонніх, правосторонніх побіжок і розворотів мишей в Т-подібному лабіринті. Оцінку змін поведінки тварин проводили через 3 тижні після операції оклюзії сонних артерій. Гістологічні дослідження моторної кори півкуль ГМ та гіпокампа експериментальних тварин виконували за Коржевським Д.Е., Гіляровим О.В., (2010) з фіксацією зразків у 10 %-му нейтральному формаліні, напівтонкі зрізи забарвлювали гематоксиліном і еозином. Зображення отримували, використовуючи мікроскоп з XSP-139TP («JNOEC», Японія-Китай), цифрову камеру Sigeta UCMOS 3100 (Китай) та програмне забезпечення «Tour View 3.7» (Китай).

Відмінності між групами визначали з використанням параметричних (t-критерій Стюдента) або непараметричних (критерії Манна-Уїтні, Краскела-Уолліса) методів аналізу. Статистично значущими вважали відмінності при $p < 0,05$. Статистичну обробку результатів здійснювали з використанням програмного забезпечення Past V. 3.25 (Oslo, Norway).

Результати власних досліджень та їх обговорення.

Вплив КЕП на стан нервових клітин в моделі глутамат-індукованої ексайтотоксичності *in vitro*. Метаболічна активність НК ГМ після культивування нервових клітин в середовищі, кондиційованому з КЕП, збільшувалася в порівнянні з відповідним показником у контролі більш, ніж на 30 %. Метаболічна активність НК, культивованих в середовищі, кондиційованому з КЕП, а потім підданих ексайтотоксичній дії глутамату, зростала на 41,2 % у порівнянні з НК, що піддавалися ексайтотоксичній дії глутамату. Для встановлення можливої нейротрофічної (відновлювальної) дії КЕП, НК культивували в середовищі кондиційованому з КЕП після впливу глутамату. В результаті експерименту метаболічна активність НК зростала (відновлювалася) на 20,6 %. На основі отриманих даних можна стверджувати,

що есенціальні сполуки КЕП сприяють збільшенню метаболічної активності нервових клітин ГМ в культурі *in vitro*, мають нейротрофічний і більш виражений нейропротекторний ефект. Середовища, кондиційовані з КЕП, які піддавалися нагріванню до 95°C протягом 10 хв., не демонстрували захисної дії проти глутамат-індукованої цитотоксичності. Це дає підстави припустити, що позитивний нейротропний ефект чинять термолабільні плацентарні речовини, які вірогідно мають білковий компонент в своєму складі.

Визначені ефекти позитивної дії КЕП на НК *in vitro* обґрунтовують доцільність досліджень щодо відновлювального впливу КЕП на організаційному рівні при ДЕ в ПМП.

Вплив імплантації кріоконсервованих експлантів плаценти на виживання, тривалість життя та фізичний стан піддослідних тварин різних вікових груп. Тривалість та якість життя є інтегральними показниками, що представляють системний вплив імплантації КЕП на організм. Водночас, двохвекторна роль плаценти, спрямована на розвиток плоду та на перебудову жіночого організму під час вагітності, потребує визначення впливу імплантації КЕП відносно статі та віку реципієнта. При порівнянні кривих виживання інтактних самців і самиць за методом Log-rank виявлені відмінності (рис. 1, А, $z = 3,88$, $p < 0,001$): до віку 8 місяців показники виживання тварин обох статей були максимальними, після цього смертність самців лінійно зростала, порівняно з самицями, у яких виявлено значно нижчу смертність в віці 8 – 23 місяці. З 24 місяця життя цей показник також лінійно зростає. Нелінійний характер кривих виживання в жіночій популяції більшість дослідників пов'язують з протекторною дією естрогенів що припиняється в пізньому онтогенезі (Farhat M.Y. et al., 1996; Mendelsohn M.E., 2002). Середня і максимальна тривалість життя, 50- та 90-відсоткове виживання інтактних самців виявилися нижчими, ніж у самиць. Криві виживання самиць мишей, яким проводилися імплантації КЕП (рис. 1, Б), до 23 місяців життя мали тенденцію до позитивної відмінності ($z = 1,84$, $p = 0,07$).

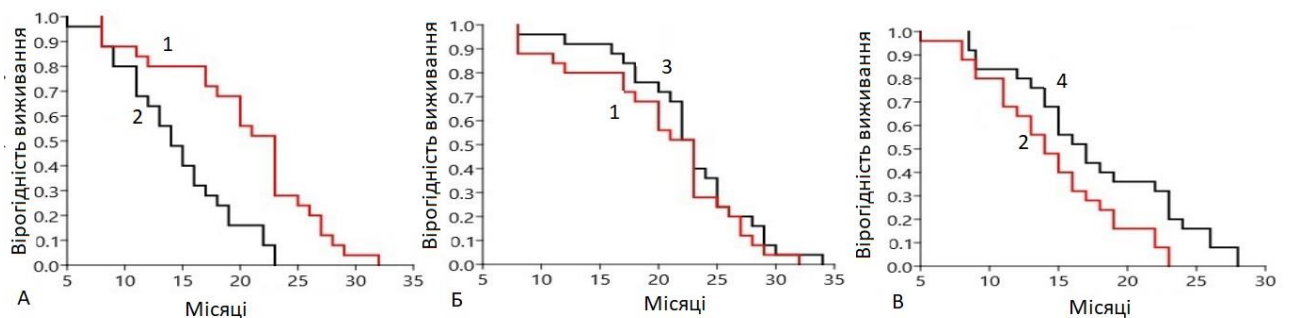


Рис. 1. Криві виживання мишей, розраховані за методом Каплана-Мейєра: А – порівняння між інтактними самицями та самцями, Б – порівняння між самицями з КЕП та без, В – порівняння між самцями з КЕП та без. 1 - інтактні самиці; 2 - інтактні самці, 3 - самиці з імпантованим КЕП; 4 - самці з імпантованим КЕП.

Подальше введення КЕП не викликало вірогідної різниці досліджуваних параметрів. Тобто, імплантація КЕП самицям в репродуктивному періоді покращувала показник виживання, що може бути пов'язане з таргетною дією плацентарних чинників на функціонуючу репродуктивну систему, і не впливала на тривалість життя після виснаження резерву яєчників.

Показники виживання самців, яким були імплантовані КЕП (рис. 1, В), достовірно позитивно відрізнялися від кривих виживання інтактних самців протягом всього життя ($z = 2,27$, $p = 0,02$).

Дослідженням фізичного стану піддослідних тварин обох статей було також встановлено достовірне поліпшення показників їх загального оцінювального бала, ваги і фізичної сили після імплантації КЕП.

Орієнтаційно-дослідницька, зоосоціальна, анксиолітична поведінка та структура моторної кори півкуль ГМ і Амонова рогу гіпокампа мишей різних вікових груп на тлі імплантації КЕП. З огляду на можливу коригуючу дію на сенильно-інволютивні зміни ЦНС, досліджено когнітивно-мнестичні функції ЦНС, стресостійкість, зоосоціальну і статеву активність мишей в експерименті після введення КЕП.

При дослідженні поведінкових реакцій мишей виявлено, що після імплантації КЕП у старіючих самиць переважала дослідницька поведінка, зростали горизонтальна (рис. 2, в, 1) і вертикальна (рис. 2, в, 2) форми локомоторної активності.

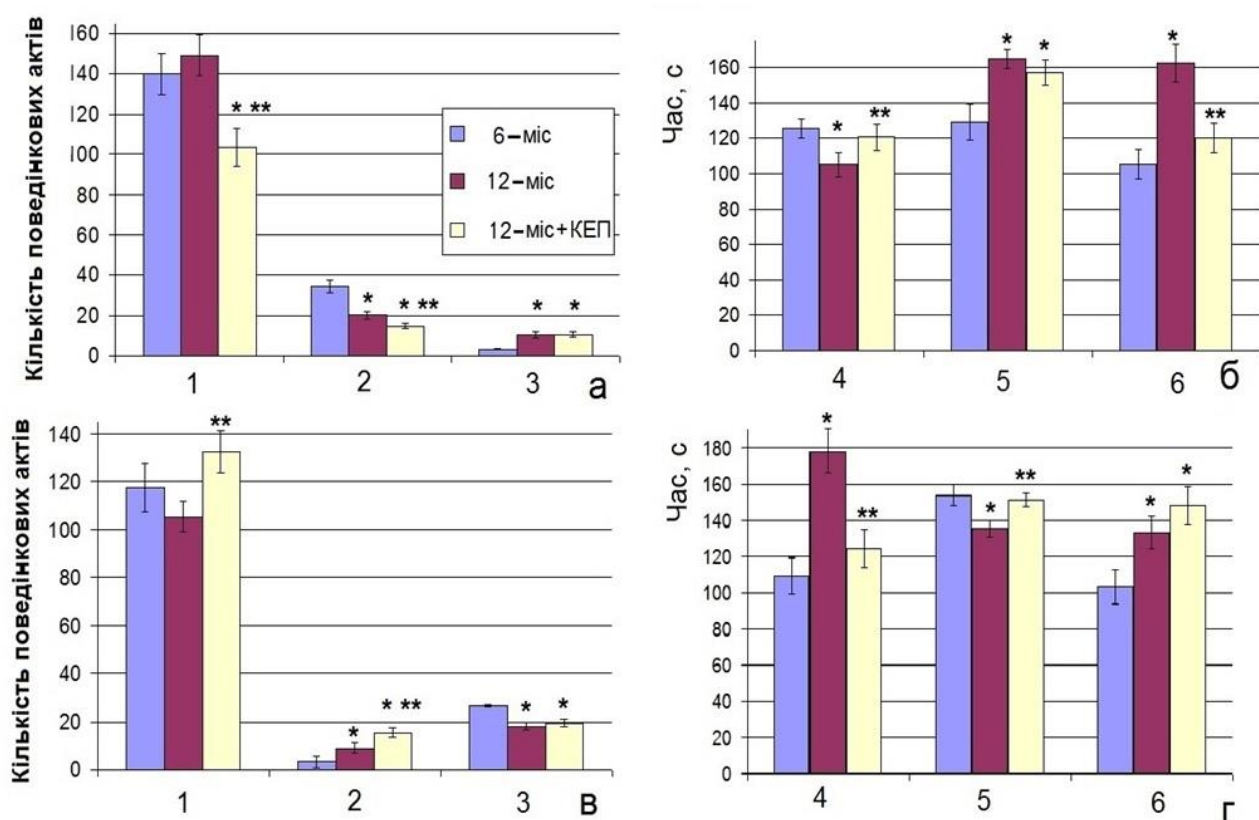


Рис. 2. Структура поведінки піддослідних мишей на тлі імплантації КЕП: 1 – кількість відвіданих квадратів в тесті «відкритого поля», 2 – кількість стійок в тесті «відкритого поля», 3 – кількість актів грумінгу в тесті «відкритого

поля», 4 – час знаходження в закритому рукаві хрестоподібного лабіринту, 5 – час, проведений з одностатевою твариною в трикамерному тесті, 6 – час, проведений з різностатевою твариною в трикамерному тесті; а, б – самці, в, г – самиці; * – статистично значущі відмінності від групи 6-ти місячних тварин ($p < 0,05$), ** – статистично значущі відмінності від групи 12-ти місячних тварин ($p < 0,05$).

На тлі імплантації КЕП зростали зоосоціальна активність самиць в тестах з одностатевою твариною (рис. 2, г, 5) і статеву активність з самцями (рис. 2, г, б). Водночас зменшувався час, проведений тваринами в закритому відрізку хрестоподібного лабіринту (рис. 2, г, 4), що свідчить про зниження їх тривожності в умовах дії стресорних чинників.

Імплантація КЕП старіючим самцям призводила до зниження вертикальної (рис. 2, а, 2) та горизонтальної (рис. 2, а, 1) локомоторної активності і збільшення кількості актів грумінгу (рис. 2, а, 3), що інтерпретується, як погіршення орієнтаційно-дослідницької поведінки. Достовірно знижувався рівень зоосоціальної активності, зберігалась статеву поведінка, проте збільшувався рівень тривожності самців (рис. 2, а, 4, 5, 6).

Оскільки вікові порушення когнітивно-мнестичних процесів асоційовані з морфологічними змінами в гіпокампі, досліджували області зубчастої звивини Амонова рогу гіпокампа та моторної кори півкуль ГМ, яка відповідає за рухові функції. Під час гістологічного дослідження ГМ 6-місячних мишей (молоді тварини) були отримані результати, що свідчили про морфологічну збереженість пірамідних нейронів гіпокампа та зовнішньої пластинки моторної кори півкуль ГМ (рис. 3, а, б, в).

Гістологічне дослідження ГМ старіючих (12-місячних) мишей показало наявність ознак дегенеративних змін нейронів різного ступеня – від незначного помутніння цитоплазми до втрати ядерець, зменшення гомогенності хроматину, істотного візуального зменшення розмірів, появи двох ядерець в ядрах нейронів (рис. 3, г, д, е).

В ГМ старіючих мишей, яким були імплантовані КЕП, виявлено зменшення проявів сенильної енцефалопатії: відновлення чисельності та щільності пірамідних нейронів зовнішньої пластинки моторної кори півкуль ГМ, зменшення кількості гіпохромних нейронів, відновлення капілярів (рис. 3, ж, з, и). Спостерігалось збереження кількості пірамідних нейронів гіпокампа, що може бути ознакою реактивації нейрогенезу. Отримані результати можуть бути пояснені тим, що сполуки в складі КЕП, такі як нейротрофічні чинники та сигнальні молекули, що активують репаративний білковий синтез, діючи комплексно, природним чином стимулюють нейрогенез.

Таким чином, встановлено, що КЕП, застосовані у тварин пізнього онтогенезу, чинять геропротекторну дію на ЦНС, впливають на вікові зміни поведінки мишей, причому напрямок впливу залежить від статі піддослідних тварин.

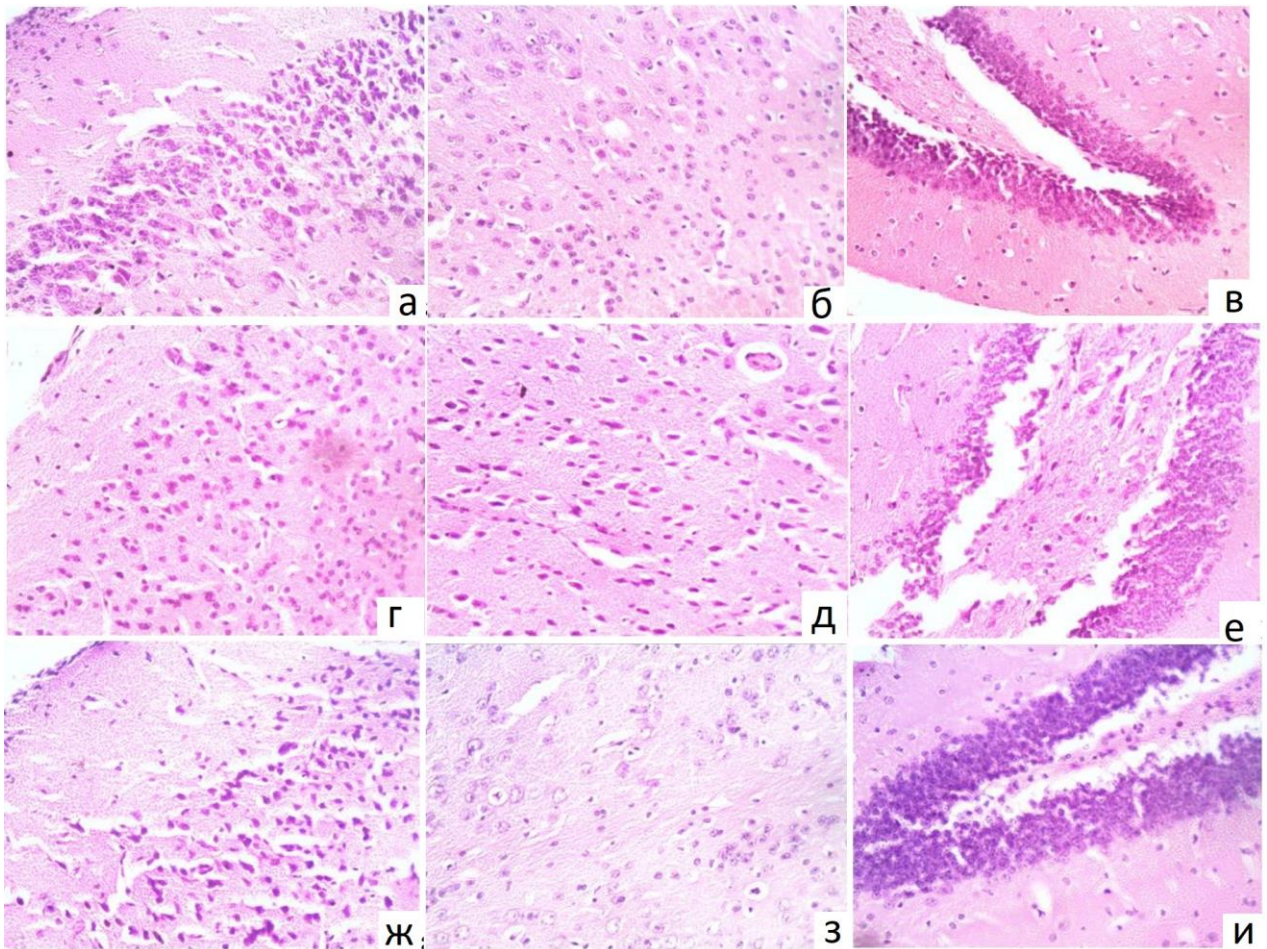


Рис. 3. Головний мозок самиць мишей: а, б, в – молодих; г, д, е – старіючих; ж, з, и – старіючих після імплантації КЕП; а, г, ж – зовнішня пластинка моторної кори півкуль ГМ; б, д, з – гліальна тканина; в, е, и – зубчаста звивина Амонова рогу гіпокампа. Забарвлення гематоксиліном та еозином, $\times 400$

Оцінка ефективності застосування імплантації кріоконсервованих експлантів плаценти для корекції порушень ЦНС у самиць мишей в моделі дисциркуляторної енцефалопатії в постменопаузі. З'ясувати патофізіологічні процеси та механізми ушкодження ГМ в результаті ішемії на тлі відсутності статевих гормонів з метою пошуку нових, ефективних методів лікування ДЕ в постменопаузі дозволяє використання комплексної моделі оклюзії загальних сонних артерій та оваріоектомії на лабораторних тваринах. Дослідження показало, що після оваріоектомії (група II ПМП), оклюзії сонних артерій (група III ДЕ), а також в моделі ДЕ в ПМП (група IV) в тесті «відкритого поля» кількість активів орієнтаційно-дослідницької поведінки мишей знижувалося, подовжувався час, проведений твариною в закритому рукаві хрестоподібного лабіринту, що є свідченням дезадаптації та стресового стану ЦНС піддослідних тварин. Дослідження когнітивно-мнестичних функцій мишей показало скорочення часу дослідження нового об'єкта в тесті запам'ятовування його положення тваринами з модельною патологією (таблиця).

При дослідженні міжпівкульної асиметрії (МА), як психофізіологічної основи побудови, регуляції та реалізації когнітивних процесів і адаптаційного захисту ЦНС, виявлено (таблиця), що зниження коефіцієнта МА (КМА) відбулося в групах тварин з моделлю ПМП та у тварин з моделлю ДЕ в ПМП; у тварин з ДЕ відбулася інверсія МА зі зміною знаку КМА та домінуючої півкулі.

Інверсія МА, що інтерпретується, як ознака ініціації адаптивних процесів, у піддослідних тварин з моделлю ДЕ та збереженою естрогенпродукуючою функцією гонад узгоджується з положенням про захисну дію естрогенів на ЦНС. У оваріоектомованих мишей з ДЕ (IV група) відбувалася дезадаптація, при якій спостерігався максимально знижений КМА без переміщення активності в субдомінантну півкулю, що є відображенням суттєвого порушення регуляторних функцій. Одночасне зниження КМА, скорочення часу дослідження положення нового об'єкта тваринами з модельованими ПМП, ДЕ та ДЕ в ПМП є підтвердженням патологічного впливу дефіциту естрогенів і хронічної ішемії мозку на адаптаційні та когнітивні функції тварин.

Таблиця

Орієнтаційно-дослідницька, зоосоціальна, анксиолітична поведінка та коефіцієнт міжпівкульної асиметрії мишей в модельних експериментах

Показники \ Групи	I К (контроль)	II ПМП	III ДЕ	IV ДЕ в ПМП	V ДЕ в ПМП +КЕП
Кількість відвіданих квадратів в тесті «відкрите поле»	158,2 ±21,3	84,7±8,3*	71,6±7,2*	80,2±11,1*	112,2 ±10,4
Кількість актів грумінгу в тесті «відкритого поля»	2,9±0,6	1,0±0,1	3,2±0,3	1,1±0,1*	1,6±0,3
Кількість стійок в тесті «відкрите поле»	47,9±7,3	29,3±2,3*	25,9±1,8*	7,3±4,2*,**	35,5 ±5,8**
Час, проведений твариною в закритому рукаві хрестоподібного лабіринту, с	145,9 ±13,4	198,7 ±17,2	243,7 ±20,3*	211,1 ±15,8*	202,9 ±23,2
Час, проведений з іншою твариною в трикамерному тесті, с	146,8±14,2	106,7±9,5	127,3±12,3	154,9±14,2	112,5±11,2
Час дослідження об'єктів, с	2,1±0,2	1,5±0,12	2,4±0,21	1,6±0,14	1,4±0,11*
Час дослідження нового об'єкта, с	5,1±0,5	1,7±0,15*	2,9±0,21*	3,0±0,4*	4,7±0,5
Коефіцієнт міжпівкульної асиметрії	8,0±0,6	4,7±0,2	-1,6±0,8	1,3±0,3	3,8±0,5
Домінантна півкуля	Ліва	Ліва	Права	Ліва	Ліва

Примітка: * – статистично значущі відмінності від I групи ($p < 0,05$),

** – статистично значущі відмінності від IV групи ($p < 0,05$).

Введення КЕП самицям з моделлю коморбідної патології (група V) наближало показники локомоторної активності та грумінгу до показників тварин контрольної групи. Також спостерігалася збільшення КМА до 47,5 % від його значення у мишей контрольної групи і майже в три рази від КМА у мишей в моделі ДЕ в ПМП, що доводить відновлюючий вплив КЕП на

адаптаційні і регуляторні процеси в організмі тварин. Встановлено істотне (на 56 %) збільшення часу дослідження нового об'єкта самицями V групи, що свідчить про поліпшення когнітивно-мнестичних функцій піддослідних мишей на тлі імплантації КЕП (таблиця).

Виявлені нейрофізіологічні зміни підтвердилися морфологічними ознаками в ГМ піддослідних тварин. В результаті гістологічного дослідження гіпокампа і моторної кори півкуль ГМ мишей з ДЕ в ПМП виявлено порушення цитоархітекτονіки і мікроциркуляції, а саме: хаотичне розташування та скорочення кількості нейронів зовнішньої пластинки моторної кори і зубчастої звивини Амонова рогу гіпокампа, набряк, стаз капілярів, ознаки патологічного розростання гліальної тканини і інфільтрації її макрофагами та гранулоцитами (рис. 4, а).

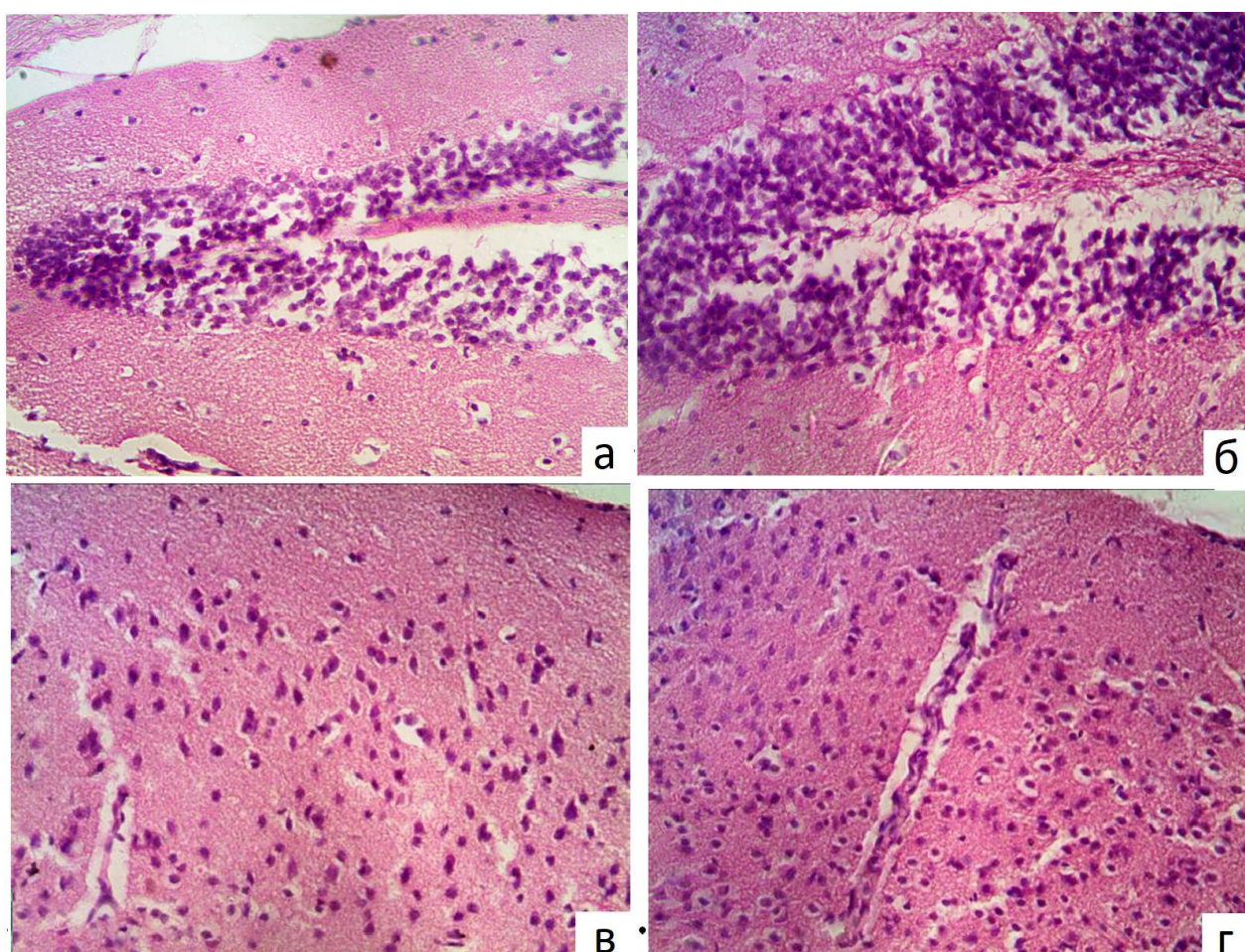


Рис. 4. Головний мозок самиці миші: а, б – зубчаста звивина Амонова рогу гіпокампу; в, г – моторна кора; а, в – в моделі ДЕ в ПМП; б, г – в моделі ДЕ в ПМП після імплантації КЕП. Забарвлення гематоксилином та еозином, $\times 400$

Моделювання ДЕ у оваріоектомованих самиць мишей призводило до формування ендотеліальної дисфункції капілярної мережі кори ГМ, що виражалося в значному набуханні ендотеліоцитів на тлі зменшення щільності з'єднань між клітинами, ознаках пригнічення їх проліферації, а також зниженні

щільності ядер. Капіляри кори ГМ знаходилися в стані вазоконстрикції (рис. 4, в). Зустрічалися дилатовані судини кори ГМ з агрегацією еритроцитів, що передуює утворенню тромбів.

Гістологічним дослідженням ГМ самиць мишей в моделі ДЕ в ПМП після імплантації КЕП встановлено ознаки відновлення його структури і мікроциркуляції: пірамідні нейрони зовнішньої пластинки моторної кори були розташовані широкою смугою, купчасто; тіла нейронів мали округлу форму і збільшену інтенсивність базofilії; ядра мали хроматин в конденсованому стані. В моторній корі півкуль ГМ виявлено ознаки інтенсивної проліферації клітин. Спостерігалась значна кількість дрібних кровоносних судин, незначний периваскулярний набряк. Судини кори півкуль ГМ були заповнені еритроцитами без ознак агрегації (рис. 4, г). В нейронах зубчастої звивини Амонова рогу гіпокампа виявлялися великі гіперхромні ядра, тіла нейронів мали округлу форму, спостерігались ознаки проліферації клітин (рис. 4, б). Також виявлено відновлення щільності ендотеліоцитів капілярної мережі ГМ і щільності їх ядер.

Морфометричні дослідження показали достовірне збільшення шару нейронів моторної кори від показника в моделі ДЕ в ПМП (рис. 5, А) та збільшення в 3,5 рази смуги нейронів в зубчастій звивині Амонова рогу гіпокампа (рис. 5, Б), що свідчить про відновлювальну дію а також ініціацію нейро- та ангиогенезу під впливом імплантації КЕП.

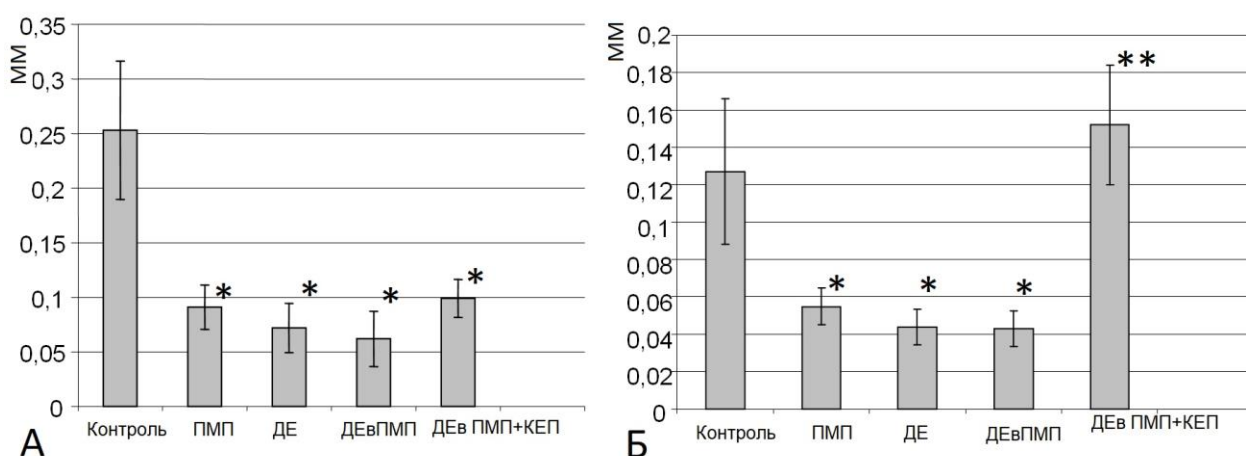


Рис. 5. Результати морфометричного дослідження ГМ самиць мишей в модельних експериментах: А – ширина шару нейронів моторної кори півкуль; Б – ширина смуги нейронів в зубчастій звивині Амонова рогу гіпокампа

Примітка: * – статистично значущі відмінності від показників контролю ($p < 0,05$), ** – статистично значущі відмінності від показників в моделі ДЕ в ПМП ($p < 0,05$).

Результати дисертаційного дослідження доводять коригуючу дію КЕП на такі патогенетичні ланки розвитку ДЕ в постменопаузі, як ендотеліальна дисфункція, дизбаланс та недостатність нейротрофічних і нейропротекторних речовин, ішемічне ураження ГМ та його наслідки для когнітивних функцій та адаптивних можливостей ЦНС в моделях на лабораторних тваринах.

Використання імплантації КЕП при експериментальній ДЕ в постменопаузі дозволило поліпшити показники поведінкових реакцій та суттєво вплинути на ушкоджені структури ГМ: відновлювалася мікроциркуляція, збільшувалася щільність ендотеліоцитів в судинах ГМ, стимулювалися ангіо- та нейрогенез в зубчастій звивині Амонова рогу гіпокампа і зовнішній пластинці моторної кори півкуль ГМ.

Позитивний терапевтичний ефект імплантації КЕП, включно з впливом на загальні фізичні характеристики тварин, їх поведінку, когнітивні функції, а також морфологічні зміни тканини гіпокампу і моторної кори, логічно пов'язати з наявністю у складі КЕП сполук, які впливають на відновлення щільності ендотеліоцитів та нейрогенеза, на поведінкові реакції, процеси адаптації та когнітивні функції. До таких речовин відносять білкові нейротрансмітери, як наприклад нейропептид Y (B. Spencer, 2016), гормони, цитокіни, чинники росту, які є сигнальними молекулами, що беруть участь також в механізмах епігеномної регуляції. Таким чином, імплантацію КЕП в постменопаузальний період можна визначити як перспективний, патогенетично обґрунтований лікувально-профілактичний метод боротьби з ДЕ та її наслідками.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі представлено теоретичне узагальнення і нове вирішення наукової задачі, спрямоване на комплексне вивчення впливу імплантації кріоконсервованих експлантів плаценти на перебіг експериментальної дисциркуляторної енцефалопатії в постменопаузі. На підставі аналізу функціонального стану НК при моделюванні ексайтотоксичності, фізичних, нейрофізіологічних показників, гістологічного дослідження ГМ тварин в моделі ДЕ в ПМП визначено позитивний вплив імплантації КЕП на виживанність, адаптаційні та когнітивно-мнестичні функції, на мікроциркуляцію, цитоархітектоніку в ГМ тварин, що дозволило зробити наступні висновки:

1. Середовище, кондиційоване з КЕП, *in vitro* підвищує метаболічну активність нервових клітин піддослідних тварин на 30 %, має нейротрофічну, відновлювальну дію в моделі глутамат-індукованої ексайтотоксичності: збільшує метаболічну активність НК на 20,6 % та вдвічі більш значиму нейропротекторну дію. Біологічно активні чинники в складі КЕП є термолабільними та інактивуються при нагріванні до 95 °С.
2. Тривалість життя самиць мишей не змінюється після імплантації КЕП, при цьому вірогідність їх смерті в репродуктивний період зменшується. Введення КЕП самцям мишей підвищує на 18 % їх середню, та на 17 % максимальну тривалість життя. Фізичний стан мишей обох статей покращується після введення КЕП.
3. Імплантація КЕП активує зоосоціальну, орієнтаційно-дослідницьку поведінку і збільшує стресостійкість самиць мишей на 30,3 %, проте достовірно погіршує показники орієнтаційно-дослідницької, зоосоціальної та анксиолітичної поведінки самців.

4. В головному мозку старіючих мишей, яким були імплантовані КЕП, відбуваються позитивні зміни: збереження чисельності та щільності пірамідних нейронів зовнішньої пластинки моторної кори півкуль ГМ, зменшення кількості гіпохромних нейронів та проявів енцефалопатії.
5. Внаслідок імплантації КЕП мишам при моделюванні ДЕ в постменопаузі з'являються ознаки відновлення мікросудинного русла, цитоархітекτονіки та проліферації ендотеліоцитів, а також пірамідних нейронів зовнішньої пластинки моторної кори півкуль ГМ і зубчастої звивини Амонова рогу гіпокампа. Ширина шару нейронів моторної кори півкуль ГМ збільшується в 1,5 рази, смуга нейронів в зубчастій звивині Амонова рогу гіпокампа - в 3,5 рази від значення показника в моделі ДЕ в ПМП.
6. Імплантація КЕП позитивно впливає на нейрофізіологічні показники самиць мишей в моделі ДЕ в ПМП: покращується їх орієнтаційно-дослідницька поведінка (кількість відвіданих квадратів зростає в 1,4 рази), зменшується тривожність, зростає стресостійкість, покращуються когнітивні функції (час дослідження нового об'єкта збільшується на 56 %) та адаптаційні можливості ЦНС (коефіцієнт міжпівкульної асиметрії збільшується до 50 %).
7. Імплантація кріоконсервованих експлантів плаценти позитивно впливає на перебіг експериментальної ДЕ в ПМП і може розглядатися, як перспективний, патогенетично обґрунтований лікувально-профілактичний метод боротьби з дисциркуляторною енцефалопатією та її наслідками.

ПЕРЕЛІК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у фахових журналах

1. Прокопюк О. С., Шевченко Н. О., Прокопюк В. Ю., **Чуб О. В.**, Терехова О. О. Вплив кріоконсервованих біооб'єктів плацентарного походження на культуру клітин. *Вісник проблем біології і медицини*. 2015. Вип. 3, Том 1 (122). С. 160–164.
2. Prokopyuk V. Yu., Falko O. V., Musatova I. B., Prokopyuk O. S., Royenko O. O., Terekhova O. O., **Chub O. V.** Low Temperature Preservation and Storage of Placental Biological Derivatives. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine*. 2015. Vol. 25. No. 4. P. 291–310. (*Scopus*).
3. Prokopyuk V. Yu., **Chub O. V.**, Shevchenko. M. V., Prokopyuk O. S. Placental stem cells, organotypic culture and human placenta extract have neuroprotective activity *in vitro*. *Cell and Organ Transplantology*. 2017. Vol. 5. No.1. P. 34–38.
4. Prokopyuk V. Yu., **Chub O. V.**, Shevchenko N.A., Falko O.V. 1, Musatova I.B., Lazurenko V. V., Tischenko A. N., Prokopyuk O. S. Cryopreserved Placental Explants Increase Lifespan of Male Mice and Change Survival Features of Female Mice. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine*. 2017. Vol. 27. No. 2. P. 143–150. (*Scopus*).
5. Musatova I.B., Volina V. V., **Chub O. V.**, Prokopyuk V. Yu., Prokopyuk O. S. Effects of Implantation of Cryopreserved Placental Explants on the Behavioral Indices and Morphological Characteristics of the Cerebral Structures in Senescent Mice. *Neurophysiology*. Vol. 49. No. 5. October, 2017. P. 363–371. (*Scopus*).

- Стаття і тези в матеріалах наукових конференцій, Національних конгресів
6. Мусатова І. Б., **Чуб О. В.**, Прокопюк В. Ю., Прокопюк О. С., Фалько О. В., Шевченко Н. А. Структура поведення мишей позднего онтогенеза после имплантации криоконсервированных эксплантов плаценты. *Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине: материалы VIII международной науч.-практ. конф. Санкт-Петербург (Россия), 20-22 мая 2015 года. Проблемы развития высоких технологий.* 2015. Т.1 С. 84–87.
 7. **Чуб О. В.**, Мусатова І. Б., Прокопюк В. Ю., Карпенко В. Г. Влияние имплантации криоконсервированных эксплантов плаценты на структуру поведення самок мишей позднего онтогенеза. *Холод в біології та медицині: матеріали 39-ої щорічної конференції молодих вчених, м. Харків, 20-21 травня 2015 р. Проблемы криобиологии и криомедицины.* 2015. Т. 25. № 2. С. 192. (Scopus).
 8. **Чуб О. В.**, Шевченко М. А., Прокопюк В. Ю. Нейропротекторный эффект факторов плацентарного происхождения в модели глутамат-индуцированной токсичности клеток головного мозга новорожденных крыс. *Холод в біології та медицині: матеріали 40-ої щорічної конференції молодих вчених, м. Харків, 23-24 травня 2016 р. Проблемы криобиологии и криомедицины.* 2016. Т. 26. № 2. С. 176. (Scopus).
 9. **Чуб О. В.**, Прокопюк В. Ю., Прокопюк О. С., Мусатова І. Б., Шевченко М. В. Кріоконсервовані плацентарні біопрепарати в профілактиці і корекції дисфункції ЦНС в пізньому онтогенезі (експериментальне дослідження). *Матеріали VI Національного конгресу геронтологів і геріатрів України, м. Київ, 19-21 жовтня 2016 р. Проблемы старения и долголетия.* 2016. Т.25. С. 44.
 10. **Чуб О. В.**, Прокопюк В. Ю., Мусатова І. Б., Прокопюк О. С. Влияние имплантации криоконсервированных эксплантов плаценты на продолжительность и качество жизни (экспериментальное исследование) *Холод в біології та медицині: матеріали 41-ої щорічної конференції молодих вчених, м. Харків, 24-25 травня 2017 р. Проблемы криобиологии и криомедицины.* 2017. Т. 27. № 2. С. 184. (Scopus).
 11. Skybina K. P., **Chub O. V.**, Prokopyuk V. Yu., Shevchenko M. V. Placental factors protects neural cells from glutamate-induced toxicity *Topical issues of new drugs development: Abstracts of XXIII International Scientific And Practical Conference Of Young Scientists And Student, April 21, 2016, Kharkiv, in 2 vol. Kh.: Publishing Office NUPh, 2016. Vol.2. P. 106.*
 12. Прокопюк В.Ю., **Чуб О.В.**, Шевченко М.А. Глутаматна ексайтотоксичність як метод вибору оцінки нейропротекторної дії лікарських препаратів *in vitro*. *Патофізіологія і фармація: шляхи інтеграції: тези доповідей VII Національного конгресу патофізіологів України з міжнародною участю, м. Харків, 5 – 7 жовтня 2016.* Харків: Вид-во НФаУ, 2016. С. 187.
 13. **Чуб О. В.**, Мусатова І. Б., Прокопюк В. Ю., Карпенко В. Г. Адаптаційні можливості організму мишей пізнього онтогенезу після імплантації

- кріоконсервованих експлантів плаценти. *Стратегії профілактики неінфекційних хвороб та шляхи їх реалізації: від постулатів минулого в майбутнє: матеріали наук.-практ. конференції за участю міжнародних спеціалістів, м. Харків, 4 листопада 2016 р.* Харків, 2016. С.240.
14. **Chub O. V.**, Prokopiuk V. Yu., Musatova I. B., Prokopiuk O. S. Placental factors can increase lifespan and healthspan in mice. *Збірка наукових публікацій I всеукраїнського конкурсу наукових робіт студентів та молодих вчених медико-фармацевтичного профілю, м. Київ, 17 лютого 2017 р.* Київ, 2017. С. 43–44.
15. **Чуб О. В.**, Прокопюк В. Ю., Мусатова І. Б., Прокопюк О. С. Кріоконсервовані експланти плаценти підвищують тривалість життя самців і знижують імовірність смерті самиць в репродуктивний період. *Актуальні питання сучасної медицини: тези доповідей XIV Міжнародної наукової конференції студентів, аспірантів, докторантів, молодих вчених та фахівців, м. Харків, 30–31 березня 2017 р.* Харків, 2017. С. 88–89.
16. Prokopiuk V. Yu., Musatova I. B., Shevchenko M. V., Shevchenko N. O., Prokopiuk O. S., **Chub O. V.** Placental MSCs, explants, extract protect neural cells against glutamate-induced toxicity. *Program and Abstract Book 8th International Symposium on Experimental and Clinical Neurobiolog, Kosice, Slovakia, June 18 – 21, 2017.* Kosice, 2017. P. 72.
- Патенти України на корисну модель
17. Спосіб лікування когнітивних порушень при дисциркуляторній енцефалопатії в постменопаузі: пат. 124910 Україна. (51) МПК А61К 35/16,) МПК А61Р 25/28 / В. Ю. Прокопюк, І. Б. Мусатова, **О. В. Чуб**, О. С. Прокопюк, В. В. Воліна; заявник та патентовласник ІПК і К НАН України. № u201711312, заявл. 20.11.17. Опубл. 25.04.18. Бюл. № 8.

АНОТАЦІЯ

Чуб О.В. Вплив кріоконсервованих експлантів плаценти на перебіг дисциркуляторної енцефалопатії в постменопаузі (експериментальне дослідження). – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.01.35 – кріомедицина. – Інститут проблем кріобіології та кріомедицини НАН України, Харків, 2019.

Дисертацію присвячено дослідженню впливу кріоконсервованих експлантів плаценти (КЕП) на перебіг дисциркуляторної енцефалопатії (ДЕ) у постменопаузальному періоді в експериментальних моделях.

Встановлено, що середовища, кондиційовані з КЕП, чинять нейротрофічну і нейропротекторну дію в моделі глутамат-індукованої ексайтотоксичності на культуру нервових клітин *in vitro*. Імплантація КЕП не змінює тривалість життя самиць, однак зменшує вірогідність їх смерті в репродуктивному періоді, позитивно впливає на їх зоосоціальну, орієнтаційно-дослідницьку поведінку і значуще зменшує тривожність. Середня тривалість життя самців мишей після імплантації їм КЕП збільшується на 18 %, максимальна – на 17 %, покращується зовнішній вигляд і фізична сила, проте

погіршуються показники орієнтаційно-дослідницької, зоосоціальної та анксиолітичної поведінки. При вивченні впливу імплантації КЕП на нейрофізіологічні показники оваріоектомованих мишей в моделі ДЕ показано покращення когнітивних функцій та адаптаційних можливостей центральної нервової системи піддослідних тварин. Застосування імплантації КЕП призводить до відновлення мікроциркуляції, цитоархітекτονіки та стимуляції проліферації ендотеліоцитів, пірамідних нейронів зовнішньої пластинки моторної кори та зубчастої звивини Амонова рогу гіпокампа ГМ мишей. Імплантація кріоконсервованих експлантів плаценти позитивно впливає на перебіг експериментальної коморбідної патології, що досліджувалася і може розглядатися, як перспективний, патогенетично обґрунтований метод боротьби з ДЕ в постменопаузі та її наслідками.

Ключові слова: кріоконсервовані експланти плаценти, дисциркуляторна енцефалопатія, постменопауза, когнітивні функції, поведінка.

АННОТАЦІЯ

Чуб О.В. Влияние кріоконсервированных експлантов плаценты на течение дисциркуляторной энцефалопатии в постменопаузе (экспериментальное исследование). – Квалификационная научная работа на правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.01.35 – криомедицина. – Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков, 2019.

Диссертационная работа посвящена исследованию влияния кріоконсервированных експлантов плаценты (КЭП) на течение дисциркуляторной энцефалопатии (ДЭ) в постменопаузальном периоде в экспериментальных моделях.

Установлено позитивное нейротропное действие КЭП в системе *in vitro*. Показано, что среда, кондиционированная с КЭП повышает метаболическую активность культуры нервных клеток головного мозга на 30 %. Выявлены нейропротекторное и нейротрофическое действия КЭП в модели глутаматной эксайтотоксичности, которая отражает нарушение метаболической активности нервных клеток вследствие их перевозбуждения и истощения при ДЭ в постменопаузе. Предварительное, перед эксайтотоксическим воздействием глутамата, культивирование нервных клеток в среде инкубирования КЭП, увеличивает их метаболическую активность на 41,2 % по сравнению с нервными клетками, которые не были прекультивированы в среде инкубирования КЭП и подверглись эксайтотоксическому воздействию. Культивирование нервных клеток в среде инкубирования КЭП после эксайтотоксического влияния глутамата также восстанавливает их метаболическую активность, превышая этот показатель нервных клеток, подвергавшихся эксайтотоксическому действию глутамата, на 20,6 %. Установлено, что плацентарные факторы, обеспечивающие реализацию выявленных эффектов являются термолабильными, инактивируются после нагревания среды инкубирования КЭП до 95°C. Это ориентирует на

использование низких температур в технологиях получения биопрепаратов из плаценты для экспериментального или клинического применения.

В экспериментах *in vivo*, при исследовании влияния КЭП на такие интегральные показатели, как продолжительность и качество жизни, были установлены особенности этого влияния в зависимости от пола подопытных животных. Средняя продолжительность жизни самцов мышей после имплантации КЭП увеличивается на 18 %, 50 % -ое выживание – на 17 %, 90 % -ое выживание – на 20 %, максимальная продолжительность жизни – на 17 %. Однако ухудшаются показатели их ориентационно-исследовательского, зоосоциального и анксиолитического поведения. Использование КЭП не изменяет продолжительность жизни самок, однако значительно уменьшает вероятность их смерти в репродуктивный период. Возрастные изменения поведения самок мышей позднего онтогенеза поддаются коррекции при помощи имплантации КЭП: улучшаются показатели в тестах исследования ориентационно-исследовательского поведения, снижается тревожность, повышается стрессоустойчивость, оптимизируются показатели зоосоциальной активности с разно- и однополым животным.

Установлено, что имплантация КЭП стареющим и овариоэктомированным мышам при моделировании ДЭ положительно влияет на морфологию гиппокампа и моторной коры полушарий головного мозга: появляются качественные признаки восстановления цитоархитектоники, микроциркуляции и пролиферации эндотелиоцитов, а также сохранности и восстановления нейронов наружной пластинки моторной коры полушарий головного мозга и зубчатой извилины Амонова рога гиппокампа. Ширина слоя нейронов моторной коры полушарий головного мозга увеличивается в 1,5 раза, полоса нейронов в зубчатой извилине Амонова рога гиппокампа – в 3,5 раза относительно значений в модели ДЭ в постменопаузе. Восстановление структур головного мозга самок мышей в модели изучаемой коморбидной патологии после введения им КЭП позитивно меняет показатели подопытных животных в нейрофизиологических тестах. Нормализуется ориентационно-исследовательское поведение, улучшаются когнитивные функции (время исследования нового объекта увеличивается на 56 %), повышается стрессоустойчивость и адаптационные возможности центральной нервной системы (коэффициент межполушарной асимметрии повышается до 50 %).

Таким образом, данные, полученные в ходе выполнения диссертационного исследования свидетельствуют о том, что имплантация криоконсервированных эксплантов плаценты позитивно влияет на течение экспериментальной ДЭ в постменопаузе и рассматривается, как перспективный, патогенетически обоснованный лечебно-профилактический метод борьбы с дисциркуляторной энцефалопатией и её последствиями.

Ключевые слова: криоконсервированные экспланты плаценты, дисциркуляторная энцефалопатия, постменопауза, когнитивные функции, поведение.

ANNOTATION

Chub O.V. Effect of cryopreserved placental explants on course of postmenopausal dyscirculatory encephalopathy (experimental study). – The qualifying scientific paper as a manuscript.

Thesis for the degree of Candidate of Medical Sciences in specialty 14.01.35 – Cryomedicine (022 – Health Care) – Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, 2019.

The dissertation is devoted to the study of the influence of cryopreserved placental explants (CPE) on the course of dyscirculatory encephalopathy (DE) in postmenopausal period in experimental models.

It has been shown that the media, conditioned with CPE have a neurotrophic and neuroprotective effect in the glutamate-induced excitotoxicity model on the neural cells *in vitro*. CPE implantation does not change the lifespan of females, but reduces the probability of their death in the reproductive period, has positive effect on their zoosocial, orientational, research activity and significantly reduces anxiety. The average lifespan of male mice after CPE implantation increases by 18%, the maximal - by 17%, general condition and physical strength are improving, however indexes of orientational, research, zoosocial and anxiolytic behavior are deteriorating. During studying of the effect of CPE implantation on neurophysiological indices of ovariectomized mice with DE model the improvement of cognitive functions and central nervous system adaptation capabilities was determined. The CPE implantation leads to the restoration of microcirculatory vessel, cytoarchitectonics of brain and stimulation of proliferation of endothelial cells, increasing the preservation of motor cortical and hippocampal neurons in aged mice. Implantation of cryopreserved placenta explants have positive effect on course of DE in postmenopausal period and can be considered as a promising, pathogenetically validated method for overcoming DE and its consequences.

Key words: cryopreserved placental explants, dyscirculatory encephalopathy, postmenopausal period, cognitive functions, behavior.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

ГМ – головний мозок

ДЕ – дисциркуляторна енцефалопатія

КЕП – кріоконсервований експлант плаценти

КМА – коефіцієнт міжпівкульної асиметрії

МА – міжпівкульна асиметрія

НК – нервові клітини,

ПМП – постменопауза

ЦНС – центральна нервова система

МТТ – 3-(4,5-диметилтіазол-2-ил)-2,5-дифеніл-тетразоліум бромід.

Відповідальний за випуск – д.б.н. Г.О. Бабійчук

Підписано до друку 23.07.2019 р. Формат 60x84 1/16. Умов. друк. арк. 0,9.

Тираж 100 прим.