

УДК 615.065:[612.681+615.361/611.013.85]

В.Ю. Прокопюк^{1,2}, М.В. Шевченко^{1*}, А.І. Каверінська¹,
Т.В. Михальчук¹, О.С. Прокопюк¹

Кріоконсервовані похідні плаценти збільшують виживаність мишей з циклофосфамід-індукованою оваріальною недостатністю

UDC 615.065:[612.681+615.361/611.013.85]

V.Yu. Prokopiuk^{1,2}, M.V. Shevchenko^{1*}, A.I. Kaverinska¹,
T.V. Mykhalchuk¹, O.S. Prokopiuk¹

Cryopreserved Placental Derivatives Increase Survival of Mice With Cyclophosphamide-Induced Ovarian Failure

Ключові слова: циклофосфамід-індукована оваріальна недостатність, кріоконсервовані клітини, екстракт, фрагменти плаценти, тривалість життя.

Key words: cyclophosphamide-induced ovarian failure, cryopreserved cells, extract, placental fragments, lifespan.

Тривалість та якість життя жінки значною мірою залежить від її репродуктивного періоду та рівня продукції статевих гормонів [4, 5], на які суттєвий вплив має передчасне згасання функції яєчників, у тому числі внаслідок онкологічних захворювань та їх терапії [2, 5]. Ефективним методом для відновлення функції яєчників після хімотерапії є застосування стовбурових клітин різного походження [1, 2, 8]. Похідні плаценти, що містять характерні для стовбурових клітин фактори, ряд біологічно активних речовин і сполук, можуть бути потенційно ефективними у подоланні наслідків хімотерапії. На даний час загальноприйнятою тваринною моделлю передчасної оваріальної недостатності (ОН) після хімотерапії є використання комбінації циклофосфаміду та бусульфану. Така модель дозволяє у короткі терміни формувати ознаки ОН, які відповідають клінічному діагнозу, при цьому викликає меншу кількість побічних ефектів та демонструє високу результативність і стабільність [7, 8, 10]. У попередніх роботах нами була показана ефективність різних видів тканинної терапії на моделі циклофосфамід-індукованої оваріальної недостатності (МЦІОН), а також збільшення під впливом кріоконсервованих похідних

Women's life expectancy and its quality largely depend on the duration of reproductive period and the sex hormones production [4, 5], significantly affected by premature ovarian failure, as well as resulted from oncology diseases and their therapy [2, 5]. An effective method for restoring ovarian function after chemotherapy is the use of stem cells of various origins [1, 2, 8]. Placental derivatives containing both stem cell-specific factors and a number of biologically active substances as well as compounds can be potentially effective in overcoming the chemotherapy effects. Currently, the generally accepted animal model of premature ovarian failure (OF) after chemotherapy uses a combination of cyclophosphamide and busulfan. This model allows the most rapid formation of OF signs, corresponding to the clinical diagnosis, but with fewer side effects, and demonstrates high efficiency and stability [7, 8, 10]. Our previous studies have shown the effectiveness of various types of tissue therapy in the model of cyclophosphamide-induced ovarian failure (MCIOF), as well as an increased lifespan of male mice and the duration of reproductive period of females under the influence of cryopreserved placental derivatives [4, 5]. This suggests that the use of placental deriva-

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

² Харківській національний медичний університет, м. Харків, Україна

*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:

вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61016;
тел.: (+38 057) 373-74-35, факс: (+38 057) 373-59-52
електронна пошта: mariia_shevchenko1981@ukr.net

Надійшла 22.11.2022

Прийнята до друку 27.02.2023

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

² Kharkiv National Medical University, Kharkiv, Ukraine

*To whom correspondence should be addressed:

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

Received 22, November, 2022

Accepted 27, February, 2023

плаценти тривалості життя самців мишей та репродуктивного періоду самиць [4, 5]. Це дозволяє припустити, що застосування похідних плаценти сприятиме подовженню життя самиць мишей після змодельованої циклофосфамід-індукованої ОН.

Мета нашої роботи — визначення впливу кріоконсервованих клітин, екстракту та експлантів плаценти людини на тривалість життя самиць мишей в моделі циклофосфамід-індукованої оваріальної недостатності.

Експерименти проводили з дотриманням вимог комітету з біоетики Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (протокол № 1 від 26.02.2019), узгоджених із положенням «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються в експериментальних та інших наукових цілях» (Страсбург, 1986) і положеннями Гельсінської декларації, прийнятої Генеральною асамблеєю Всесвітньої медичної асоціації.

У роботі було використано 125 самиць мишей лінії BALB/c віком 5 місяців масою ($19,5 \pm 1,0$) г, яких розділили на групи: 1 — контрольну (інтактні тварини); 2 — МЦІОН; 3 — МЦІОН після введення кріоконсервованого екстракту плаценти (КЕП); 4 — МЦІОН після введення кріоконсервованих фрагментів плаценти (КФП); 5 — МЦІОН після введення кріоконсервованих клітин плаценти (ККП).

Циклофосфамід-індуковану ОН моделювали за раніше описаним методом шляхом інтраперитонеального введення 200 мг/кг циклофосфаміду (Сандоз, Австрія) та 20 мг/кг бусульфану (Аккорд Хелсека Полска Сп. з о. о., Польща) [7, 8]. Оваріальну недостатність у самиць мишей підтверджували за наявністю атрофії яєчників і маток та відсутністю естрального циклу й естрогенної насиченості організму. Плаценти отримували після операції кесарів розтин з інформованої згоди жінок. Похідні плаценти отримували, кріоконсервовували, дозували та вводили за раніше описаними методами. Через два тижні після підтвердження ОН застосовували КЕП у розрахунку 10 мкл на тварину, КФП — 10 мг на тварину, ККП — у розрахунку 100 000 клітин на тварину інтраперитонеально [4–6].

Для статистичної обробки даних порівнювали криві виживаності Каплана-Майєра з використанням Log-rank (Mantel-Cox) тесту, розраховували середню тривалість життя, медіану, максимальну виживаність та виживаність 90%. Аналіз даних проводили з застосуванням програмного забезпечення Past V.3.15 (University of

tives will increase the lifespan of female mice after simulated cyclophosphamide-induced OF.

Thus, the aim of our work was to determine the effect of cryopreserved cells, extract and explants of human placenta on the lifespan of female mice in a model of cyclophosphamide-induced ovarian failure.

The experiments were carried out in compliance with the requirements of the Bioethics Committee of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the NAS of Ukraine (protocol № 1 of February 26, 2019), consistent with the provisions of the ‘European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes’ (Strasbourg, 1986) and the provisions of Declaration of Helsinki adopted by the General Assembly of the World Medical Association.

We used 125 BALB/c female mice at the age of 5 months, weighing (19.5 ± 1.0) g, divided into groups: 1 – control (intact animals); 2 – MCIOF; 3 – MCIOF after administration of cryopreserved placental extract (CPE); 4 – MCIOF after administration of cryopreserved placental fragments (CPF); 5 – MCIOF after administration of cryopreserved placental cells (CPC).

Cyclophosphamide-induced OF was simulated according to the previously described method by intraperitoneal administration of 200 mg/kg cyclophosphamide (Sandoz, Austria) and 20 mg/kg busulfan (Accord Healthcare Polska Sp. z o. o., Poland) [7, 8]. Ovarian insufficiency in female mice was confirmed by the presence of atrophic ovaries/uterus, and the absence of the estrous cycle and estrogen saturation of the body. Placentas were obtained after caesarean section with the informed consent of the women. Placental derivatives were isolated, cryopreserved, dosed and administered according to previously described methods. Two weeks after the confirmation of OF, the CPE was used at the rate of 10 μ l per animal, CPF – 10 mg per animal, CPC – at the rate of 100,000 cells per animal intraperitoneally [4–6].

For statistical data processing, Kaplan-Meier survival curves were compared using the Log-rank (Mantel-Cox) test, the average lifespan, median, maximum and 90% survival were calculated. Data analysis was performed using the Past V.3.15 software (University of Oslo, Norway), the critical significance level was taken at $p \leq 0.05$.

An analysis of the survival curve of animals in the control group showed that it had a shape typical for females and represented the characteristics of sex: a low mortality rate in female mice under



Oslo, Норвегія), критичний рівень значущості приймали при значенні $p \leq 0,05$.

Аналіз кривої виживаності тварин контрольної групи показав, що вона має форму, яка є типовою для самиць та відображує характеристики статі: низький показник частоти смертності у самиць мишей віком до 18–20-ти місяців, який відповідає активному репродуктивному періоду, коли має місце захисний ефект естрогенів; різке збільшення частоти їхньої смертності після 16–18-місячного віку, коли відбувається згасання функції яєчників та зниження синтезу стероїдних статевих гормонів (рисунок) [9]. Середня тривалість життя тварин складала ($21,16 \pm 0,05$) місяців, медіана виживаності — 21,80%, виживаність — 18 місяців, максимальна виживаність — 30 місяців.

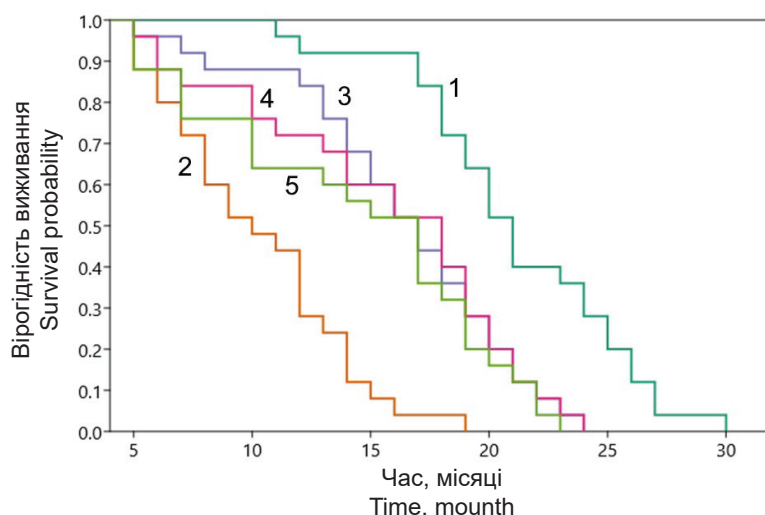
У тварин групи 2 спостерігали різке збільшення частоти смертності протягом перших місяців після введення хіміопрепаратів, після чого відбувалася стабілізація даного показника (рисунок). Це може бути пов'язане з гострою токсичністю застосованих препаратів — пошкоджуюча дія на організм тварин була найбільш вираженою одразу після введення. Загальний стан тварин, які, незважаючи на наявність токсичних проявів, переживали цей період, відновлювався до вихідного, у подальшому ймовірність їх виживання підвищувалася. Порівняння кривих виживання Каплана-Майєра за Log-rank тестом показало значущу відмінність між собою. Середня тривалість життя тварин складала ($10,2 \pm 0,09$) місяців, медіана виживаності — 10,8%, виживаність — 6 місяців, максимальна виживаність — 19 місяців.

У тварин групи 3 крива Каплана-Майєра значуще відрізнялася від кривих тварин груп 1 і 2 (рисунок), відмічалось різке зменшення частоти смертності. Середня тривалість життя тварин складала ($16,8 \pm 0,06$) місяців, медіана виживаності — 17,8%, виживаність — 14 місяців, максимальна виживаність — 24 місяці. У тварин групи 4 крива Каплана-Майєра значуще відрізнялася від кривих тварин груп 1 і 2 та не мала відмінностей з кривими тварин груп 3 і 5. Було відмічено певне зниження частоти смертності самиць мишей після застосування КФП, проте менш виражене порівняно з застосуванням КЕП. Даний вплив можна пояснити більш швидким засвоєнням

the age of 18–20 months, which corresponded to an active reproductive period when the protective effect of estrogen took place; a sharp increase in the frequency of their mortality after the age of 16–18 months, when ovarian function declined and the synthesis of steroid sex hormones decreased (figure) [9]. The average lifespan was (21.16 ± 0.05) months, the median survival rate was 21.80%, the survival rate and the maximum survival rate made 18 and 30 months, respectively.

Animals of group 2 showed a sharp increase in the mortality rate during the first months after the administration of chemotherapy drugs, afterwards this index stabilized (Figure). This may be due to the acute toxicity of the drugs used, *i. e.* the damaging effect on the animal organism was most pronounced immediately after administration. The general condition of the animals, which survived during this period, despite the manifestations of toxic effects, was restored to the initial level; the probability of their further survival increased. Comparison of Kaplan-Meier survival curves according to the Logrank test showed a significant difference between them. The average lifespan of animals was (10.2 ± 0.09) months, the median survival rate was 10.8%, the survival rate and the maximum survival rate made 6 and 19 months, respectively.

In animals of group 3, the Kaplan-Meier curve differed significantly from the curves of animals of groups 1 and 2 (Figure), there was a sharp decrease in the mortality rate. The average lifespan



Криві виживаності самиць мишей з моделлю циклофосфамід-індукованої оваріальної недостатності після застосування криоконсервованих похідних плацентарного походження у тварин досліджуваних груп: 1 — група 1; 2 — група 2; 3 — група 3; 4 — група 4; 5 — група 5. Survival curves of female mice with a model of cyclophosphamide-induced ovarian failure after administration of cryopreserved placental derivatives in animals of the studied groups: 1 — group 1; 2 — group 2; 3 — group 3; 4 — group 4; 5 — group 5.

компонентів екстракту плаценти шляхом зв'язування зі специфічними рецепторами, присутніми на поверхні клітин-мішеней, з подальшою стимуляцією пошкоджених клітин, що забезпечувало відновлення та регенерацію тканин [3]. Середня тривалість життя тварин складала ($15,6 \pm 0,06$) місяців, медіана виживаності — 18,8%, виживаність — 10 місяців, максимальна виживаність — 24 місяці. У тварин групи 5 крива Каплана-Майєра значуще відрізнялася від кривих тварин груп 1 і 2, не мала відмінностей порівняно з кривими груп 3 і 4 (рисунок). Середня тривалість життя самиць мишей складала ($14,36 \pm 0,07$) місяців, медіана виживаності — 17,8%, виживаність — 8 місяців, максимальна виживаність — 23 місяці.

Особливістю моделі циклофосфамід-індукованої оваріальної недостатності є різке підвищення показника смертності тварин від гострої токсичності протягом перших двох місяців після введення хіміопрепаратів. Застосування кріоконсервованих клітини, екстракту або фрагментів плаценти збільшило тривалість життя та виживаність самиць мишей в моделі циклофосфамід-індукованої оваріальної недостатності. Найвищі показники виживаності та тривалості життя самиць мишей з циклофосфамід-індукованою оваріальною недостатністю після застосування кріоконсервованих похідних плацентарного походження показані для екстракту плаценти.

Література

1. Badawy A, Sobh MA, Ahdy M, Abdelhafez MS. Bone marrow mesenchymal stem cell repair of cyclophosphamide-induced ovarian insufficiency in a mouse model. *Int J Womens Health*. 2017; 9: 441–7.
2. Clarissa A, Sutandi N, Fath AA. Stem-cell therapy following high-dose chemotherapy in advanced retinoblastoma: a systematic review. *Asia Pac J Ophthalmol (Phila)* 2021; 10(4): 397–407.
3. Mitchell AC, Briquez PS, Hubbell JA, Cochran JR. Engineering growth factors for regenerative medicine applications. *Acta Biomater* [Internet]. 2015 Nov 7 [cited 2022 Sep 10]: 30: 26555377. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6067679/>
4. Prokopyuk VYu, Chub OV, Shevchenko NA, et al. Cryopreserved placental explants increase lifespan of male mice and change survival features of female mice. *Probl Cryobiol Cryomed* 2017; 27(2): 143–50.
5. Prokopiuk VYu, Kozub MM, Skibina KP, Prokopiuk OV. Experimental study of cell and tissue therapy protocols in rehabilitation after chemotherapy-induced ovarian failure. *Exp Oncol* 2017; 39(3): 250–1.

of the animals was (16.8 ± 0.06) months, the median survival rate was 17.8%, the survival rate the survival rate and the maximum survival rate made 14 and 24 months, correspondingly. In animals of group 4, the Kaplan-Meier curve differed significantly from the curves of animals of groups 1 and 2 and did not differ from the curves of animals of groups 3 and 5. A certain decrease in the mortality rate of female mice after CPF administration was noted, however, it was less pronounced compared with the use of CPE. This effect can be explained by faster absorption of the placental extract components by binding to specific receptors present on the surface of target cells, followed by stimulation of damaged cells, which ensured tissue repair and regeneration [3]. The average lifespan of the animals was (15.6 ± 0.06) months, the median survival rate was 18.8%, the survival rate and the maximum survival rate made 10 and 24 months, respectively. In animals of group 5, the Kaplan-Meier curve differed significantly from the curves of groups 1 and 2, had no differences compared to the curves of groups 3 and 4 (figure). The average lifespan of female mice was (14.36 ± 0.07) months, the median survival rate was 17.8%, the survival rate and the maximum survival rate amounted to 8 and 23 months, respectively.

A feature of the model of cyclophosphamide-induced ovarian failure is a sharp increase in animal mortality from acute toxicity during the first two months after administration of chemotherapy drugs. The use of cryopreserved placental cells, extract or fragments increased the lifespan and survival of female mice in a model of cyclophosphamide-induced ovarian failure. The highest rates of survival and lifespan of female mice with cyclophosphamide-induced ovarian failure after administration of cryopreserved placental derivatives have been shown for the placental extract.

References

1. Badawy A, Sobh MA, Ahdy M, Abdelhafez MS. Bone marrow mesenchymal stem cell repair of cyclophosphamide-induced ovarian insufficiency in a mouse model. *Int J Womens Health*. 2017; 9: 441–7.
2. Clarissa A, Sutandi N, Fath AA. Stem-cell therapy following high-dose chemotherapy in advanced retinoblastoma: a systematic review. *Asia Pac J Ophthalmol (Phila)* 2021; 10(4): 397–407.
3. Mitchell AC, Briquez PS, Hubbell JA, Cochran JR. Engineering growth factors for regenerative medicine applications. *Acta Biomater* [Internet]. 2015 Nov 7 [cited 2022 Sep 10]: 30: 26555377. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6067679/>



6. Prokopiuk OS, Shevchenko MV, Prokopiuk VYu, et al. Isolation and cryopreservation of placental cells: search for optimal biotechniques in experimental and regenerative medicine. *Probl Cryobiol Cryomed* 2021; 31(1): 82–8.
7. Tang D, Feng X, Ling L, et al. Experimental study for the establishment of a chemotherapy-induced ovarian insufficiency model in rats by using cyclophosphamide combined with busulfan. *Regul Toxicol Pharmacol* [Internet]. 2021 Mar 9 [cited 2022 Sep 10]: 122: 104915. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0273230021000556?via%3Dihub>
8. Xiao GY, Liu IH, Cheng CC, et al. Amniotic fluid stem cells prevent follicle atresia and rescue fertility of mice with premature ovarian failure induced by chemotherapy. *PLoS One* [Internet]. 2014 Sep 8 [cited 2022 Sep 10]: 9(9): e106538. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0106538>.
9. Xie C, Jin J, Lv X, et al. Anti-aging effect of transplanted amniotic membrane mesenchymal stem cells in a premature aging model of Bmi-1 deficiency. *Sci Rep* [Internet]. 2015 Sep 15 [cited 2022 Sep 10]: 5: 13975. Available from: <https://www.nature.com/articles/srep13975>.
10. Zhang T, Yan D, Yang Y, et al. The comparison of animal models for premature ovarian failure established by several different source of inducers. *Regul Toxicol Pharmacol* [Internet]. 2016 Sep 7 [cited 2022 Sep 10]: 81: 27612992. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0273230016302501?via%3Dihub>.
4. Prokopyuk VYu, Chub OV, Shevchenko NA, et al. Cryopreserved placental explants increase lifespan of male mice and change survival features of female mice. *Probl Cryobiol Cryomed* 2017; 27(2): 143–50.
5. Prokopiuk VYu, Kozub MM, Skibina KP, Prokopiuk OV. Experimental study of cell and tissue therapy protocols in rehabilitation after chemotherapy-induced ovarian failure. *Exp Oncol* 2017; 39(3): 250–1.
6. Prokopiuk OS, Shevchenko MV, Prokopiuk VYu, et al. Isolation and cryopreservation of placental cells: search for optimal biotechniques in experimental and regenerative medicine. *Probl Cryobiol Cryomed* 2021; 31(1): 82–8.
7. Tang D, Feng X, Ling L, et al. Experimental study for the establishment of a chemotherapy-induced ovarian insufficiency model in rats by using cyclophosphamide combined with busulfan. *Regul Toxicol Pharmacol* [Internet]. 2021 Mar 9 [cited 2022 Sep 10]: 122: 104915. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0273230021000556?via%3Dihub>
8. Xiao GY, Liu IH, Cheng CC, et al. Amniotic fluid stem cells prevent follicle atresia and rescue fertility of mice with premature ovarian failure induced by chemotherapy. *PLoS One* [Internet]. 2014 Sep 8 [cited 2022 Sep 10]: 9(9): e106538. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0106538>.
9. Xie C, Jin J, Lv X, et al. Anti-aging effect of transplanted amniotic membrane mesenchymal stem cells in a premature aging model of Bmi-1 deficiency. *Sci Rep* [Internet]. 2015 Sep 15 [cited 2022 Sep 10]: 5: 13975. Available from: <https://www.nature.com/articles/srep13975>.
10. Zhang T, Yan D, Yang Y, et al. The comparison of animal models for premature ovarian failure established by several different source of inducers. *Regul Toxicol Pharmacol* [Internet]. 2016 Sep 7 [cited 2022 Sep 10]: 81: 27612992. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0273230016302501?via%3Dihub>.