

УДК 615,361:618.46]:57.086.13:611.018.013.395:612.621/627.085.23

В.Ю. Прокопюк

## Вплив середовищ, кондиційованих кріоконсервованими та свіжовиділеними експлантами та клітинами плаценти, на органотипові культури маток та яєчників мишей

UDC 615,361:618.46]:57.086.13:611.018.013.395:612.621/627.085.23

V.Yu. Prokopiuk

### Influence of Media Conditioned by Cryopreserved and Fresh Placental Explants and Cells on Murine Uterine and Ovarian Organotypic Cultures

**Реферат:** У сучасній репродуктології широко застосовуються методи клітинної та тканинної терапії, перспективними об'єктами якої є похідні плаценти, що впливають безпосередньо на жіночу репродуктивну систему та ланки її регуляції. Механізми такої взаємодії залишаються остаточно нез'ясованими. У роботі досліджено вплив середовищ, кондиційованих кріоконсервованими і нативними клітинами та експлантами плаценти, на органотипові культури яєчників, маток мишей та культуру фібробластів. Культури оцінено за допомогою морфологічних методів та метаболічних тестів. Показано, що кондиційовані середовища стимулюють метаболічну активність культур маток та пригнічують метаболічну активність культур яєчників. Відсутність реакції фібробластів на ці середовища свідчить про вплив гуморальних факторів плацентарного походження безпосередньо на генеративні елементи яєчника та компоненти ендометрію без залучення елементів сполучної тканини. Встановлено, що властивості середовищ, кондиційованих свіжовиділеними та кріоконсервованими клітинами та експлантами плаценти, значуще не відрізнялися.

**Ключові слова:** плацента, мезенхімальні стовбурові клітини, яєчник, матка, фібробласти, культивування.

**Реферат:** В современной репродуктологии широко используются методы клеточной и тканевой терапии, перспективными объектами которой являются производные плаценты, которые влияют непосредственно на женскую половую систему и уровни ее регуляции. Механизмы такого взаимодействия остаются окончательно невыясненными. В работе изучено влияние сред, кондиционированных крíoкóнсервированными, свежéвыделенными клетками и эксплантами плаценты, на изолированные культуры яичников, маток мышей и культуру фибробластов. Культуры оценены с помощью морфологических методов и метаболических тестов. Показано, что кондиционированные среды стимулируют метаболическую активность культур маток и угнетают метаболическую активность культур яичников. Отсутствие реакции фибробластов на эти среды свидетельствует о влиянии гуморальных факторов плацентарного происхождения непосредственно на генеративные элементы яичников и эндометрий без задействования элементов соединительной ткани. Установлено, что свойства сред, кондиционированных нативными, крíoкóнсервированными клетками и эксплантами плаценты, значительно не отличались.

**Ключевые слова:** плацента, мезенхимальные стволовые клетки, яичник, матка, фибробласты, культивирование.

**Abstract:** Contemporary reproductive medicine involves the methods of cell and tissue therapy, which among others involve the placental products, affecting mainly female reproductive system and its regulation levels. The mechanisms of this interaction have still remained unclear. Here the influence of the media, conditioned with cryopreserved and fresh placental cells and explants on isolated murine ovarian, uterine organotypic cultures and fibroblast culture was studied. The cultures were evaluated using morphological methods and metabolic tests. Conditioned media were shown to stimulate metabolic activity of the uterine culture and to suppress ovarian culture. No response to these media was found in fibroblasts testifying to a direct influence of placental humoral factors on ovarian generative elements and endometrium, without involvement of connective tissue. The features of the media, conditioned with the fresh and cryopreserved placental cells and explants were established as not significantly different.

**Key words:** placenta, mesenchymal stem cells, ovary, uterus, fibroblasts, culture.

Сучасні методи клітинної та тканинної терапії відкривають нові можливості в лікуванні ряду захворювань, зокрема пов'язаних із порушенням жіночого репродуктивного здоров'я [2, 6, 21].

Відомо, що специфічний вплив на жіночу репродуктивну систему має плацента та її похідні (клітини, тканини, біологічно активні сполуки) [2, 17, 20]. З перших днів вагітності гуморальні

Contemporary methods in cell and tissue therapy open new opportunities in therapy of many diseases, in particular disorders associated with women's reproductive health [3, 12, 20].

Placenta and its derivatives (cells, tissues, biologically active compounds) are known to have a specific effect on female reproductive system [12, 15, 19]. From the first days of pregnancy the humoral factors, secreted

Відділ кріобіології системи репродукції, Інститут проблем кріобіології та кріомедицини НАН України, Харків

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

**Адреса для кореспонденції:**

вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61016;  
тел.: (+38 057) 373-74-35, факс: (+38 057) 373-59-52  
електронна пошта: v.yu.prokopiuk@gmail.com

**Address for correspondence:**

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

Надійшла 06.03.2018

Прийнята до друку 22.05.2018

Received March, 06, 2018

Accepted May, 22, 2018

© 2018 V.Yu.Prokopiuk. 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.

фактори, що секретуються трофобластом, впливають на функціонування репродуктивних органів (яєчників, матки), адаптують організм до гестаційних потреб [8]. Під час вагітності змінюються перебіг ряду захворювань, реакції на зовнішній вплив та адаптаційні можливості організму [1]. Подібні зміни спостерігаються у пацієнтів після клітинної та тканинної терапії з застосуванням похідних плаценти [19, 22].

Стовбурові клітини, виділені з плацентарного матеріалу, за рядом характеристик відрізняються від клітин, одержаних з інших джерел [14, 15, 23]. Плацента людини є утильним матеріалом, що дозволяє уникнути більшості етичних проблем. Вона має знижену імуногенність та адаптована до існування в генетично чужорідних умовах [15, 17, 23]. Застосування похідних плаценти в клінічній практиці потребує створення низькотемпературного банку та розвитку кріотехнологій [10, 11, 16].

За регуляцію жіночої статевої системи відповідають кора головного мозку, гіпофіз, гіпоталамус, яєчники. Органами-мішенями є яєчники, матка, молочні залози [1, 12]. На функціонування репродуктивної системи жінок впливають імунна, кровоносна системи, елементи строми органів. Між цими органами та системами існують прямі та зворотні зв'язки. В наших попередніх дослідженнях було продемонстровано, що похідні плаценти мають специфічний вплив на жіночу статеву систему в нормі та при патологічних станах [18, 19]. Крім того, була доведена можливість кріоконсервування похідних плаценти [3, 16], їх перспективність для лікування захворювань жіночої статевої системи.

Для виявлення механізмів нових методів лікування необхідно визначити, на яку саме ланку впливає досліджуваний агент, які зміни є вторинними [18, 19], як змінюється цей вплив після кріоконсервування [10]. Механізми впливу похідних плаценти на функційні елементи яєчника та матки можуть реалізуватися як безпосередньо, так і через компоненти сполучної тканини, нервову, ендокринну та кровоносну системи, а також через взаємодію репродуктивних органів [1, 8, 12]. Крім того, дія стовбурових клітин може реалізовуватися як через гуморальні фактори, так і через ефекти пластичності, хоумінгу та спрямованого диференціювання [15, 23]. Нез'ясованим залишається вплив кріоконсервування на біологічну активність похідних плаценти відносно органів репродуктивної системи.

Мета роботи – визначити вплив середовищ, кондиційованих кріоконсервованими, свіжовиділеними клітинами, експлантами плаценти, на органотипові культури маток та яєчників *in vitro*.

by trophoblast, affect the functioning of reproductive organs (ovaries, uterus), adapt a body to gestational needs [5]. During pregnancy the course of some diseases, responses to external effects and adaptive possibilities of a body are changed [24]. Similar responses are observed in the patients after cell and tissue therapy using placental derivatives [17, 21].

The placenta-derived stem cells differ by some characteristics from those, procured from other sources [11, 13, 22]. Following labor the human placenta is often disposed, *i. e.* its usage enables to avoid most of the major ethical problems; moreover has a reduced immunogenicity, being adapted thereby to genetically alien conditions [13, 15, 22]. The use of placental products in clinical practice needs establishing a low temperature bank and development of cryotechnology [7, 8, 14].

Female reproductive system is regulated by brain cortex, pituitary gland, hypothalamus and ovaries. The ovaries, uterus, mammary glands are the target organs [9, 24]. The functioning of female reproductive system is affected by the immune and circulatory systems, organ stromal elements. There are direct and reverse relationship between these organs and systems. In the previous studies it was demonstrated that placental derivatives had a specific effect on female reproductive system under normal and pathological conditions [16, 17]. In addition, the possibility to cryopreserve placental products [18, 14], as well as their prospects in therapy of the female reproductive system diseases have been proven.

In order to reveal the action mechanisms of novel therapeutic methods it is necessary to identify which part of the system would be affected by the studied agent, which changes would be secondary [16, 17], and which way this influence would change after cryopreservation [7]. The effect mechanisms of placental derivatives on functional elements of ovary and uterus may be implemented both directly and through the components of connective tissue, nervous, endocrine and circulatory systems, via interaction of reproductive organs [5, 9, 24]. In addition, the action of stem cells may be realized both through humoral factors and via the effects of plasticity, homing and directed differentiation [13, 22]. The effect of cryopreservation on biological activity of placental derivatives towards the organs of reproductive system has still remained unclear.

The research aim was to determine the effect of cryopreserved and freshly isolated placental cells- and explants-conditioned media on uterine and ovarian organotypic cultures *in vitro*.

## Materials and methods

The study involved the assessment of the effect of the media, conditioned with fresh placental cells (PCs), cryopreserved placental cells (CPCs), freshly placental



## Матеріали та методи

У роботі оцінювали вплив середовищ, кондиційованих свіжовиділеними клітинами плаценти (КП), кріоконсервованими клітинами плаценти (ККП), свіжовиділеними експлантами плаценти (ЕП), кріоконсервованими експлантами плаценти (КЕП), на органотипові культури яєчників, матки та культуру фібробластів для визначення ролі сполучної тканини цих органів у реакції на гуморальні фактори плацентарного походження. Досліджувані об'єкти культивували в кондиційованих середовищах протягом доби, стан культур оцінювали морфологічно та за допомогою тестів метаболічної активності.

Плаценти отримували за інформованою згодою жінок після операції кесаревого розтину. Були використані культури з трьох різних плацент. Експланти плаценти, розміром не більше 3 мм отримували відокремленням ворсин плаценти гострим шляхом [3], КП – ферментативним методом із використанням 0,25%-го трипсину («BioWest», Франція) [13].

Зразки КП та ЕП кріоконсервували за раніше застосованою програмою [3, 16]. У якості кріозахисного середовища використовували DMEM high glucose with L-Glutamine («BioWest») з 10% фетальної бичачої сироватки (ФБС) («Lonza», Німеччина) і 10% диметилсульфоксиду («Sigma», США). Зразки заморожували в кріопробірках («Nunc», США) зі швидкістю 1 град/хв до  $-70^{\circ}\text{C}$  із використанням контейнерів «Mr.Frosty™ Freezing Container» («Thermo Fisher Scientific», США) із наступним їх зануренням у рідкий азот для зберігання. Розморювали на водяній бані при  $37^{\circ}\text{C}$ .

Для отримання середовищ, кондиційованих ЕП та КЕП, 10 мг кріоконсервованих або свіжовиділених експлантів плаценти культивували протягом доби у 24-лункових планшетах («SPL», Корея) у 1 мл DMEM у  $\text{CO}_2$ -інкубаторі («Thermo Fisher Scientific») при  $37^{\circ}\text{C}$  та 5%  $\text{CO}_2$  [18].

Для отримання середовищ, кондиційованих КП та ККП, клітини культивували до формування моношару (близько  $1 \times 10^6$  у 5 мл середовища на флаконах із площею поверхні  $25 \text{ cm}^2$  («SPL»)), середовище міняли, культивували протягом доби на середовищі DMEM при  $37^{\circ}\text{C}$  та 5%  $\text{CO}_2$ .

Органотипове культивування маток та яєчників проводили за методом Y. Yasuda та співавт. [24] із модифікаціями. Для цього у мишей лінії BALB/c у фазі еструсу виділяли матки, розрізали у поперечному напрямку на фрагменти до 3 мм у довжину. Яєчники відокремлювали від оточуючої жирової тканини, не фрагментували, оскільки їх розмір не перевищував 2–3 мм. Культивували в 24-лункових планшетах із розрахунку 10 мг тканини на 1 мл середовища DMEM при  $37^{\circ}\text{C}$  і 5%  $\text{CO}_2$ . Негативним

експлантами (PEs), cryopreserved placental explants (CPEs) on organotypic ovarian and uterine cultures and culture of fibroblasts to determine the role of connective tissue of these organs in response to humoral factors of placental origin. The studied objects were cultured in conditioned media during 1 day, the state of cultures was evaluated morphologically and by the metabolic activity tests.

The placentas were procured with the informed consent of women after cesarean section. The cultures from three different placentas were used. The placental explants of no more than 3 mm in size were obtained by separating placental villi by a sharp dissection [18], the PCs were derived using an enzymatic method with 0.25% trypsin (BioWest, France) [10].

The PCs and PEs were cryopreserved according to the previously applied protocol [14, 18]. The DMEM high glucose with L-Glutamine (BioWest) with 10% fetal bovine serum (FBS) (Lonza, Germany) and 10% dimethyl sulfoxide (Sigma, USA) were used as a cryoprotective medium. The specimens were frozen in cryotubes (Nunc, USA) with 1 deg/min cooling rate down to  $-70^{\circ}\text{C}$  using Mr. Frosty freezing containers (Thermo Fisher Scientific, USA) followed by immersion into liquid nitrogen for storage. They were thawed in a water bath at  $37^{\circ}\text{C}$ .

To obtain the media, conditioned with PEs and CPEs, 10 mg of either cryopreserved or fresh placental explants were cultured during 1 day in 24-well plates (SPL, Korea) in 1 ml DMEM in  $\text{CO}_2$  incubator (Thermo Fisher Scientific) at  $37^{\circ}\text{C}$  and 5%  $\text{CO}_2$  [16].

In order to procure the medium, conditioned with PCs and CPCs, the cells were cultured up to monolayer formation (about  $1 \times 10^6$  in 5 ml medium on flasks with  $25 \text{ cm}^2$  surface area (SPL)), the medium was changed, cultured within 1 day with DMEM medium at  $37^{\circ}\text{C}$  and 5%  $\text{CO}_2$ .

For organotypic culture of uterus and ovaries the method of Y. Yasuda *et al.* [23] with modifications was used. For this purpose, the uteri of BALB/c mice in estrus phase were separated, and then cut transversely to the fragments of up to 3 mm in length. The ovaries were separated from surrounding adipose tissue, not fragmented, because their size did not exceed 2–3 mm. They were cultured in 24-well plates in terms of 10 mg of tissue per 1 ml DMEM at  $37^{\circ}\text{C}$  and 5%  $\text{CO}_2$ . The ovarian and uterine cultures, devitalized by treatment in 96° ethanol for 30 min and washed out with culture medium, served as the negative control.

Fibroblasts were procured according to X. Luan *et al.* [10] with modifications. The skin of BALB/c mice fetuses to day 18 of pregnancy was fragmented up to 1–2 mm, incubated in the presence of 0.25% trypsin for 1 hour at  $37^{\circ}\text{C}$ . After trypsin inactivation with 10% FBS the suspension was passed through a 100  $\mu\text{m}$





контролем були культури яєчників та маток, девіталізовані в 96° етанолі протягом 30 хв та відмиті середовищем культивування.

Фібробласти отримували за методом Х. Лун та співавт. [13] з модифікаціями. Шкіру плодів мишей лінії BALB/c на 18-ту добу вагітності фрагментували до 1–2 мм, інкубували в присутності 0,25%-го трипсину протягом години при 37°C. Після інактивації трипсину 10% ФБС суспензію пропускали через клітинний фільтр 100 мкм («BD Biosciences», США), клітинний осад відмивали, ресуспендували в DMEM із додаванням 10% ФБС, антибіотика-антимікотика («PPA», Австрія). Клітини культивували на флаконах із площею поверхні 25 см<sup>2</sup> («PPA») при 37°C і 5% CO<sub>2</sub>. Середовище міняли кожні 2–3 доби, пересівали при формуванні моношару. В експериментах застосовували клітини четвертого пасажу.

Тест відновлення резазурину використовували для оцінки метаболічної активності тканини за раніше розробленим методом [3]. До лунок планшета з тканиною додавали резазурин («Sigma») у кінцевій концентрації 0,15 мг/мл та інкубували 24 години. Абсорбцію вимірювали на спектрофотометрі «PV 1251C» («Solar», Білорусь) при довжині хвилі 590 нм. Кожен експеримент повторювали на трьох різних культурах, у кожній з яких враховували три проби.

Для морфологічної оцінки культур маток та яєчників проводили гістологічне дослідження зрізів, забарвлених гематоксиліном та еозином, за допомогою мікроскопа «Delta Optical NIB-100» («Delta Optical», Польща) та програмного забезпечення «ToupView V 3.7.» («Hangzhou ToupTek Photonics Co. Ltd, Hangzhou», Китай).

MTT-тест використовували для оцінки метаболічної активності клітин [18]. З цієї метою вносили 10<sup>4</sup> фібробластів у кожну лунку 96-лункового планшета, залишали на 24 години для прикріплення клітин, після чого додавали MTT («Sigma») у кінцевій концентрації 0,5 мг/мл, інкубували 4 години, після чого середовище акуратно відбирали, кристали формазану розчиняли 10%-м розчином додецилсульфату натрію на диметилсульфоксиді. Абсорбцію вимірювали на планшетному спектрофотометрі «SM600» («Utrao», Китай) при довжині хвилі 570 нм. Кожен експеримент повторювали на трьох різних культурах клітин, у кожній з яких враховували вісім проб.

Для оцінки проліферації фібробласти культивували в концентрації  $3 \times 10^5/\text{cm}^2$  та знімали через 2 доби, після чого підраховували кількість клітин.

Для статистичної обробки даних використовували U-критерій Манна-Уїтні та програмне забезпечення «Past V.3.15» (Університет м. Осло, Норвегія).

cell filter (BD Biosciences, USA), the cell sediment was washed, resuspended in DMEM, supplemented with 10% FBS, antibiotic-antimycotic (PPA, Austria). Cells were cultured in flasks with 25 cm<sup>2</sup> surface area (PPA) at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. The medium was changed every 2–3 days, inoculated when a monolayer was formed. The passage 4 cells were used in the experiments.

The resazurin reduction assay was used to assess the metabolic activity of tissue [18]. The resazurin (Sigma) was added to the plate wells with tissue in a final concentration of 0.15 mg/ml and incubated for 24 hrs. The absorption was measured with spectrophotometer PV 1251C (Solar, Belarus) at 590 nm wavelength. Each experiment was repeated in three different cultures, and 3 samples in each were taken into account.

For morphological evaluation of uterine and ovarian cultures, the sections, stained with hematoxylin and eosin were histologically examined with microscope Delta Optical NIB-100 (Delta Optical, Poland) and ToupView V 3.7 software (Hangzhou ToupTek Photonics Co. Ltd, Hangzhou, China).

The metabolic activity of cells was assessed with MTT test [16]. For this purpose, 10<sup>4</sup> of fibroblasts were inserted into each well of a 96-well plate, left for 24 hrs for cell adherence, followed by MTT (Sigma) supplement at a final concentration of 0.5 mg/ml, incubated for 4 hrs, then the medium was carefully collected, and the formazan crystals were dissolved with 10% sodium dodecyl sulfate solution in dimethyl sulfoxide. The absorption was measured with plate spectrophotometer SM600 (Utrao, China) at 570 nm wavelength. Each experiment was repeated in three different cultures, considering 8 samples in each.

To assess proliferation the fibroblasts were cultured at  $3 \times 10^5/\text{cm}^2$  concentration and removed in 2 days, afterwards a number of cells was counted.

The data were statistically processed with the Mann-Whitney U-criterion and Past V.3.15 software (University of Oslo, Norway).

The experiments were carried out in accordance with the Law of Ukraine ‘On Protection of Animals Against Cruelty’ (№ 3447-IV of February 21, 2006), the statements of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986). Experiments were approved by the Bioethics Committee of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine (Protocol № 2 of June 3, 2013).

## Results and discussion

Animal ovaries had a typical structure prior to culture (Fig. 1A). Ovarian hilum consisted of connective tissue with vessels, and their cortical part contained generative elements at different developmental stages,



Експерименти проводили відповідно до Закону України «Про захист тварин від жорсткого поводження» (№ 3447-IV від 21.02.2006), положень «Європейської конвенції з захисту хребетних тварин, які використовуються в експериментальних та інших наукових цілях» (Страсбург, 1986). Експерименти погоджено з комітетом із біоетики Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (протокол № 2 від 3.06.2013).

### Результати та обговорення

Яєчники тварин до культивування мали типову структуру (рис. 1, А). Ворота яєчників склалися зі сполучної тканини з судинами, а їх коркова частина – з генеративних елементів на різних стадіях розвитку: примордіальних, первинних, вторинних, атрофічних фолікулів та жовтих тіл. У фолікулах чітко візуалізувались ооцити, клітини теки та гранульози.

Морфологічне дослідження яєчників після короткочасно культивування в середовищі, некондиційованому похідними плаценти, виявило значні зміни (рис. 1, В). У стромі та воротах яєчників спостерігались явища гіпергідратації та центрального некрозу, розриви тканини. Морфологічно збереженими залишалися жовті тіла та примордіальні фолікули. Зміни зазнавали вторинні та третинні фолікули: яйцеклітини руйнувалися, клітини гранульози віддалялися від теки. Ядра клітин були зменшені, гіперхромні.

Структура яєчників, культивованих у середовищах, кондиційованих ЕП або КЕП, була більш збереженою: розриви в стромі, явища центрального некрозу і гіпергідратації були відсутні (рис. 1, С). Структура фолікулів, жовтих тіл збережена. Клітини теки та гранульози розташовані типово, але частина яйцеклітин у третинних фолікулах була зруйнована. Структура тканини яєчників тварин, культивованих із додаванням середовищ, кондиційованих ККП, була збережена, але із незначною гіпергідратацією, без розривів тканини (рис. 1, D). У фолікулах тека та гранульоза мали типово розташування, частина яйцеклітин не визначалася. Жовті тіла збережені, клітини зі зменшенням та гіперхромією ядер.

Показник метаболічної активності негативного контролю яєчників, девіталізованих етанолом, значуще відрізнявся від позитивного контролю та практично дорівнював такому у середовищі з резазурином. Показники метаболічної активності яєчників, культивованих із середовищами, кондиційованими як свіжовиділеними, так і кріоконсервованими експлантатами плаценти, були значуще нижчі порівнянно з позитивним контролем (рис. 2, А). Аналогічні зміни спостерігалися після культиву-

such as primordial, primary, secondary, atrophic follicles and yellow bodies. The oocytes, theca and granulosa cells were distinctly visualized in the follicles.

Morphological examination of the ovaries after a short-term culture in the medium, not conditioned with placental derivatives, revealed significant changes (Fig. 1B). In ovarian stroma and hilus we observed the phenomena of hyperhydration and central necrosis, as well as tissue ruptures. The yellow bodies and primordial follicles remained morphologically unchanged. The secondary and tertiary follicles underwent changes, *i. e.* the eggs were destroyed, the granulosa cells were removed from the theca. The cell nuclei were reduced and hyperchromic.

The structure of the ovaries, cultured in the media, conditioned with either PEs or CPEs was more preserved, *i. e.* there were no ruptures in stroma, no central necrosis and hyperhydration (Fig. 1C). The structure of follicles, yellow bodies was preserved. The theca and granulosa cells were located typically, but some oocytes in tertiary follicles were destroyed. The structure of animal ovarian tissue, cultured with supplement of the CPCs-conditioned media was preserved, only slight hyperhydration with no tissue ruptures was observed (Fig. 1, D). The theca and granulosa in follicles had a typical location, some oocytes were not determined. There were preserved yellow bodies, and the cells with reduced and hyperchromic nuclei.

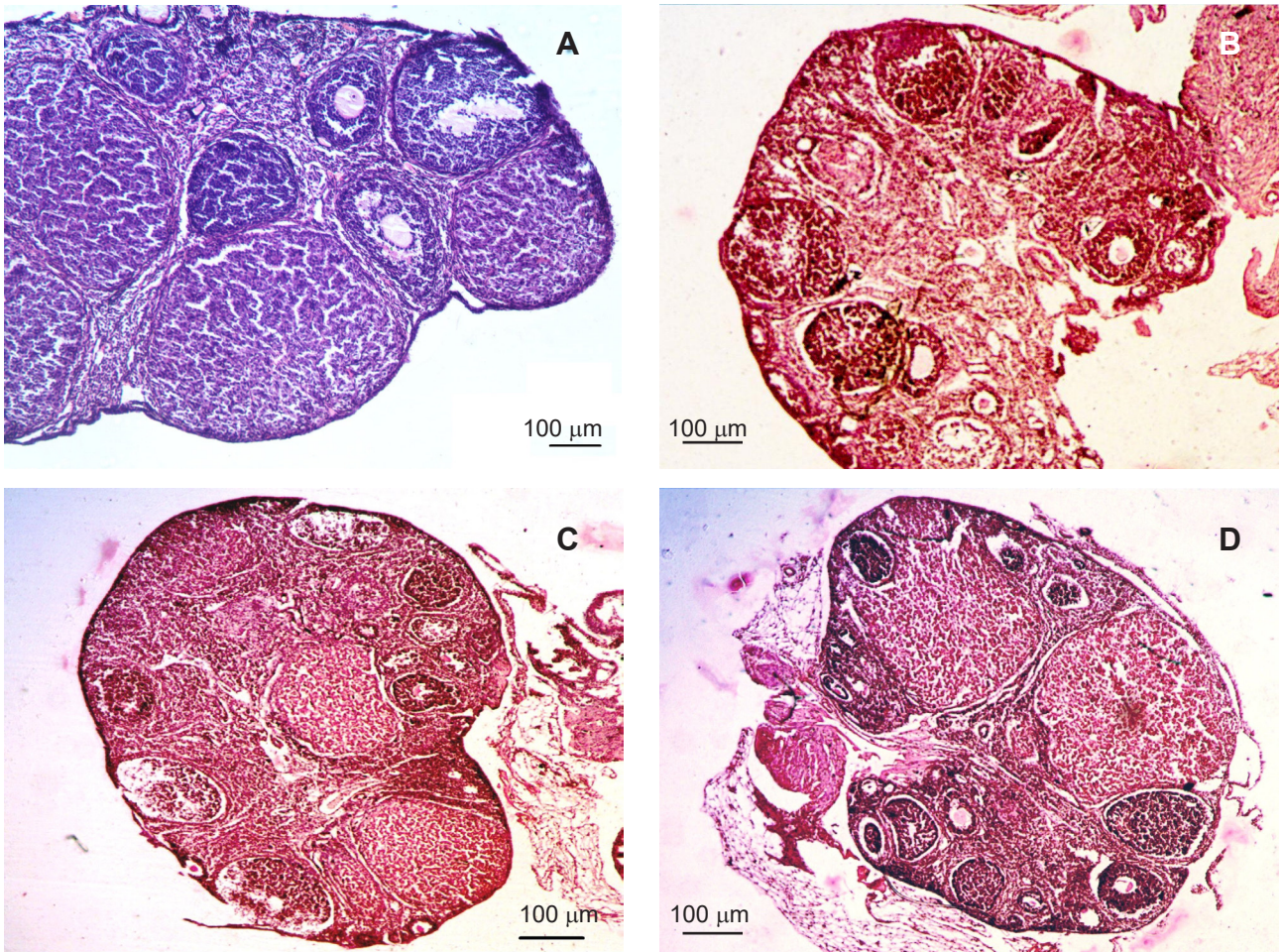
The index of metabolic activity of the ethanol-devitalized negative ovarian control was significantly different from the positive control and virtually the same in the medium with resazurin. The indices of metabolic activity of the ovaries, cultured with the media, conditioned with both freshly isolated and cryopreserved placental explants were significantly lower, as compared with the positive control (Fig. 2A). The same changes were observed after culturing the ovaries with PCs and CPCs-conditioned media, *i. e.* there was a decrease in metabolic activity. The effect of freshly isolated and cryopreserved placental derivatives on the studied ovarian cultures was similar.

The animal uteri had a typical structure after removal from the body (Fig. 3A). The inner layer of endometrium consisted of large cylindrical cells with heterochromic nuclei. A large number of glands was found in endometrium between connective tissue cells. Myometrium was expressed, passed into the serous (outer) layer with blood vessels, elements of adipose tissue.

After a short-term culture of the uterine fragments with no supplement of the placental products-conditioned media, their structure was slightly changed. The transverse dimensions, the ratio of endometrium, myometrium and serous layer were preserved (Fig. 3B). At the same time, there was observed the hyperhydration of all the layers, the intercellular space was







**Рис. 1.** Структура тканини яєчників дослідних тварин: **А** – до культивування; **В** – культивування без додавання кондиційованих середовищ; **С** – культивування з додаванням середовищ, кондиційованих кріоконсервованими експлантами плаценти; **Д** – культивування з додаванням середовищ, кондиційованих кріоконсервованими клітинами плаценти. Масштабні лінійки 100 мкм.

**Fig. 1.** Structure of ovarian tissue of experimental animals: **A** – prior to culture; **B** – culture with no conditioned media supplement; **C** – culture with supplement of the cryopreserved placental explants-conditioned media; **D** – culture with supplement of the cryopreserved placental cells-conditioned media.

вання яєчників із середовищами, кондиційованими КП та ККП – зниження метаболічної активності. Вплив свіжовиділених і кріоконсервованих похідних плаценти на досліджувані культури яєчників був однаковим.

Матки тварин після видалення з організму мали типову структуру (рис. 3, А). Внутрішній шар ендометрію складався з циліндричних великих клітин із гетерохромними ядрами. В ендометрії між клітинами сполучної тканини була виявлена велика кількість залоз. М'язовий шар був вираженим, переходив у серозний (зовнішній) шар з кровоносними судинами, елементами жирової тканини.

Після короткочасного культивування фрагментів матки без додавання середовищ, кондиційованих похідними плаценти, їх структура дещо змінилася. Поперечні розміри матки, співвідношення ендометрію, міометрію та серозного шару були збереженими

saturated with the fluid and lost eosinophilia. The cells became rounded, the cell nuclei were reduced, the hyperchromia was observed. The most changes occurred in an inner layer of endometrium, which was scarcely differentiated separately from the adjacent layers and endometrial glands.

The structure of uterine fragments, cultured with the PEs and CPES-conditioned media was less preserved (Fig. 3C). The tissues of inner uterine layers had no distinct boundary, the hyperhydration of intercellular medium and hyperchromic nuclei were observed. Significant changes were revealed in the structure of endometrium and glands, *i. e.* no distinct contours, the phenomenon of central necrosis with cell shedding. The structure of muscular and serous layers remained preserved.

After culturing the uterine tissue with the media, conditioned with either PCs or CPCs, the general struc-

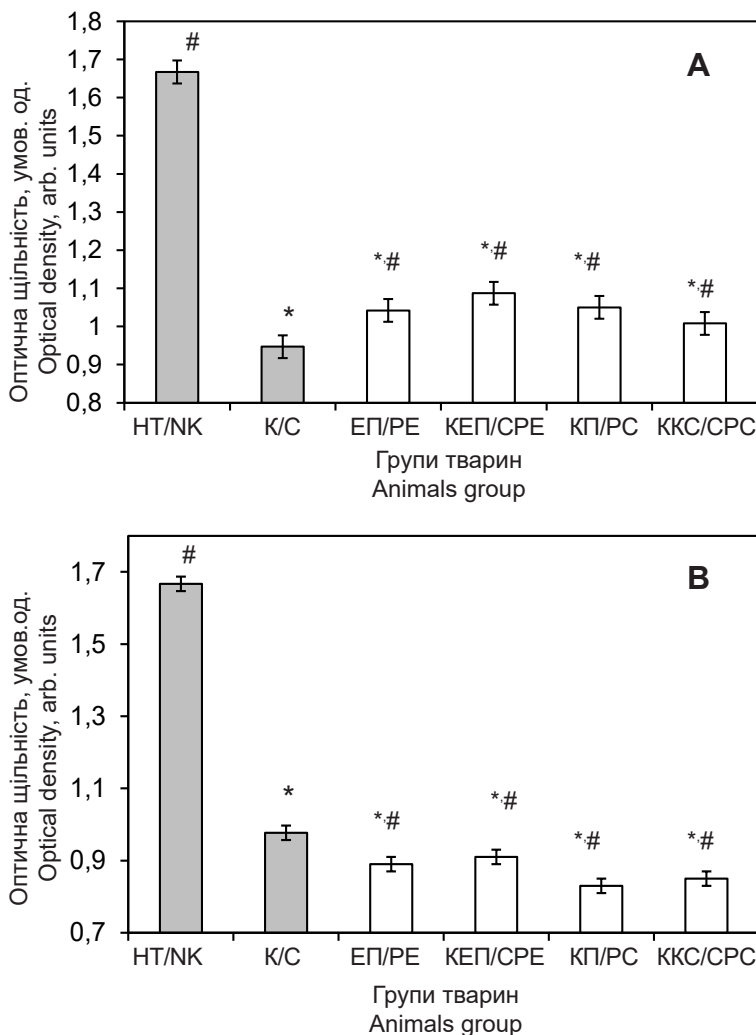
(рис. 3, В). Спостерігалася гіпергідратація всіх шарів, міжклітинний простір насичувався рідиною та втрачав еозинофілію. Клітини набували округлої форми, ядра клітин зменшувалися, спостерігалася гіперхромія. Найбільших змін зазнавав внутрішній шар ендометрію, який практично не диференціювався окремо від прилеглих шарів та залоз ендометрію.

Структура фрагментів маток, культивованих із середовищами, кондиційованими ЕП та КЕП, була менш збереженою (рис. 3, С). Тканини внутрішніх шарів матки не мали чіткої межі, спостерігалася гіпергідратація міжклітинного середовища, гіперхромія ядер. Суттєві зміни виявлялися в структурі ендометрію та залоз: відсутність чітких контурів, явища центрального некрозу зі злуццями клітин. Структура м'язового та серозного шарів залишалася збереженою.

Після культивування тканини матки з середовищами, кондиційованими КП або ККП, зберігалася загальна структура органа, спостерігалася гіпергідратація тканини, явища центрального некрозу, окремі клітини та детрит у просвіті матки, чітке розділення шарів матки було відсутнє (рис. 3, D).

Метаболічна активність негативного контролю органотипових культур маток, девіталізованих етанолом, значуще відрізнялася від такої у позитивному контролі та мало відрізнялася від цього показника у середовищі з додаванням резазурину. Показники тесту відновлення резазурину для культур матки, що культивувалися з середовищами, кондиційованими свіжовиділеними та кріоконсервованими експлантатами плаценти, були значуще вище від контрольного. Результати тесту відновлення резазурину для фрагментів маток, культивованих у середовищах, кондиційованих свіжовиділеними та кріоконсервованими клітинами плаценти, показали значуще більшу метаболічну активність (див. рис. 2, В). Значущої різниці між свіжовиділеними і кріоконсервованими похідними плаценти не виявлено.

Фібробласти миші на нульовому пасажі мали вигляд поліморфних клітини, які формували окремі колонії з активною проліферацією. За 2 доби культивування їх кількість збільшилася з  $3 \times 10^4$  до  $8 \times 10^4$  на  $1 \text{ см}^3$  культурального посуду, вони мали типову форму.



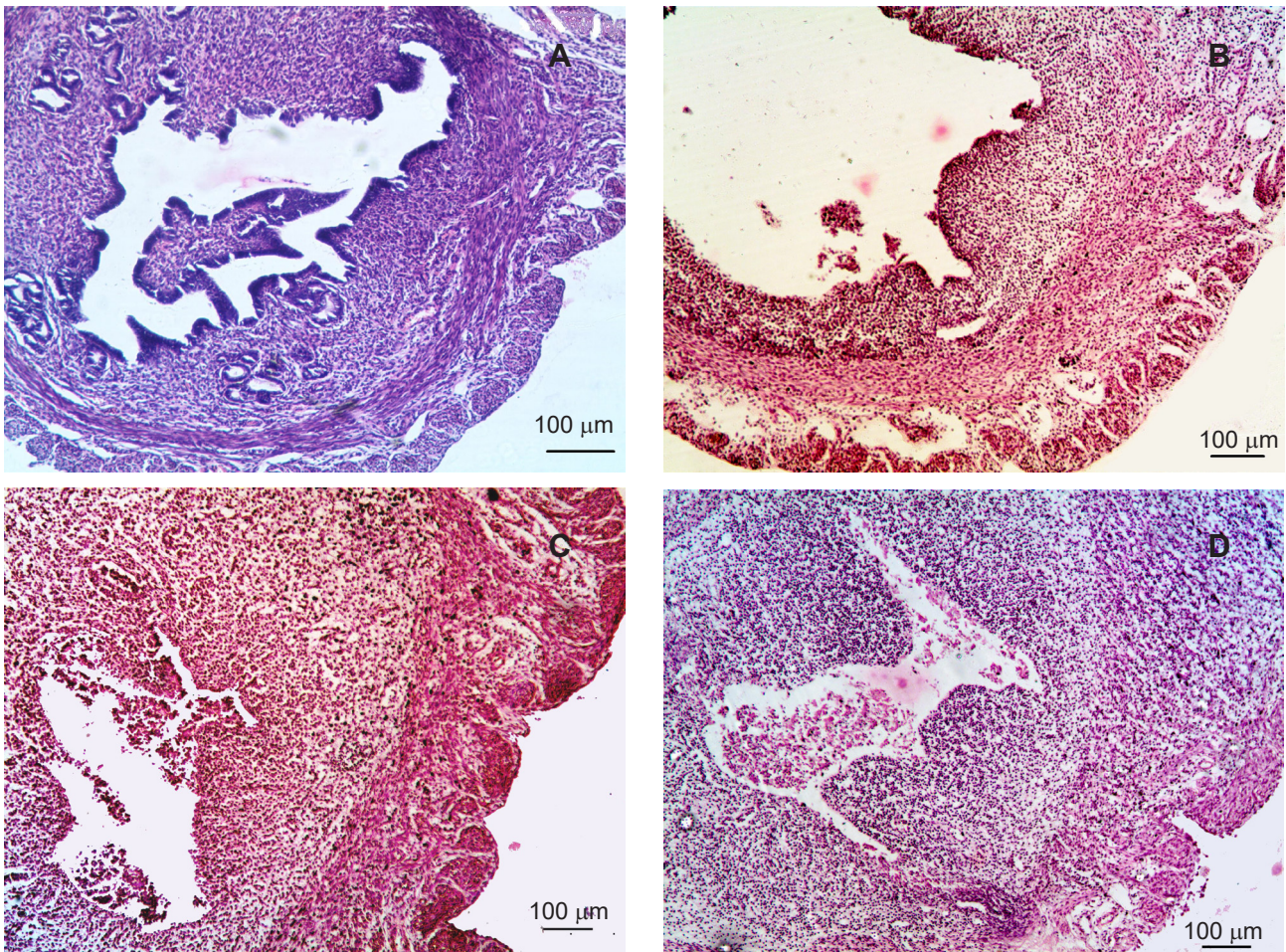
**Рис. 2.** Показники метаболічної активності органотипової культури яєчників (А) та маток (В) мишей за даними тесту відновлення резазурину: НК – негативний контроль; К – позитивний контроль; ЕП – культивування з середовищами, кондиційованими нативними експлантатами плаценти; КЕП – культивування з середовищами, кондиційованими кріоконсервованими експлантатами плаценти; КП – культивування з середовищами, кондиційованими нативними клітинами плаценти; ККП – культивування з середовищами, кондиційованими кріоконсервованими клітинами плаценти. \* – значущість різниці порівнянно з негативним контролем,  $p < 0,05$ ; # – значущість різниці порівнянно з позитивним контролем  $p < 0,05$ .

**Fig. 2.** Indices of metabolic activity of organotypic culture of murine ovaries (A) and uteri (B) according to the resazurin reduction assay data: NC – negative control; C – positive control; PE – culture with the fresh placental explants-conditioned media; CEP – culture with the cryopreserved placental explants-conditioned media; PC – culture with the fresh placental cells-conditioned media; CPC – culture with the cryopreserved placental cells-conditioned media. \* – the significance of difference as compared to the negative control,  $p < 0.05$ ; \*\* – the significance of difference as compared to the positive control,  $p < 0.05$ .

ture of the organ was kept, the tissue hyperhydration, central necrosis, single cells and detritus in uterine lumen were observed, there was no distinct separation of uterine layers (Fig. 3D).

The metabolic activity in the negative control of organotypic cultures of ethanol-devitalized uteri was





**Рис. 3.** Структура маток дослідних тварин: **A** – до культивування; **B** – культивування без додавання кондиційованих середовищ; **C** – культивування з додаванням середовищ, кондиційованих ККП; **D** – культивування з додаванням середовищ, кондиційованих ККП. Масштабні лінійки 100 мкм.

**Fig. 3.** Uterine structure of experimental animals: **A** – prior to culture; **B** – culture with no conditioned media supplement; **C** – culture with CPEs-conditioned media supplement; **D** – culture with CPCs-conditioned media supplement.

Під час дослідження впливу середовищ, кондиційованих свіжовиділеними та кріоконсервованими похідними плаценти, на культуру фібробластів миші встановлено, що середовища, кондиційовані КП, ККП, ЕП, КЕП, не впливали на показники МТТ-тесту (рис. 4, А). Крім того, середовища, кондиційовані свіжовиділеними і кріоконсервованими клітинами або експлантатами плаценти, не впливали на проліферативну активність фібробластів (рис. 4, В).

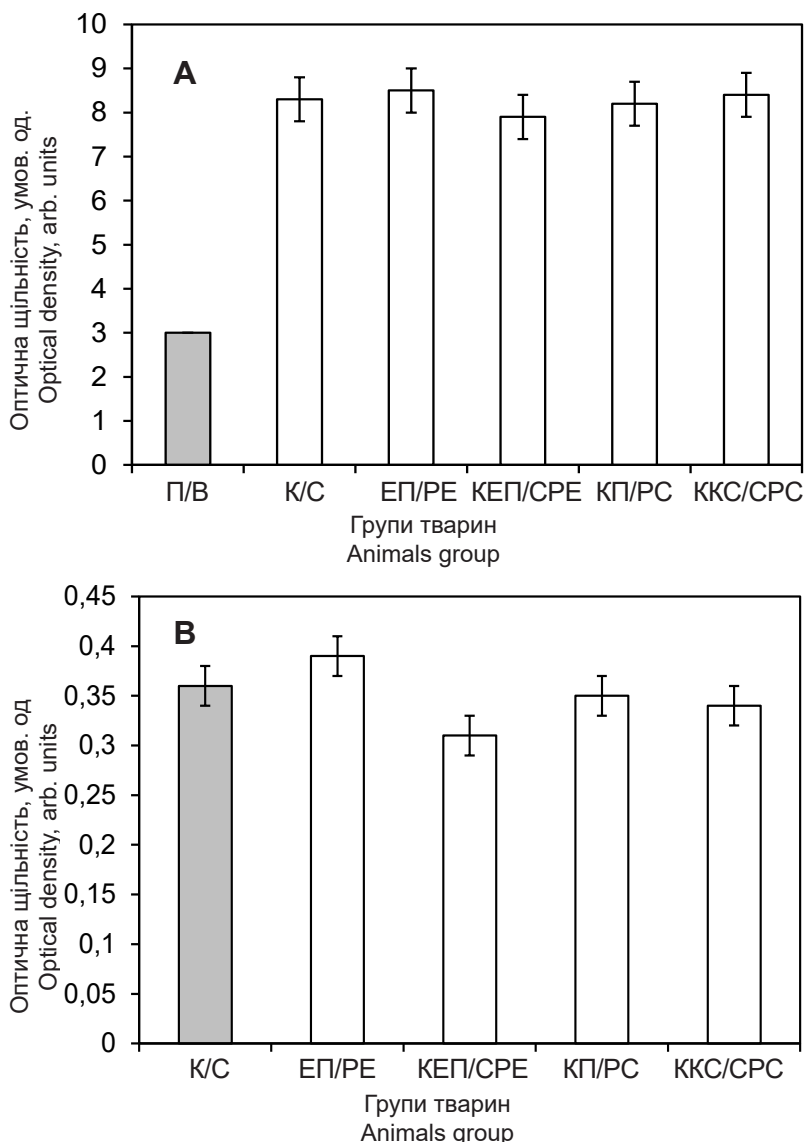
Після культивування яєчників та фрагментів маток без додавання кондиційованих середовищ спостерігалися типові для органотипових культур зміни, які можна пояснити відсутністю судинної перфузії. Центральний некроз, характерний для органотипового культивування [4], є результатом недостатньої концентрації кисню та компонентів середовища потребам біооб'єкта, що культивується. Застосований тест відновлення резаурину відображає метаболічну активність і, в першу чергу,

significantly different from that in positive control, being slightly different from this index in the resazurin-supplemented media. The resazurin reduction assay indices for the uterine cultures, cultivated with the media, conditioned with fresh or cryopreserved placental explants were significantly higher than the control. The results of the resazurin reduction assay for uterine fragments, cultured in the media, conditioned with both fresh and cryopreserved placental cells showed a significantly higher metabolic activity (see Fig. 2B). No significant difference between fresh and cryopreserved placental products was revealed.

The passage zero murine fibroblasts looked like polymorphic cells, which formed single colonies and actively proliferated. Within 2 days of cultivation their number increased from  $3 \times 10^4$  to  $8 \times 10^4$  per  $1 \text{ cm}^3$  of culture dishes, they acquired a typical morphology.

Studying the effect of the media, conditioned with both freshly isolated and cryopreserved placental derivatives on the murine fibroblast culture showed





**Рис. 4.** Показники активності фібробластів після культивування з середовищами, кондиційованими похідними плаценти: **А** – кількість клітин через 2 доби культивування; **В** – МТТ-тест; П – початкова кількість внесених клітин; К – контроль (культура, некондиційована похідними плаценти); КП, ККП, ЕП, КЕП – середовища, кондиційовані похідними плаценти.

**Fig. 4.** Indices of fibroblast activity after culture with the placental derivatives-conditioned media: **A** – cell number in 2 days of culture; **B** – MTT-test; I – initial number of introduced cells; C – control (the culture, not-conditioned with placental derivatives); PCs, CPCs, PEs, CPEs – placental derivatives-conditioned media.

інтенсивність енергетичних процесів клітинного дихання в мітохондріях [25].

Вплив середовищ, кондиційованих похідними плаценти, на метаболічну активність органотипових культур яєчників був пригнічуючим, а на метаболічну активність культур матки – стимулюючим. Подібні різноспрямовані реакції спостерігаються під час вагітності [8]. Так, функція яєчників під час вагітності пригнічена, фолікулогенез відсутній, всю гормональну функцію здійснює

that the media, conditioned with PCs, CPCs, PEs, CPEs were not affecting the MTT test indices (Fig. 4A). In addition, the media, conditioned with fresh and cryopreserved placental cells or explants had no effect on proliferative activity of fibroblasts (Fig. 4B).

After culturing the ovaries and uterine fragments with non-conditioned media, there were observed the changes typical for organotypic cultures, which could be explained by the absence of vascular perfusion. The central necrosis, specific to organotypic cultivation [1] resulted from the inadequacy between oxygen concentrations and medium components to the needs of cultured bioobject. The applied resazurin reduction assay reflects a metabolic activity and, first of all, the intensity of energy processes of cell respiration in mitochondria [26].

The effect of the placental products-conditioned media on metabolic activity of organotypic ovarian cultures was suppressive, and *vice versa* it was stimulating the metabolic activity of uterine cultures. The similar multi-directed responses are observed during pregnancy [5]. For example, the ovarian function during pregnancy is suppressed, there is no folliculogenesis, all the hormonal function is accomplished by placenta. In contrast to these processes one observes endometrial hyperplasia in uterus, the increase in size, enhanced blood circulation. These changes are explained by the action of humoral factors, produced by placental structures [15], primarily by chorionic gonadotrophin, which manifests the similar features in minimal concentrations and is produced by placental explant and cell cultures [5, 21]. The versatile action of placental products

on uterus and ovaries was also demonstrated in the *in vivo* experiments. The suppressed folliculogenesis, delayed pregnancy onset and uterine hyperplasia were observed after implanting a placental explants to animals [17]. There have been proved the reduction of aromatase activity of ovaries [2] and prolongation of yellow body existence under the effect of placental factors [6], which might be explained by the action of nonsteroidal thermolabil factors, inhibition of apoptosis and might be interpreted as a direct



плацента. В матці, навпаки, спостерігається гіперплазія ендометрію, збільшення її розміру, посилення кровообігу. Такі зміни пояснюються дією гуморальних факторів, які продукуються структурами плаценти [17], в першу чергу – хоріонічного гонадотропіну, який в мінімальних концентраціях проявляє подібні властивості та продукується культурами експлантів і клітин плаценти [8, 22]. Різностям дія похідних плаценти на матки та яєчники продемонстрована також у експериментах *in vivo*. Після імплантації експлантів плаценти тваринам спостерігаються пригнічення фолікулогенезу, затримка виникнення вагітності та гіперплазія матки [19]. Доведено зниження ароматазної активності яєчників [5] та подовження існування жовтих тіл під впливом плацентарних факторів [9], що пояснюється дією нестероїдних термолабільних факторів, інгібуванням апоптозу і може трактуватися як безпосередній вплив гуморальних плацентарних факторів на яєчники та матку без участі регуляторних систем.

Відсутність впливу середовищ, кондиційованих похідними плаценти, на метаболічну активність фібробластів може пояснюватися тим, що вони не є специфічною мішенню для біологічно активних речовин плацентарного походження. Дані літератури щодо впливу плацентарних факторів на фібробласти досить суперечливі: з одного боку, описані явища стимуляції проліферації фібробластів шкіри екстрактом плаценти [7], а з іншого – попередження фіброзу при застосуванні амніотичної мембрани [20]. Під час вагітності не спостерігається підвищена проліферація сполучної тканини [1]. Відсутність впливу середовищ, кондиційованих свіжовиділеними та кріоконсервованими клітинами плаценти на фібробласти, є доказом їх безпосередньої дії на генеративні елементи яєчника та ендометрій без залучення елементів сполучної тканини.

Отримані дані свідчать про те, що середовища, кондиційовані похідними плаценти, по-різному впливають на метаболічну активність та структуру органотипових культур маток та яєчників, і цей вплив обумовлений гуморальними факторами, які продукуються в середовище клітинами та експлантами плаценти.

Перспективою наших подальших досліджень є з'ясування механізмів впливу похідних плаценти на органи жіночої репродуктивної системи для їх можливого застосування в лікуванні гінекологічних захворювань.

## Висновки

Середовища, кондиційовані клітинами та експлантами плаценти, підвищують метаболічну актив-

effect of humoral placental factors on ovaries and uterus without regulatory system participation.

Absence of effect of the placental products-conditioned media on metabolic activity of fibroblasts may be explained by the fact that they are not a specific target for biologically active substances of placental origin. The reported data about the influence of placental factors on fibroblasts are quite controversial, *i. e.* on the one hand, they describe the phenomena of proliferation stimulation of skin fibroblasts by placental extract [4], and on the other hand they prevent fibrosis during amniotic membrane application [19]. During pregnancy, no increased proliferation of connective tissue is observed [24]. No effect of the media, conditioned with freshly and cryopreserved placenta cells on fibroblasts, is the evidence of their direct effect on ovarian and endometrial generative elements with no involvement of connective tissue elements.

These own findings testify to the fact that the placental derivatives-conditioned media differently affect the metabolic activity and structure of uterine and ovarian organotypic cultures and this effect is stipulated by humoral factors, produced by placental cells and explants in the medium.

The prospect of future research is to elucidate the effect mechanisms of placental derivatives on female reproductive system organs for their possible application in therapy of gynecological diseases.

## Conclusions

The placental cells- and explants-conditioned media increase the metabolic activity of organotypic cultures of uterus, suppress it in ovarian cultures and cause no effect on metabolic activity of fibroblasts.

After culturing in the placental cells and explants-conditioned media the ischemic damages in the structure of uterine organotypic cultures are in progress, but those in ovarian organotypic cultures are reduced.

No significant differences in the effect of the media, conditioned with fresh and cryopreserved placental products on the studied cultures was revealed.

## References

1. Abdi S., Salehnia M., Hosseinkhani S. Steroid production and follicular development of neonatal mouse ovary during in vitro culture. *Int J Fertil Steril* 2013; 7(3): 181–186.
2. al-Gubory K.H., Machelon V., Nomé F. Evidence that a non-steroidal factor from ovine placenta inhibits aromatase activity of granulosa cells in vitro. *C R Acad Sci III* 1995; 318(1): 91–98.
3. Caplan A.I. Adult mesenchymal stem cells and women's health. *Menopause* 2015; 22(2): 131–135.
4. Cho H.R., Ryou J.H., Lee J.W., Lee M.H. The effects of placental extract on fibroblast proliferation. *J Cosmet Sci* 2008; 59(3): 195–202.
5. Cole L.A. Biological functions of hCG and hCG-related molecules. *Reprod Biol Endocrinol* 2010; 8: 102. Available online URL: <https://>





ність органотипових культур матки, пригнічують її в культурах яєчниках та не впливають на метаболічну активність фібробластів.

Після культивування в середовищах, кондиційованих клітинами та експлантами плаценти, ішемічні пошкодження структури органотипових культур матки прогресують, а органотипових культур яєчників зменшуються.

Значущих відмінностей щодо впливу середовищ, кондиційованих свіжовиділеними та кріоконсервованими похідними плаценти, на досліджені культури не виявлено.

## Література

1. Зильбер А.П. Шифман Е.М. Этюды критической медицины. Акушерство глазами анестезиолога. Т. 3. Петрозаводск: Изд-во ПГУ. 1997.
2. Насадюк К. М. Клеточные технологии в репродуктологии, акушерстве и гинекологии. Клітинна та органна трансплантологія 2013; 1(1): 56–60.
3. Прокопюк В.Ю., Прокопюк О.С., Мусатова И.Б. и др. Оценка сохранности эксплантов плаценты, пуповины и плодных оболочек после кріоконсервирования. Клітинна та органна трансплантологія 2015; 3(1): 34–38.
4. Abdi S., Salehnia M., Hosseinkhani S. Steroid production and follicular development of neonatal mouse ovary during in vitro culture. Int J Fertil Steril 2013; 7(3):181–186.
5. al-Gubory K.H., Machelon V., Nomé F. Evidence that a non-steroidal factor from ovine placenta inhibits aromatase activity of granulosa cells in vitro. C R Acad Sci III 1995;318(1): 91–98.
6. Caplan A.I. Adult Mesenchymal Stem Cells and Women's Health. Menopause 2015;22( 2): 131–135.
7. Cho H.R., Ryou J.H., Lee J.W. et al. The effects of placental extract on fibroblast proliferation. J Cosmet Sci 2008; 59(3): 195–202.
8. Cole L.A. Biological functions of hCG and hCG-related molecules. Reprod Biol Endocrinol 2010; 8: 102.
9. Dharmarajan A.M., Goodman S.B., Atiya N. et al. Role of apoptosis in functional luteolysis in the pregnant rabbit corpus luteum: evidence of a role for placental-derived factors in promoting luteal cell survival. Apoptosis 2004; 9 (6): 807–814.
10. Giwa S., Lewis J.K., Alvarez L. et al. The promise of organ and tissue preservation to transform medicine. Nat Biotechnol 2017; 35(6): 530–542.
11. Goltsev A.N., Grischenko V.I., Sirous M.A. et al. Cryopreservation: an optimizing factor for therapeutic potential of fetoplacental complex products. Biopreserv Biobank 2009; 7(1): 29–38.
12. Holesh J.E., Lord M. Physiology, Ovulation. Stat Pearls. Treasure Island (FL): Stat Pearls Publishing; 2017 [Electron resource]? Available from: URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441996/> (cited 03.04.2018)
13. Luan X., Diekwisch T.G. CP27 affects viability, proliferation, attachment and gene expression in embryonic fibroblasts. Cell Prolif 2002; 35(4): 207–219.
14. Mattar P., Bieback K. Comparing the immunomodulatory properties of bone marrow, adipose tissue, and birth-associated tissue mesenchymal stromal cells Frontiers in Immunology 2015; 6(6): 1–8560.
15. Pipino C., Shangaris P., Resca E. et al. Placenta as a reservoir of stem cells: an underutilized resource? Br Med Bull 2013;105: 43–68.
16. www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2936313/ (cited 23.05.2018).
6. Dharmarajan A.M., Goodman S.B., Atiya N. et al. Role of apoptosis in functional luteolysis in the pregnant rabbit corpus luteum: evidence of a role for placental-derived factors in promoting luteal cell survival. Apoptosis 2004; 9 (6): 807–814.
7. Giwa S., Lewis J.K., Alvarez L. et al. The promise of organ and tissue preservation to transform medicine. Nat Biotechnol 2017; 35(6): 530–542.
8. Goltsev A.N., Grischenko V.I., Sirous M.A. et al. Cryopreservation: an optimizing factor for therapeutic potential of fetoplacental complex products. Biopreserv Biobank 2009; 7(1): 29–38.
9. Holesh J.E., Lord M. Physiology, ovulation. Stat Pearls. Treasure Island (FL): Stat Pearls Publishing; 2017 [Electron resource] Available from: URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK441996/> [cited 2018 March 04].
10. Luan X., Diekwisch T.G. CP27 affects viability, proliferation, attachment and gene expression in embryonic fibroblasts. Cell Prolif 2002; 35(4): 207–219.
11. Mattar P., Bieback K. Comparing the immunomodulatory properties of bone marrow, adipose tissue, and birth-associated tissue mesenchymal stromal cells Frontiers in Immunology 2015; 6(6): 1–8560. Available online URL: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2015.00560/full> (cited 23.05.2018).
12. Nasadyuk C. M. Cell technologies in reproductology, obstetrics and gynecology. Cell and Organ Transplantation 2013; 1(1): 61–65.
13. Pipino C., Shangaris P., Resca E. et al. Placenta as a reservoir of stem cells: an underutilized resource? Br Med Bull 2013; 105: 43–68.
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 Research & Therapy 2017; 8: 66. Available online URL: <https://stemcellres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13287-017-0512-7> (cited 23.05.2018).
15. Pogozhykh O., Prokopyuk V., Figueiredo C., Pogozhykh D. Placenta and placental derivatives in regenerative therapies: experimental studies, history, and prospects. Stem Cells Int 2018 18; 2018:4837930. Available online URL: <https://www.hindawi.com/journals/sci/2018/4837930/>(cited 23.05.2018).
16. Prokopyuk V. Yu., Chub O. V., Shevchenko M. V. et al. Placental stem cells, organotypic culture and human placenta extract have neuroprotective activity. Cell and Organ Transplantation 2017; 5(1): 39–42.
17. Prokopyuk V. Yu., Grischenko O. V., Prokopyuk O. V. et al. Effect of cryopreserved placental explants on female reproductive system under normal and pathological conditions (experimental study). Probl Cryobiol Cryomed 2017; 28 (3): 250–265.
18. 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.
19. Ricci E., Vanosi G., Lindenmair A. et al. Anti-fibrotic effects of fresh and cryopreserved human amniotic membrane in a rat liver fibrosis model. Cell Tissue Bank 2013; 14 (3): 75–88.
20. Schenke-Layland K., Brucker S.Y. Prospects for regenerative medicine approaches in women's health. J Anat 2015; 227(6): 781–785.
21. Schevchenko N.O., Somova K.V., Volina V.V. et al. Dynamics of activity and duration of functioning of cryopreserved cryo-extract, placental cells and fragments in the organism of experimental animals. Morphologia 2016; 10(2): 93–98.
22. Silini A.R., Cargnoni A., Magatti M. et al. The long path of human placenta, and its derivatives, in regenerative medicine. Front Bioeng Biotechnol 2015; 3: 162. Available online URL: <https://>



16. Pogozykh D., Pogozykh 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; 8: 66.
17. Pogozykh O., Prokopyuk V., Figueiredo C. et al. Placenta and placental derivatives in regenerative therapies: experimental studies, history, and prospects. *Stem Cells Int* 2018 18; 2018: 4837930.
18. Prokopyuk V. Yu., Chub O. V., Shevchenko M. V. et al. Placental stem cells, organotypic culture and human placenta extract have neuroprotective activity. *Cell and Organ Transplantation* 2017; 5(1): 39–42.
19. Prokopyuk V. Yu., Grischenko O. V., Prokopyuk O. V. et al. Effect of cryopreserved placental explants on female reproductive system under normal and pathological conditions (experimental study). *Probl Cryobiol Cryomed* 2017; 28 (3): 250–265.
20. Ricci E., Vanosi G., Lindenmair A. et al. Anti-fibrotic effects of fresh and cryopreserved human amniotic membrane in a rat liver fibrosis model. *Cell Tissue Bank* 2013; 14 (3): 75–88.
21. Schenke-Layland K., Brucker S. Y. Prospects for regenerative medicine approaches in women's health. *J. Anat.* 2015; 227 (6): 781–785.
22. Shevchenko 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.
23. Silini A. R., Cargnoni A., Magatti M. et al. The long path of human placenta, and its derivatives, in regenerative medicine. *Front Bioeng Biotechnol* 2015; 3: 162.
24. Yasuda Y., Masuda S., Chikuma M. et al. Estrogen-dependent production of erythropoietin in uterus and its implication in uterine angiogenesis. *J Biol Chem* 1998; 273(39): 25381–25387.
25. Zhang H. X., Du G. H., Zhang J. T. Assay of mitochondrial functions by resazurin in vitro. *Acta Pharmacol Sin* 2004; 25(3): 385–389.
- www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2015.00162/full (cited 23.05.2018).
23. Yasuda Y., Masuda S., Chikuma M. et al. Estrogen-dependent production of erythropoietin in uterus and its implication in uterine angiogenesis. *J Biol Chem* 1998; 273(39): 25381–25387.
24. Zilber A. P., Shifman E. M. *Etudes of critical medicine. Obstetrics with the point of view of an anesthesiologist. V. 3.* Petrozavodsk: Publishing House of the PGU; 1997.
25. Zhang H. X., Du G. H., Zhang J. T. Assay of mitochondrial functions by resazurin in vitro. *Acta Pharmacol Sin* 2004; 25(3): 385–389.

