

УДК 615.361:618,46]:57.086.13:[612.6.08+618.1-092.4

В.Ю. Прокопюк<sup>1\*</sup>, О.В. Грищенко<sup>3</sup>, О.В. Прокопюк<sup>4</sup>,  
Н.О. Шевченко<sup>1</sup>, О.В. Фалько<sup>2</sup>, А.В. Сторчак<sup>3</sup>, А.О. Щедров<sup>5</sup>

## Вплив кріоконсервованих експлантів плаценти на жіночу репродуктивну систему в нормі та за патології (Експериментальне дослідження)

UDC 615.361:618,46]:57.086.13:[612.6.08+618.1-092.4

V.Yu. Prokopyuk<sup>1\*</sup>, O.V. Grischenko<sup>3</sup>, O.V. Prokopyuk<sup>4</sup>,  
N.O. Shevchenko<sup>1</sup>, O.V. Falko<sup>2</sup>, A.V. Storchak<sup>3</sup>, A.O. Schedrov<sup>5</sup>

## Effect of Cryopreserved Placental Explants on Female Reproductive System Under Normal and Pathological Conditions (Experimental study)

**Реферат:** Збереження та відновлення репродуктивного здоров'я – найважливіші задачі сучасної медицини. Перспективним у лікуванні жіночої патології є застосування похідних плаценти людини (мезенхімальні стромальні клітини, плодові оболонки, екстракти та експланти), які мають великий проліферативний потенціал та тропність до жіночої репродуктивної системи. У роботі визначали вплив кріоконсервованих експлантів плаценти на жіночу репродуктивну систему щурів та мишей в нормі (фертильність та естральний цикл) та за патології (інфекційний процес, ендокринопатія, аутоімунний стан, травма та ішемія). Виявлено, що кріоконсервовані експланти плаценти мають трофічний ефект на матку та яєчники, тимчасово затримують овуляцію, полегшують перебіг аутоімунної та ендокринної патології, ішемії. При цьому під дією експлантів плаценти погіршується перебіг інфекційного процесу та посилюється спайкоутворення.

**Ключові слова:** плацента, кріоконсервування, миші, щури, вагітність, безпліддя, антифосфоліпідний синдром, синдром полікістозних яєчників, інфекція, перекут яєчників.

**Реферат:** Сохранение и восстановление репродуктивного здоровья – важнейшие задачи современной медицины. Перспективным в лечении патологии женской репродуктивной системы является применение производных плаценты человека (мезенхимальные стромальные клетки, плодные оболочки, экстракты и экспланты), которые имеют большой пролиферативный потенциал и тропность к женской репродуктивной системе. В работе определяли влияние кріоконсервированных эксплантов плаценты на женскую репродуктивную систему крыс и мышей в норме (фертильность и эстральный цикл) и при патологии (инфекционный процесс, эндокринопатия, аутоиммунное состояние, травма и ишемия). Выведено, что кріоконсервированные экспланты плаценты имеют трофический эффект в отношении матки и яичников, временно задерживают овуляцию, положительно влияют на течение аутоиммунной и эндокринной патологии, ишемии. При этом, под действием эксплантов плаценты ухудшается течение инфекционного процесса и повышается образование спаек.

**Ключевые слова:** плацента, кріоконсервирование, мыши, крысы, беременность, бесплодие, антифосфолипидный синдром, синдром поликистозных яичников, инфекция, перекут яичников.

**Abstract:** One of the most important tasks in current medicine is the preservation and restoration of fertility. The application of human placental derivatives (mesenchymal stromal cells, fetal membranes, extracts and explants), having a high proliferative potential and the affinity to female reproductive system, is a promising direction for treating female reproductive pathology. Here we determined the effect of cryopreserved placental explants on female reproductive system of rats and mice under normal conditions (fertility and estrous cycle) and in pathology (infectious process, endocrinopathy, autoimmune pathology, trauma/ischemia). The cryopreserved placental explants were revealed to have a trophic effect on uterus and ovaries, they temporarily delayed ovulation and positively affected autoimmune, endocrine pathology and ischemia course. In addition, placental explants aggravated the infection course and increased the peritoneal adhesion formation.

**Key words:** placenta, cryopreservation, mice, rats, pregnancy, infertility, antiphospholipid syndrome, polycystic ovary syndrome, infection, ovarian torsion.

<sup>1</sup>Відділ кріобіології систем репродукції, Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

<sup>2</sup>Сектор «Низькотемпературний банк біологічних об'єктів», Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

<sup>3</sup>Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна

<sup>4</sup>Харківська медична академія післядипломної освіти

<sup>5</sup>Харківський національний медичний університет

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

<sup>2</sup>Low Temperature Bank of Biological Objects, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

<sup>3</sup>V.N. Karazin Kharkiv National University, Ukraine

<sup>4</sup>Kharkiv Medical Academy of Postgraduate Education, Ukraine

<sup>5</sup>Kharkiv National Medical University, Ukraine

\*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: v.yu.prokopyuk@gmail.com

Надійшла 20.03.2017

Прийнята до друку 26.07.2017

\*To whom correspondence should be addressed:

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

Received March, 20, 2017

Accepted July, 26, 2017

Збереження та відновлення жіночого репродуктивного здоров'я – пріоритетний напрямок роботи Всесвітньої організації охорони здоров'я у XXI столітті. За даними ВООЗ в останні роки в Україні спостерігається тенденція до покращення показників репродуктивного здоров'я жінки порівняно з іншими країнами, які мають схожий рівень доходу, однак відмічається деяке відставання від країн Західної Європи [22]. Подолання проблем безпліддя та патологій вагітності, які зазвичай є результатом порушень жіночої статевих системи, дозволить покращити демографічні показники та здоров'я новонароджених [3, 23]. Найбільш поширеними причинами безпліддя та патологій вагітності є інфекційні процеси, викликана ними спайкова хвороба, аутоімунні, ендокринні та судинні розлади [11, 23]. Наразі у сучасній медицині розвиваються технології, пов'язані з застосуванням стовбурових клітин та факторів росту, одним із найбільш перспективних джерел яких є плацента [3, 15, 18]. По-перше, це пояснюється тим, що клітини плаценти мають активний проліферативний потенціал та здатність регулювати як розвиток плода, так і материнсько-плодову взаємодію. По-друге, плацента змінює гомеостаз матері, а це впливає на перебіг багатьох захворювань [20]. Клінічне застосування об'єктів плацентарного походження можливе тільки за наявності стандартизованого та біобезпечного матеріалу, що забезпечується технологіями кріоконсервування та низькотемпературного банкування [3, 4, 7]. Існує багато експериментальних та клінічних повідомлень щодо застосування мезенхімальних стовбурових клітин (МСК), екстрактів, тканини плаценти при патологіях жіночої репродуктивної системи [3, 5, 6, 9, 10, 13]. Однак ці біологічні об'єкти не є стандартизованими та систематизованими відповідно до методик, а також тварин, похідних плаценти, які застосовуються в експериментах. Продемонстровано, що МСК, виділені з плацентарного матеріалу, відрізняються за властивостями від МСК із інших джерел [12]. Із кріоконсервованих біооб'єктів саме експланти плаценти (органотипова культура) мають виражені властивості усіх дериватів плаценти та є найбільш близькими до неї за структурою та функціями [7].

Визначення впливу плаценти та її похідних на організм експериментальних тварин у нормі та за патології дозволить, з одного боку, спрямувати дослідження щодо доцільності застосування похідних плаценти за конкретних патологічних станів із визначенням показань, протипоказань та ефективності, з іншого, – глибше дослідити вплив плацентарних факторів на органи та системи жінки. Це може бути важливо не тільки для використання у клітинній терапії, а й для вивчення особливостей патологічних процесів під час вагітності.

One of the priorities of the World Health Organization's activity in the 21<sup>st</sup> century is to preserve female fertility. According to the WHO data the tendency to improve the female reproductive health indices has been recently observed in Ukraine as compared to other countries with similar income level, but there is some lag behind the Western European countries [22]. Overcoming the infertility and pregnancy pathologies, usually resulting from disorders of female reproductive system, will improve demographic indices and newborn health [8, 23]. The most common causes of infertility and pregnancy pathologies are infectious processes and resulting adhesive disease, autoimmune, endocrine and vascular disorders [4, 23]. The therapies involving stem cells and growth factors, where placenta is one of the most promising sources, are now in progress in current medicine [8, 10, 16]. First, this is due to an active proliferative potential of placental cells and capability to regulate both fetal development and maternal-fetal interaction. Secondly, the placenta changes maternal homeostasis, thereby affecting the course of many diseases. Clinical application of placenta-derived objects is possible only if standardized and biosafe material is available, which could be provided by technologies of cryopreservation and low-temperature banking [8, 12, 5]. There is a huge number of experimental and clinical reports on using mesenchymal stem cells (MSCs), extracts, placental tissue in female reproductive pathologies [2, 3, 7, 8, 11, 19]. However, these biological objects are not standardized and classified according to the techniques, experimental animals, as well as placental products used in the experiments. The MSCs of placental origin differ by their properties from the cells procured from other sources [6]. Among the cryopreserved bio-objects, namely placental explants (organotype culture) have pronounced properties of all the placental derivatives, and the most similar structure and functions [15].

Determining the impact of placenta and its derivatives on experimental animals' body under normal conditions and in pathology will allow, on the one hand, to study the expediency to apply placental derivatives in specific pathological conditions with determining the indications, contraindications and efficiency and to better understand the impact of placental factors on female organs and systems, on the other hand. This may be important not only for cell therapy, but also for understanding the peculiarities of pathological processes during pregnancy.

The research was aimed to elucidate the effect of cryopreserved placental explants on female reproductive system under normal conditions and in different pathologies in laboratory animals.

## Materials and methods

*Experiment design.* For a versatile estimation of the impact of cryopreserved placental explants (CPEs)



Метою роботи було визначення впливу кріоконсервованих експлантів плаценти на жіночу репродуктивну систему у нормі та за різних патологічних станів на лабораторних тваринах.

### Матеріали та методи

*Дизайн експерименту.* Для всебічної оцінки впливу кріоконсервованих експлантів плаценти (КЕП) на жіночу репродуктивну систему спочатку з'ясували їхній вплив на характер естрального циклу та репродуктивні показники інтактних тварин. Далі визначали дію КЕП на основні патологічні стани, які призводять до порушення репродуктивної функції (інфекційний процес, аутоімунний процес, ендокринна патологія, травма та ішемія). У якості інфекційного процесу була обрана модель перитоніту з пункцією та легуванням, яка є відтворюваною. Це дозволяє моделювати гострий інфекційний процес із наступним спайкоутворенням. При цьому дана модель забезпечує низькі показники летальності [16]. Антифосфоліпідний синдром (АФС) був обраний як типова та розповсюджена аутоімунна патологія, характерна для вагітності. Основною ланкою у розвитку цієї патології є вироблення аутоантитіл до фосфоліпідів, що призводить до коагулопатії, порушення плацентациї та збільшення показників материнської, а також перинатальної захворюваності й летальності [6, 21]. Синдром полікістозних яєчників (СПКЯ) обрано як модель ендокринної патології, яка супроводжується порушеннями функцій гіпоталамуса, гіпофіза, наднирників, яєчників; безпліддя; підвищеною секрецією андрогенів та естрогенів [14, 17]. Перекрут яєчників обрано як патологію, в основі якої лежить артеріальна ішемія та венозний застій із крововиливами у паренхіму яєчників, формуванням тромбів, загибеллю фолікулів, унаслідок чого розвивається безпліддя, яєчникова недостатність, посткастраційний синдром [19].

*Отримання КЕП* проводили за раніше розробленим методом [4]. Плаценту людини, доставлену протягом 3-х годин після операції кесаревого розтину, промивали фосфатно-сольовим буфером і фрагментували. У якості кріозахисного середовища використовували 10%-й розчин диметилсульфоксиду («Sigma», США) на основі середовища DMEM із високим вмістом глюкози і *L*-глутаміном («BioWest», Франція), збагаченого 10% фетальної бичачої сироватки («Lonza», Німеччина). Зразки заморожували у кріопробірках «Nunc» (США) з використанням ізопропанолових контейнерів «Mr. Frosty™ Freezing Container» («Thermo Fisher Scientific», США) зі швидкістю 1 град/хв до  $-70^{\circ}\text{C}$  із наступним зануренням у рідкий азот. Розморожували на водяній бані («ВБ-4», Україна) за температури  $37^{\circ}\text{C}$  з наступним відмиванням від кріопротектора живиль-

on female reproductive system, we elucidated first how they affected the character of estrous cycle, and reproductive indices in the intact animals. Then we determined the CPEs effect on the main pathological states, stipulating the reproductive function disorder (infection, autoimmune process, endocrine pathology, trauma and ischemia). The model of peritonitis with puncture and ligation was chosen to simulate infection process. This model is replicable, thereby enabling to observe an acute process with subsequent formation of adhesions, herewith the animals are characterized with quite a low mortality [13]. An antiphospholipid syndrome (APS) was selected as a typical and widespread autoimmune pathology, being typical for pregnancy. The major link of this pathology is the production of autoantibodies to phospholipids, resulting in coagulopathy, placentation disorder, increased maternal and perinatal morbidity and mortality [19, 20]. The polycystic ovary syndrome (POS) was taken as a model of endocrine pathology, accompanied by disordered functions of hypothalamus, pituitary, adrenal glands, ovaries; infertility; increased secretion of androgens and estrogens [9, 14]. The ovarian torsion model was used as the pathology, characterized with arterial ischemia and venous stasis with hemorrhages in ovarian parenchyma, thrombus formation, loss of follicles, resulting in development of infertility, ovarian failure, postcastration syndrome [18].

*The CPEs were procured* according to the previously designed technique [12]. Human placenta, delivered within 3 hrs after Caesarean section was washed with phosphate-buffered saline and disintegrated. As a cryoprotective medium we used 10% dimethyl sulfoxide (Sigma, USA), in high glucose DMEM medium with *L*-glutamine (BioWest, France) enriched with 10% fetal bovine serum (Lonza, Germany). The samples were frozen in Nunc cryovials (USA) using Mr. Frosty™ isopropanol freezing containers (Thermo Fisher Scientific, USA) with 1 deg/min rate down to  $-70^{\circ}\text{C}$ , followed by immersion into liquid nitrogen. Then they were warmed in a water bath (WB-4, Ukraine) at  $37^{\circ}\text{C}$  with following cryoprotectant wash-out with nutrient medium. Prior to administration the CPEs were fragmented down to single villi and weighed on Axis AD 50 scales (Axis, Poland) with 0.5 mg precision.

In this research we used 6-month-old female BALB/c mice and outbred F1 ones (first generation BALB/c and CBA) weighing  $(20.0 \pm 1.5)$  g and 6-month-old female Wistar rats weighing  $(250.0 \pm 20.0)$  g. During experiment the animals were housed at the animal facility with natural light/dark cycle and a standard diet. Animals were kept in accordance with the animal facility rules and regulations. The CPEs doses for animals were calculated according to the guidelines for drug study [17]. The calculated dose (10 and 70 mg for mice and rats, respectively) was



ним середовищем. Перед введенням КЕП фрагментували до окремих ворсин та зважували на вагах «Axis AD 50» («Axis», Польща) з дискретністю 0,5 мг.

Експерименти проводили на 6-місячних самицях мишей лінії BALB/c та нелінійних F1 (перше покоління BALB/c та СВА) масою ( $20,0 \pm 1,5$ ) г та на 6-місячних самицях щурів лінії Вістар масою ( $250,0 \pm 20,0$ ) г. Протягом експерименту тварини знаходилися за умов природного освітлення та стандартного харчування. Тварин утримували відповідно до правил оснащення та функціонування виварію. Дози КЕП для тварин розраховували згідно з рекомендаціями щодо дослідження лікарських препаратів [1]. Розраховану дозу (для мишей – 10 мг, для щурів – 70 мг) вводили у фосфатно-сольовому буфері через товсту голку підшкірно.

*Дослідження впливу КЕП на оваріальний цикл та загальний стан* проводили на двох групах мишей BALB/c по 10 у кожній: 1 – із введенням КЕП; 2 – контрольна. У мишей досліджували вагінальні мазки, виявляли фазу циклу, визначали масу, за 5-бальною шкалою оцінювали загальний стан (блиск очей, колір і стан шерсті, активність). Проводили гістологічне дослідження матки та яєчників.

*Дослідження впливу КЕП на фертильність* виконували на двох групах мишей BALB/c по 10 у кожній: 1 – із введенням КЕП; 2 – контрольна. Після введення КЕП самиць спарювали з самцями у співвідношенні 2:1, реєстрували кількість тварин, які завагітніли, час до пологів, кількість та масу новонароджених.

*Дослідження впливу КЕП на перебіг інфекційного процесу.* Запалення черевної порожнини моделювали на нелінійних лабораторних мишах шляхом перев'язки та пункції нижньої третини сліпої кишки за загальноприйнятим методом [16]. Використання у роботі аутбредних тварин пов'язане з високою смертністю при моделюванні інфекційного процесу на інбредних тваринах. Мишей розділили на три групи по 10 у кожній: 1 – введення КЕП через 2 тижні після моделювання; 2 – моделювання інфекційного процесу без введення КЕП; 3 – контроль (хибнооперовані тварини). Досліджували показники клінічного аналізу крові, морфологічну структуру яєчників та матки. Для підтвердження впливу перитоніту на статеву систему через місяць після виконання моделі самиць спарювали з самцями у співвідношенні 2:1, реєстрували час від спарювання до пологів, оцінювали репродуктивні показники, після завершення лактації тварин виводили з експерименту, оцінювали спайковий процес за I–IV ступенями [2].

*Дослідження впливу КЕП на перебіг аутоімунного процесу* проводили на моделі АФС, як типового прояву аутоімунної патології, яка впливає на репродукцію. У мишей лінії BALB/c АФС моделювали шляхом активної імунізації [6, 21] з використанням

subcutaneously administered in phosphate-buffered saline through a thick needle.

*The CPEs effect on ovarian cycle and general condition* was studied in 2 groups of BALB/c mice of 10 in each: the group 1 comprised the animals with CPEs administration; the group 2 was the control. In mice we examined vaginal smears, determined the phase of cycle, recorded the weight, and assessed general health condition (eye shadow, hair colour and state, activity) by a 5-point scale. The uterus and ovaries were histologically examined.

*The CPEs effect on fertility* was investigated in BALB/c mice groups of 10 in each: the group 1 consisted of animals with introduced CPEs, the group 2 was the control. After CPEs administration the females were coupled with males in 2:1 ratio, then the number of animals, that became pregnant, time to delivery, number and weight of newborn animals were recorded.

*Study of CPEs effect on infection process course.* The inflammation of abdominal cavity was simulated in outbred laboratory mice via ligation and puncture of the cecum lower third according to the standard technique [13]. The use of outbred animals was caused by a high mortality following simulation of infectious process in inbred animals. The mice were divided into 3 groups of 10 in each: group 1 – CPEs administration in 2 weeks after simulation; group 2 – the simulation of infectious process with no CPEs administration, and group 3 was the control, sham-operated animals. The complete blood count, morphological structure of ovaries and uterus were examined. In order to confirm this model effect on sexual system one month after surgery the females were coupled with males in 2:1 ratio with following recording the time from coupling to labour and assessment of reproductive indices. When lactation was terminated the animals were sacrificed and the adhesion process was evaluated by I–IV stages [5].

*The CPEs effect on the autoimmune state course* was studied in the model of antiphospholipid syndrome (APS), as a typical manifestation of autoimmune pathology, affecting reproduction. In BALB/c mice the APS was simulated via active immunisation [19, 21] using cardiolipin antigen (Biolik, Ukraine) diluted in 0.1% albumin solution, injected four times every 7 days with a total dose of cardiolipin of 30 µg per animal. The APS model was considered to be formed 4 weeks after the last administration of the drug and confirmed by the reaction of microprecipitation, performed with the commercial kit 'Cardiolipin antigen for microprecipitation reaction' (Biolik) according to the manufacturer's instructions. Animals were divided into 3 groups of 20 mice in each: group 1 comprised untreated animals with APS, group 2 consisted of animals with APS and administrated CPEs one week after the model formation, group 3 was the control. The comp-



кардіоліпінового антигена («Біолек», Україна), розведеного у 0,1%-му розчині альбуміну, який вводили чотириразово через кожні 7 діб із загальною дозою кардіоліпіну 30 мкг на тварину. Модель АФС вважали сформованою через 4 тижні після останнього введення препарату та підтверджували реакцією мікропреципітації, яку проводили з використанням комерційного набору «Антиген кардіоліпіновий для реакції мікропреципітації» («Біолек», Україна) згідно з інструкцією виробника. Тварин розділили на три групи по 20 у кожній: 1 – із АФС без лікування; 2 – із АФС та введенням КЕП через тиждень після формування моделі; 3 – контроль. Досліджували клінічний аналіз крові, реакцію бласттрансформації лімфоцитів (спонтанну та індуковану) через 1 та 3 тижні після лікування. Через місяць після лікування з кожної групи виводили по 10 самиць для гістологічного дослідження матки та яєчників, решту спарювали з самцями у співвідношенні 2:1. Час настання вагітності реєстрували методом вагінальних мазків. На 18-ту добу вагітності тварин виводили з експерименту, визначали кількість живих та мертвих плодів, масу плодів та плаценти. Проводили гістологічне дослідження плаценти.

*Дослідження впливу КЕП на перебіг ендокринної патології яєчників* проводили на моделі СПКЯ. Цю модель обрали як розповсюджену ендокринопатію з порушенням центральної регуляції та гіперфункції яєчників, за якої спостерігається відносна або абсолютна гіперестрогенія. Патологію моделювали на щурах лінії Вістар підшкірним введенням раз на добу 4 мг міфепристон (Stada, Росія), розведеному у 0,2 мл персикової олії, протягом 8 діб [17]. Тварин розділили на три групи по 12 у кожній: 1 – тварини з СПКЯ, які отримували КЕП через 2 тижні після формування моделі; 2 – тварини з СПКЯ без лікування; 3 – інтактні тварини. Оваріальний цикл тварин досліджували методом вагінальних мазків. Через місяць після лікування з експерименту виводили по 6 тварин із кожної групи, визначали масові коефіцієнти, досліджували гістологічні препарати яєчників та матки. Інших самиць спарювали з самцями у співвідношенні 2:1, після пологів визначали кількість плодів, їхню масу і час від початку спарювання до пологів.

*Вплив КЕП на реабілітацію після травми та ішемії* вивчали на моделі перекруту яєчників. Патологію моделювали на щурах лінії Вістар за методом O. Taskin та співавт. [19] шляхом накладання лігатури кетгуту №6 («Ігар», Україна) на 1 см нижче правого яєчника на матку з мезосальпінгсом на 4 години з наступною релапаротомією та зняттям лігатури. Тварин розділили на три групи по 12 у кожній: 1 – щури після моделювання перекруту

lete blood count, blast-transformation reaction of lymphocytes (spontaneous and induced) were examined 1 and 3 weeks post therapy. One month after therapy 10 animals from each group were sacrificed for histological examination of uterus and ovaries, the others were coupled with males in 2:1 ratio. The time of pregnancy onset was recorded using the vaginal smear method. To day 18 of pregnancy the animals were sacrificed, the number of live and dead fetuses, fetal and placental weight were estimated. Placenta was histologically examined.

*The CPEs effect on ovarian endocrine pathology course* was investigated in the POS model. This model was selected as an example of common endocrinopathy with disordered central regulation and ovarian hyperfunction, when either relative or absolute hyperestrogenism could be observed. The pathology was simulated in Wistar rats via subcutaneous administration of 4 mg Mifepristone (Stada, Russia) diluted in 0.2 ml of peach oil once a day for 8 days [14]. Animals were divided into 3 groups of 12 in each: the group 1 comprised the animals with POS, received CPEs in 2 weeks after the model formation; the untreated animals with POS were in the group 2, the group 3 was intact animals. Animals' ovarian cycle was examined by vaginal smears. Six animals in each group were sacrificed one month after therapy. The mass coefficients, histological sections of ovaries and uterus were assessed. Remained females were coupled with males in 2:1 ratio, after labour the number of fetuses, their weight and time from the beginning of coupling to labour were determined.

*The CPEs effect on rehabilitation after trauma and ischemia* was studied in a model of ovarian torsion. The pathology was simulated in Wistar rats according to the method of O. Taskin *et al.* [18], via imposing catgut ligatures №6 (Igar, Ukraine) 1 cm below the right ovary onto the uterus with mesosalpinx for 4 hrs with following relaparotomy and ligature removal. The animals were divided in 3 groups ( $n = 12$ ): the group 1 – the rats after simulating ovarian torsion with CPEs administration within post-surgery period; the group 2 – the animals after simulating ovarian torsion without therapy; the group 3 – sham-operated ones. Two animals in each group were sacrificed during second surgery for morphological studies of uterus and ovaries to confirm the pathological process formation. Other animals were coupled with males in 2:1 ratio one month after surgery. The pregnancy time onset was assessed by vaginal smears. To day 18 of pregnancy the animals were sacrificed, the number of live and dead fetuses, fetal and placental weight were assessed. The ovaries were histologically examined.

The placenta was derived with the informed consent of women after a Cesarean section. The performance of experiments was approved by the Committee



яєчників із введенням КЕП у післяопераційному періоді; 2 – тварини після моделювання перекруту яєчників без лікування; 3 – хібнооперовані тварини. Під час релaparотомії для морфологічного дослідження матки та яєчників із експерименту виводили по дві тварини з метою підтвердження формування патологічного процесу. Інших самиць через місяць після операції спарювали з самцями у співвідношенні 2:1, час настання вагітності реєстрували методом вагінальних мазків. На 18-ту добу вагітності тварин виводили з експерименту, визначали кількість живих та мертвих плодів, масу плодів і плаценти. Проводили гістологічне дослідження яєчників.

Плаценту отримували з інформованої згоди жінок після операції кесарів розтин. Проведення експериментів було погоджено з комітетом біоетики Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (протокол №2 від 03.06.2013) відповідно до «Загальних принципів експериментів на тваринах», схвалених VI конгресом із біоетики (Київ, 2016) і узгоджених із положенням «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986).

Для отримання статистично значущих даних застосовували U-критерій Манна-Уїтні та критерій Стьюдента. Для статистичних розрахунків і обробки даних використовували програмне забезпечення «Past V. 3.15» (Університет м. Осло, Норвегія).

### Результати та обговорення

Під час дослідження впливу КЕП на оваріальний цикл та загальний стан тварин було виявлено, що протягом 2-х тижнів до лікування регулярний чотириденний цикл у групі 1 був у 7-ми, у групі 2 – у 8-ми тварин. Маса мишей дорівнювала ( $20,6 \pm 1,2$ ) та ( $20,2 \pm 0,9$ ) г, середній бал загального стану – ( $4,8 \pm 0,2$ ) та ( $4,7 \pm 0,3$ ) відповідно. Після лікування та спостереження протягом 2-х місяців регулярний естральний цикл спостерігали в усіх тварин з КЕП та у 7-ми тварин без КЕП. Середній бал загального стану складав ( $4,7 \pm 0,7$ ) та ( $4,8 \pm 0,3$ ), маса – ( $23,3 \pm 1,1$ ) та ( $22,5 \pm 0,9$ ) г відповідно, що є фізіологічною нормою у цьому віці. Гістологічне дослідження яєчників у обох групах показало збереження фолікулярного апарата, стромы та кровообігу. У тварин із введенням КЕП спостерігали незначне збільшення розмірів яєчників та зменшення кількості зрілих фолікулів (рис. 1). Під час дослідження матки у тварин із введенням КЕП спостерігали різку гіпертрофію як матки в цілому, так і ендометрію зокрема, збільшення кількості залоз. Ці зміни, на наш погляд, можуть бути обумовлені дією хоріонічного гонадотропіну людини [8].

in Bioethics of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine (protocol №2 dated of June 03, 2013) according to the General Principles of Experiments in Animals, approved by the 6<sup>th</sup> National Congress in Bioethics (Kyiv, 2016) and the statements of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986).

We used the Mann-Whitney U-test and Student's t-test to obtain the statistically significant conclusions. The results were statistical processed using Past V. 3.15 software (Norway).

### Results and discussion

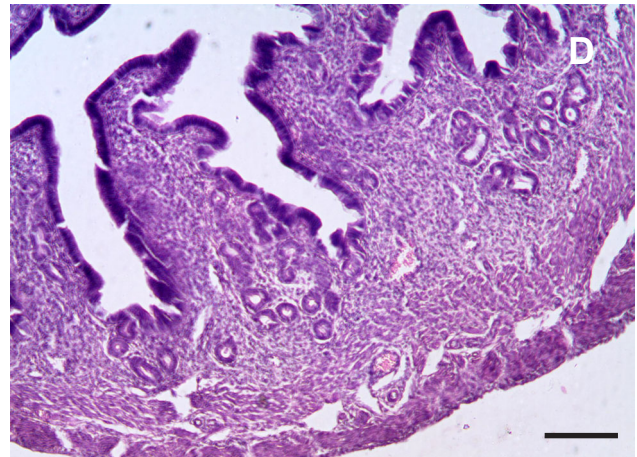
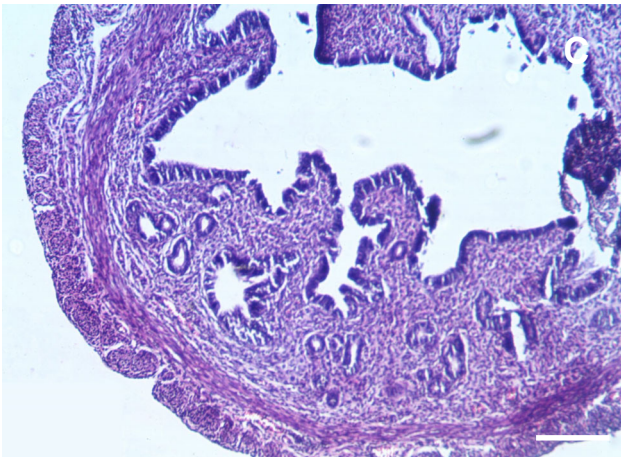
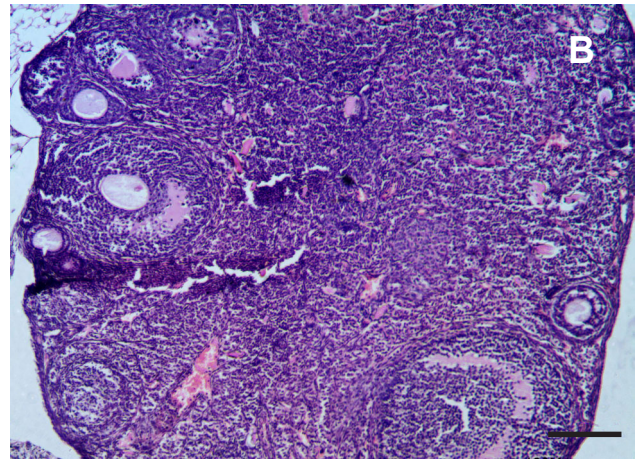
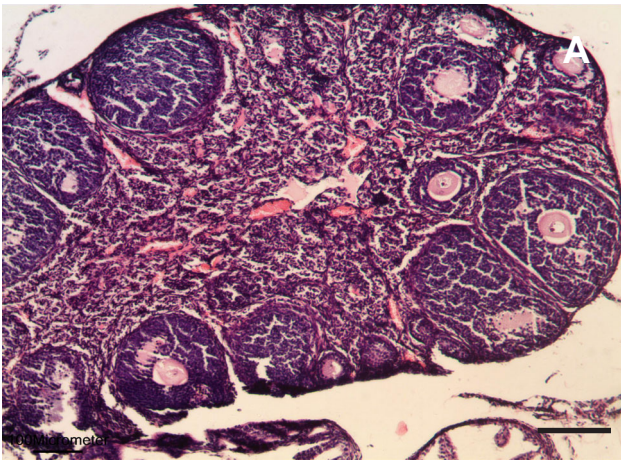
Studying the CPEs effect on ovarian cycle and general health condition of animals revealed a regular four-day cycle during 2 weeks prior to therapy in 7 and 8 animals of the group 1 and 2, respectively. The mice weight was ( $20.6 \pm 1.2$ ) and ( $20.2 \pm 0.9$ ) g, the mean score of general health condition was ( $4.8 \pm 0.2$ ) and ( $4.7 \pm 0.3$ ), respectively. After therapy and observation within 2 months, regular estral cycle was observed in all the animals with CPEs and in 7 without CPEs. The mean score of general health condition made ( $4.7 \pm 0.7$ ) and ( $4.8 \pm 0.3$ ), the weight was ( $23.3 \pm 1.1$ ) and ( $22.5 \pm 0.9$ ) g, respectively, and it corresponded to a physiological norm at this age. Histological examination of ovaries in both groups showed the preservation of follicular apparatus, stroma and blood circulation, a certain increase was observed in ovarian size in group with CPEs and a decrease was found in a number of maturing ovarian follicles (Fig. 1). Examination of the uterus of animals with CPEs showed a sharp hypertrophy in the whole uterus, and endometrium, in particular, an increased number of glands. We believe that these changes may be stipulated by the effect of human chorionic gonadotropin [1].

This could indicate that CPEs have a positive trophic effect on reproductive organs. The application of placental derivatives is possible in pathological states with atrophic phenomena, previously shown in the model of ovarian failure after chemotherapy [2].

Study of reproductive indices of animals after CPEs application showed that the pregnancy occurred likely later despite the estral cycle normalization in animals after CPEs application (Table 1). This may be due to the inhibited ovulation caused by human chorionic gonadotrophin. Previously we have reported the dynamics of its release from CPEs [15]. There was observed an increased number and weight of fetuses in the main group, but these data had no significant differences vs the control.

After infectious process simulating (Fig. 2A) the number of pregnant animals was significantly lower in the group with CPEs application than in the control





**Рис. 1.** Структура яєчників та матки інтактної групи та групи після застосування КЕП: **А** – яєчник інтактної миші; **В** – яєчник після введення КЕП; **С** – матка інтактної миші; **Д** – матка після введення КЕП. Забарвлювання гематоксиліном та еозином. Масштабна лінійка 100 мкм.

**Fig. 1.** Structure of ovaries and uterus of intact group and group with applied CPEs: **A** is ovary of intact mouse; **B** is ovary after CPEs; **C** is uterus of intact mouse; **D** is uterus after CPEs introduction. H&E stain. Scale bar 100 µm.

У зв'язку з цим можна зробити припущення, що КЕП чинять позитивний трофічний вплив на органи репродуктивної системи. Застосування похідних плаценти можливе при патологічних станах із атрофічними явищами, що раніше було показано на моделі яєчкової недостатності після хіміотерапії [9].

При дослідженні репродуктивних показників тварин після застосування КЕП продемонстровано, що, незважаючи на нормалізацію естрального циклу у тварин після застосування КЕП, вагітність настає вірогідно пізніше (табл. 1). Це може бути пов'язане з інгібуванням овуляції хоріонічним гонадотропіном людини, динаміка вивільнення якого з КЕП була нами показана у попередніх дослідженнях [7]. Спостерігалось збільшення кількості та маси плодів у тварин основної групи, однак ці дані не мали значущих відмінностей від контролю.

Після моделювання інфекційного процесу (рис. 2, А) відмічено, що у групі з застосуванням КЕП кількість тварин, які завагітніли, була значуще меншою,

group and in that with untreated inflammation. Pregnancy occurred later after therapy as well, a number of fetuses was significantly reduced (Table 2).

After experiment completing the single adhesions of I–II degrees were revealed in sham-operated animals (group 3) during autopsy, in group 2 mice (inflammation without therapy) the adhesions were observed virtually in all the cases, in the group 1 animals (inflammation and CPEs administration) the severity of adhesive process was in progress (Fig. 2B), and the conglomerate included the ovaries and uterus (Table 3). The inter-loop abscesses were noted in 3 animals. Histological examination of organs in animals with abscesses demonstrated the presence of septic phenomena. In particular, in uterus we have observed a sharp atrophy, cell approach, shrinkage of connective tissue, hyperchromic nuclei, vasoconstriction, leukocyte infiltration (Fig. 2C), there were atrophic phenomena, leukocyte infiltration, a decreased number of developing follicles in ovaries (Fig. 2D). Renal glomeruli and tubules were significantly swollen with



ніж у контрольній групі та у тварин із запаленням без лікування. Вагітність після лікування також наставала пізніше, кількість плодів значуще зменшувалася (табл. 2).

У хібнооперованих тварин (група 3) після закінчення експерименту під час аутопсії виявлено поодинокі спайки I–II ступенів, у мишей групи 2 (запалення без лікування) спайки спостерігали практично в усіх випадках, у тварин групи 1 (запалення та введення КЕП) спайковий процес прогресував (рис. 2, В) з включенням у конгломерат яєчників та матки (табл. 3). У трьох тварин відмічали міжпетлеві абсцеси. Гістологічне дослідження органів у тварин із абсцесами показало наявність септичних явищ. Так, у матці спостерігали різку атрофію, зближення клітин, зморщення сполучної тканини, гіперхромні ядра, звуження судин, лейкоцитарну інфільтрацію (рис. 2, С), у яєчниках – атрофічні явища, лейкоцитарну інфільтрацію, зменшення кількості фолікулів, які розвиваються (рис. 2, D). Клубочки та каналця нирок були значно набряклими, з крововиливами у тканину (рис. 2, Е), у селезінці відзначалося значне збільшення площі білої пульпи (рис. 2, F). Ці зміни характерні для септичного процесу, який моделюється методом перев'язки та пункції, та підтверджують вплив даної моделі на репродуктивні органи.

**Таблиця 2.** Репродуктивні показники у досліджуваних групах при моделюванні інфекційного процесу

**Table 2.** Reproductive indices in the studied groups under infectious process simulation

Група тварин Group of animals	Кількість тварин, які завагітніли, % Number of animals, which became pregnant, %	Час від спарювання до пологів, доби Time from coupling to labour, days	Кількість плодів Number of fetuses	Середня маса плодів, г Average fetal weight, g
Запалення + КЕП Inflammation + CPEs	40,0*	62,3 ± 5,4*.*	5,0 ± 0,2*.*	1,2 ± 0,2
Запалення Inflammation	80,0	25,4 ± 2,2	6,1 ± 0,3*	1,3 ± 0,5
Контроль (хібнооперовані) Control (sham- operated)	90,0	26,4 ± 2,1	7,9 ± 0,4	1,1 ± 0,2

**Примітка:** \* – різниця статистично значуща порівняно з хібнооперованими тваринами, (контроль),  $p < 0,05$ ; # – різниця статистично значуща порівняно з групою тварин із запаленням та без введення КЕП,  $p < 0,05$ .

**Note:** \* – difference is statistically significant as compared to sham-operated animals, (control),  $p < 0,05$ ; # – difference is statistically significant as compared to the group of animals with inflammation and without CPEs,  $p < 0,05$ .

**Таблиця 1.** Вплив КЕП на репродуктивні показники

**Table 1.** CPEs effect on reproductive indices

Група тварин Group of animals	Час від спарювання до пологів, доби Time from coupling to labour, days	Кількість плодів Number of fetuses	Середня маса плодів, г Average fetal weight, g
Введення КЕП CPEs administration	38,2 ± 3,5*	8,1 ± 1,4	1,3 ± 0,2
Інтактна (контроль) Intact (control)	25,3 ± 1,2	6,2 ± 1,1	1,1 ± 0,1

**Примітка:** \* – різниця статистично значуща порівняно з інтактними тваринами,  $p < 0,05$ .

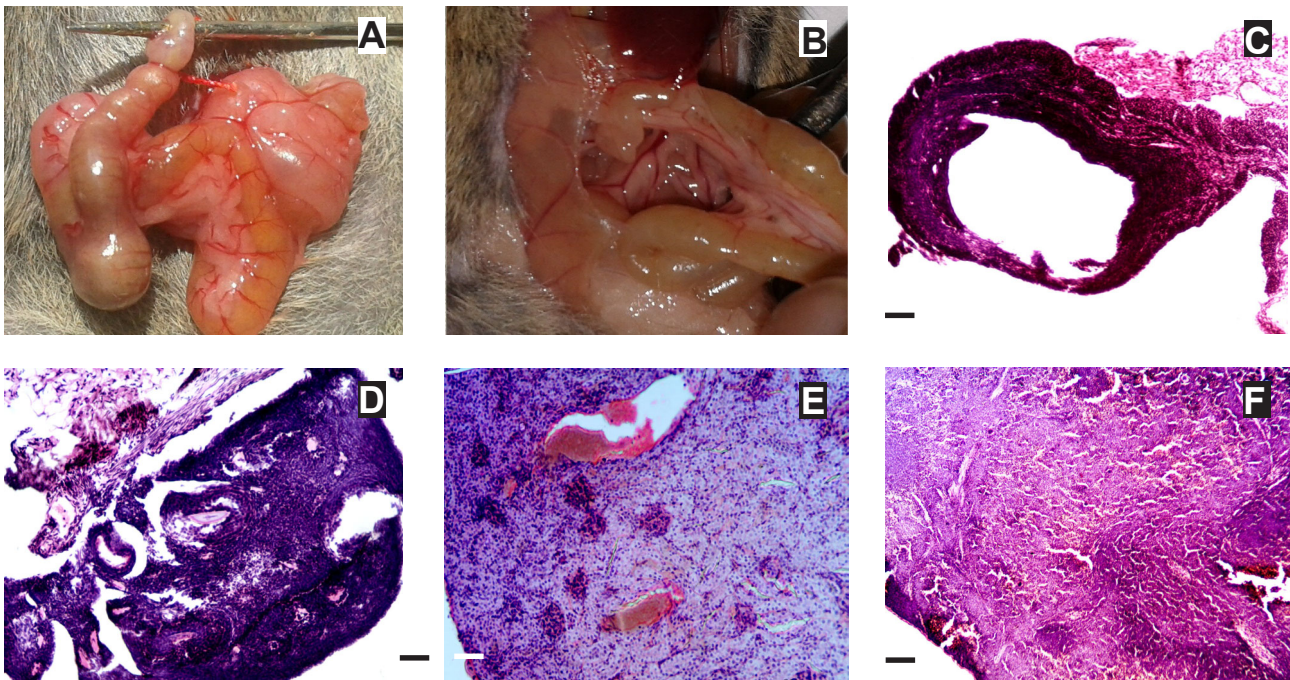
**Note:** \* – difference is statistically significant as compared to the intact animals,  $p < 0,05$ .

bleeding into the tissue (Fig. 2E), a significantly increased area of white pulp was noted in spleen (Fig. 2F). These typical changes of septic process, being simulated via ligation and puncture, confirm the effect of this model on reproductive organs.

The rearrangement of immune response by Th2-type, being more tolerogenic variant, occurs during pregnancy [20], as well as possible aggravation of chronic infectious diseases. A similar immunosuppressive effect is inherent to placenta-derived stem cells [6]. These data explain the aggravation and prolongation of infectious process in animals with CPEs. Thus, we believe that the presence of untreated infectious process in the body may be a contraindication for placental material application.

Comparing the groups of animals with APS in group 1 mice (untreated) revealed an increased blood coagulation rate, thrombocytopenia and increased indices of lymphocyte blast transformation test both to week 1 and 3 after simulation (Table 4). The CPEs application (group 2) enabled reducing blood coagulation rate and lymphocyte blast transformation test to the level of intact animals (group 3), here-with the thrombocytopenia was kept, but a number of platelets was significantly higher than in group 1 animals. A sharp hypertrophy of uterus in animals of group 2, and some ovarian





**Рис. 2.** Структура органів мишей з інфекційним процесом після лікування КЕП: **А** – моделювання інфекційного процесу шляхом перев'язки та пункції; **В** – спайки між кишківником, черевною стінкою та печінкою; **С** – матка; **Д** – яєчник; **Е** – нирка; **Ф** – селезінка. **А, В** – макрофотографії; **С–Ф** – забарвлення гематоксиліном та еозином. Масштабна лінійка 100 мкм.

**Fig. 2.** Structure of murine organs with infectious process post therapy with CPEs: **A** – simulation of infectious process via ligation and puncture; **B** – adhesions between intestine, abdominal wall and liver; **C** – uterus; **D** – ovary; **E** – kidney; **F** – spleen. **A, B** are macrophotos; **C–F** – H&E staining. Scale bar 100  $\mu$ m.

Під час вагітності спостерігається перебудова імунної відповіді за Th2-типом, тобто за більш толерогенним варіантом [20], можливе загострення хронічних інфекційних захворювань. Подібний імуносупресивний ефект мають стовбурові клітини, виделені з плацентарного матеріалу [12]. Ці дані пояснюють механізм загострення та пролонгування інфекційного процесу у тварин із введенням КЕП. Таким чином, наявність несанованого інфекційного

hypertrophy as well was noted in histological examination of reproductive organs (Fig. 3).

Assessing reproductive parameters in group 1 animals revealed a significant decrease in weight and number of fetuses, an increased number of resorptions and dead fetuses, herewith the placental mass was not changed significantly. After applying CPEs (group 2) in animals with APS we managed to achieve a significant increase in a number of live fetuses. Virtually no resorption was observed, nevertheless there were the females with dead fetuses, and fetal weight remained low (Table 5). This testifies to the fact, that the patients with APS during pregnancy should receive an anticoagulant therapy, since the preconception preparation occurs to be insufficient to overcome autoimmune response [19]. The results of examination of dead fetus placentas and resorption sites showed thromboses, *i. e.* indicating a typical death of fetuses of APS animals due to coagulopathy and thrombus formation in placental pool.

**Таблиця 3.** Ступінь спайкового процесу в досліджуваних групах при моделюванні інфекційного процесу, %

**Table 3.** Degree of adhesive process in the studied groups under infectious process simulation, %

Група тварин Group of animals	I (поодинокі спайки) I (single adhesions)	II (спайки біля матки та яєчників) II (adhesions near uterus and ovaries)	III (спайки з кишківником) III (adhesions with intestine)	IV (конгломерат у черевній порожнині) IV (conglomerate in abdominal cavity)
Запалення + КЕП Inflammation + CPEs	0	60	10	30
Запалення Inflammation	20	50	20	0
Хібнооперовані Sham-operated	20	20	0	0



процесу в організмі, на наш погляд, може бути протипоказанням до застосування плацентарного матеріалу.

На першому та третьому тижнях після моделювання АФС у мишей групи 1 (без лікування) виявлено збільшення швидкості згортання крові, тромбоцитопенію та підвищення показників реакції бласттрансформації лімфоцитів (табл. 4). Застосування КЕП (група 2) дозволило знизити швидкість згортання крові та реакцію бласттрансформації лімфоцитів до рівня тварин групи 3. При цьому тромбопенія залишалася, але кількість тромбоцитів була значно вищою, ніж у тварин групи 1. При гістологічному дослідженні репродуктивних органів у тварин групи 2 відмічали різку гіпертрофію матки та незначну гіпертрофію яєчників (рис. 3).

Під час дослідження репродуктивних показників виявлено, що у тварин групи 1 значно зменшені маса та кількість плодів, збільшена кількість резорбцій і мертвих плодів, маса плаценти вірогідно не змінювалася. Після застосування КЕП (група 1) у тварин із АФС вдалося досягти значного підвищення кількості живих плодів, практично не відмічалася резорбцій, але залишалися самиці з мертвими плодами, маса яких була зниженою (табл. 5). Це свідчить про те, що пацієнткам, які під час вагітності мають АФС, необхідно проводити антикоагулянтну терапію, оскільки предгравідарної підготовки не вистачає для подолання аутоімунної відповіді [6]. Під час дослідження плацент загиблих плодів та місць резорбції виявлено тромбози, що вказує на типову загибель плодів тварин із АФС від коагулопатії та тромбоформування у плацентарному басейні.

After simulating POS in the group 1 rats we observed a sharp increase in ovaries size, the mass coefficient of which almost twice exceeded the normal values due to the cysts (Table 6). In 50% of animals an estral type of vaginal smear was found during a month. During further observation, no animal became pregnant. Histological examination of reproductive system demonstrated the presence of cystic changes in ovaries (Fig. 4A), slightly reduced uterus, without thinning of its layers (Fig. 4C), and the uterine coefficient was almost unchanged. In the animals treated with CPEs (group 1), the regular changes in estral cycle were recorded in a month, 40% of animals became pregnant, but the time to delivery was significantly longer than in group 3 females (intact rats), and the number of fetuses was lower. The results of morphological analysis of reproductive organs showed a slightly increased uterus (Fig. 4D), but the mass coefficients did not differ from the control group, there were observed single cysts in ovaries (Fig. 4B), the mass coefficients of which approached the norm (Table 6).

Thus, the CPEs application occurred to be efficient in POS therapy. In this case the pathology is simulated by blocking progesterone receptors of uterus and ovaries by Mifepristonim. The CPEs effect may be caused by a trophic effect on reproductive system, receptor recovery, as well as the central mechanism of action.

Hemorrhages in ovaries and uterus, which reached the sizes of 10–15 mm (Fig. 5A) were observed in animals during ovarian torsion simulation at the moment of repeated laparotomy. Histological study demonstrated the massive hemorrhages in parenchyma, follicles,

**Таблиця 4.** Показники згортання крові, кількості тромбоцитів та реакції бласттрансформації лімфоцитів у експериментальних тварин ( $M \pm m$ )

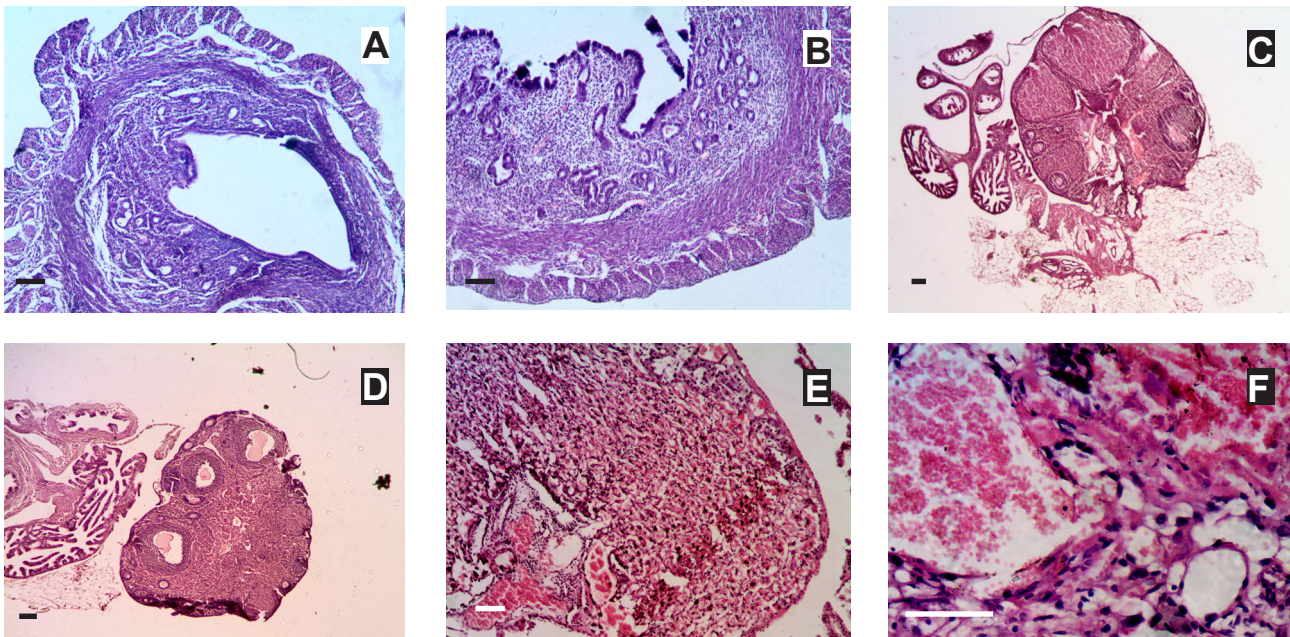
**Table 4.** Indices of blood coagulation, platelet number and lymphocyte blast transformation test in experimental animals ( $M \pm m$ )

Група тварин Group of animals	Згортання крові за Моравіцем, хв Blood coagulation by Morawitz, min		Тромбоцити $\times 10^3/\text{мл}$ Platelets $\times 10^3/\text{ml}$		Реакція бласттрансформації лімфоцитів спонтанна, % Lymphocyte blast transformation test, spontaneous, %	
	1 тиждень 1 week	3 тижні 3 weeks	1 тиждень 1 week	3 тижні 3 weeks	1 тиждень 1 week	3 тижні 3 weeks
АФС APS	$3,4 \pm 0,6^*$	$4,1 \pm 0,7^*$	$91,9 \pm 19,6^*$	$86,5 \pm 13,7^*$	$20,1 \pm 0,9^*$	$15,3 \pm 1,2^*$
АФС + КЕП APS + CPEs	$5,7 \pm 0,8^*$	$5,9 \pm 0,9^{* \#}$	$185,2 \pm 19,3^{* \#}$	$168,2 \pm 17,0^{* \#}$	$10,2 \pm 0,7^*$	$7,2 \pm 1,1^*$
Інтактна Intact	$7,8 \pm 1,5$	$8,1 \pm 0,5$	$241,2 \pm 15,9$	$236,3 \pm 17,2$	$11,3 \pm 1,1$	$9,8 \pm 0,7$

**Примітка:** \* – різниця статистично значуща порівняно з інтактною групою (хибнооперовані тварини); # – різниця статистично значуща порівняно з групою АФС без введення КЕП;  $p < 0,05$ .

**Note:** \* – difference is statistically significant as compared to the intact animals (sham-operated); # – difference is statistically significant as compared to the group with APS without introduced CPEs;  $p < 0.05$ .





**Рис. 3.** Структура органів мишей із АФС: **А** – матка тварини з АФС; **В** – матка тварини з АФС та після лікування КЕП; **С** – яєчник тварини з АФС; **Д** – яєчник тварини з АФС та після лікування КЕП; **Е, F** – плацента загиблих плодів із крововиливами. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Масштабна лінійка 100 мкм.

**Fig. 3.** Structure of murine organs with APS: **A** – uterus of APS animals; **B** – uterus of animals with APS and after CPEs therapy; **C** – ovary of APS animals; **D** – ovary of animals with APS and after CPEs therapy; **E, F** – placenta of dead fetuses with hemorrhages. H&E staining. Scale bar 100 μm.

Після моделювання СПКЯ у щурів групи 2 спостерігали різке збільшення яєчників, масовий коефіцієнт яких майже удвічі перевищував нормальні показники за рахунок кіст (табл. 6). У 50% тварин протягом місяця реєстрували естральний тип вагінального мазка. При подальшому спостереженні жодна тварина не завагітніла. Гістологічне дослідження статевої системи показало наявність кістозних змін у яєчниках (рис. 4, А), зменшення розмірів матки без стоншення її шарів (рис. 4, С), матковий коефіцієнт майже не змінювався. У тварин, яким проводили терапію КЕП (група 1), через місяць реєстрували регулярні зміни естрального циклу, 40% тварин завагітніло, але час до пологів був значно довший, ніж у самоць групи 3 (інтактні щури), а кількість плодів – меншою. Результати морфологічного аналізу репродуктивних органів показали дещо збільшений розмір матки (рис. 4, D), при цьому масові коефіцієнти не відрізнялися від контрольної групи. Спостерігали поодинокі кісти у яєчниках (рис. 4, В), масові коефіцієнти яких наближалися до норми (табл. 6).

yellow bodies and ovarian gates (Fig. 5B). Hemorrhages in the inner layers: closer to endometrium were observed in uterus (Fig. 5C). During re-examination at the end of the experiment, the ovaries (Fig. 5D) and uterus had no signs of hemorrhages.

**Таблиця 5.** Показники репродуктивної функції у експериментальних тварин із АФС ( $M \pm m$ )

**Table 5.** Indices of reproductive function in experimental animals with APS ( $M \pm m$ )

Показники Indices	Група тварин Group of animals		
	АФС + КЕП APS + CPEs	АФС APS	Інтактна Intact
Кількість плодів Number of fetuses	6,8 ± 0,5	5,2 ± 0,3*	8,3 ± 0,7
Тварини з резорбцією, % Animals with resorption, %	0	50*	0
Тварини з мертвими плодами, % Animals with dead fetuses, %	40*	20*	0
Середня маса плода, г Average fetal weight, g	0,7* ± 0,05	0,7* ± 0,04	1,06 ± 0,03
Середня маса плаценти, г Average placental weight, g	0,19 ± 0,003	0,18 ± 0,007	0,22 ± 0,02

**Примітка:** \* – різниця статистично значуща порівняно з інтактними тваринами,  $p < 0,05$ .

**Note:** \* – difference is statistically significant as compared to the intact animals,  $p < 0.05$ .



Таблиця 6. Репродуктивні показники тварин із моделлю СПКЯ

Table 6. Reproductive indices of animals with POS model

Група тварин Group of animals	Масовий коефіцієнт яєчників Mass coefficient of ovaries	Масовий коефіцієнт матки Mass coefficient of uterus	Регулярний цикл через місяць, % Regular cycle in a month, %	Кількість вагітних тварин, % Number of pregnant animals, %	Час до пологів, доба Time before labour, day	Кількість плодів, шт. Number of fetuses, pieces
СПКЯ + КЕП POS + CPEs	0,045	0,28	90	40*	32	3,2
СПКЯ POS	0,078*	0,24	50	-	-	-
Інтактні тварини Intact animals	0,042	0,23	100	90	25	7,2

Примітка: \* – різниця статистично значуща порівняно з інтактними тваринами,  $p < 0,05$ .

Note: \* – difference is statistically significant as compared to the intact animals,  $p < 0.05$ .

Таким чином, застосування КЕП є ефективним при лікуванні СПКЯ. У даному випадку патологія моделюється блокуванням прогестеронових рецепторів матки та яєчників міфепростоном. Дія КЕП може бути обумовлена трофічним впливом на репродуктивну систему, відновленням рецепторів, а також центральним механізмом впливу.

Autopsy examination of group 2 animals revealed the reduction in yellow bodies number, lower number of implantation sites and viable fetuses (Table 7). An average placental and fetal weight almost did not differ from the control indices. Adhesions were rare.

In females of group 1 (CPEs therapy) the number of yellow bodies, live fetuses, implantation sites, as well

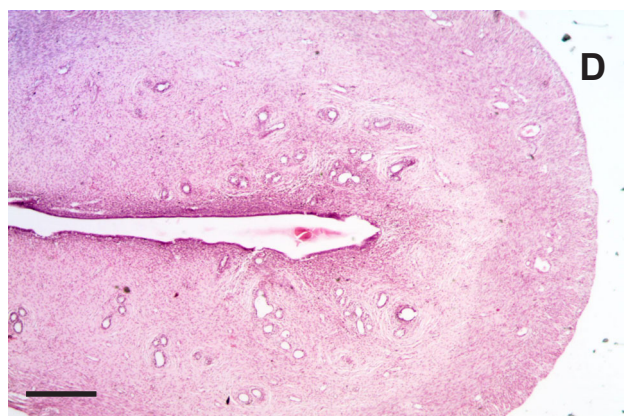
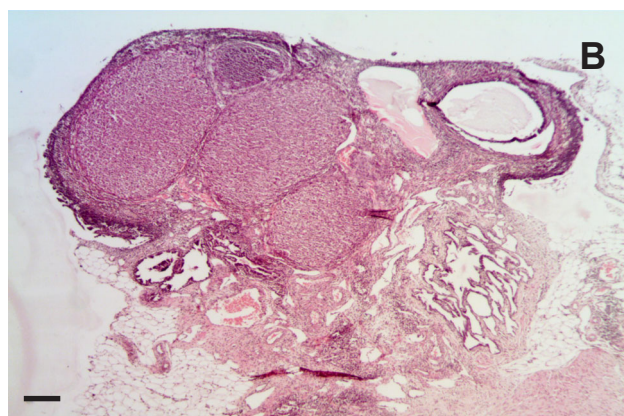
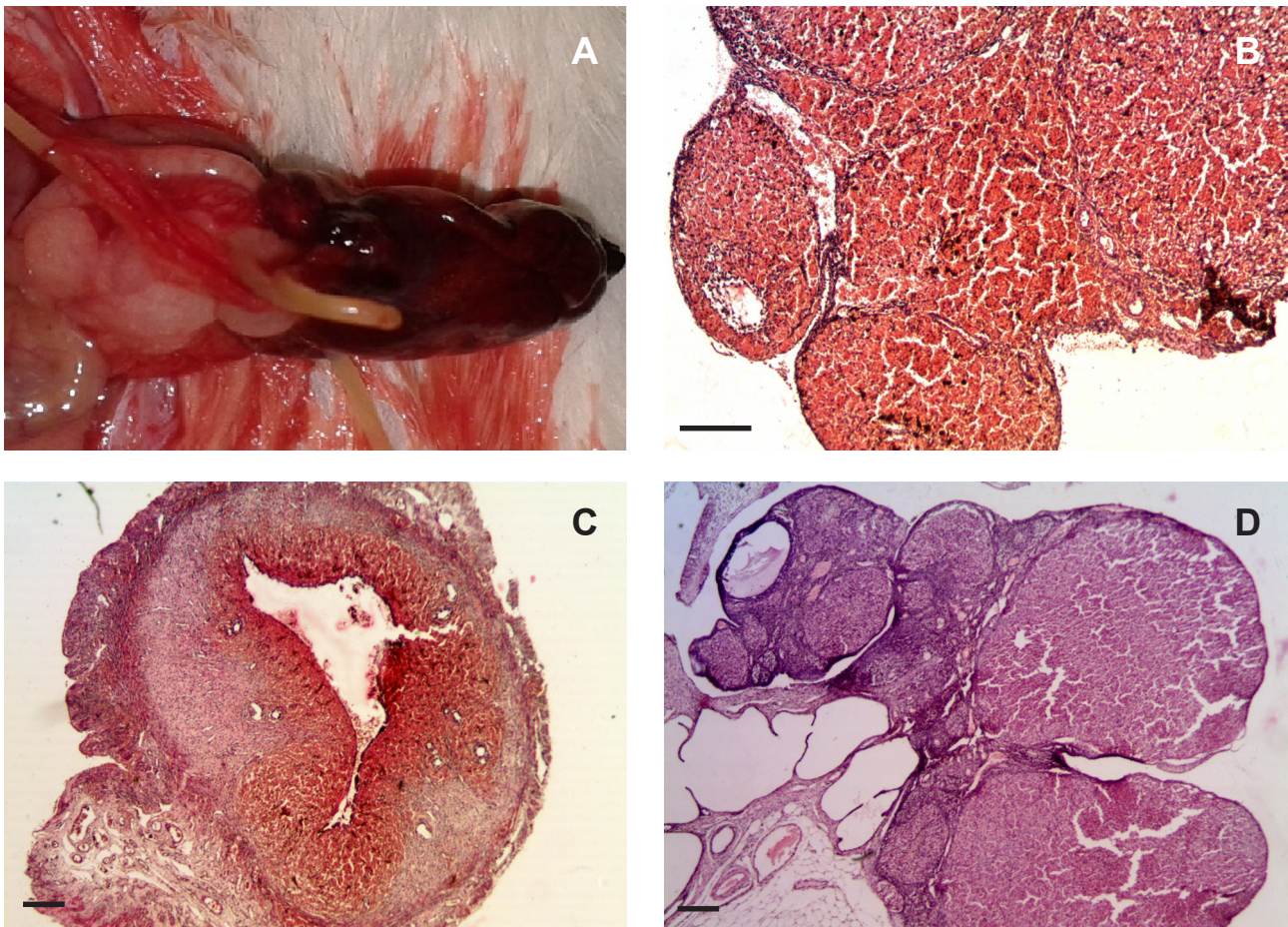


Рис. 4. Структура органів щурів із СПКЯ: **A** – яєчник тварин із СПКЯ без лікування; **B** – яєчник тварин із СПКЯ та лікуванням КЕП; **C** – матка тварин із СПКЯ без лікування; **D** – матка тварин із СПКЯ та введення КЕП. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Масштабна лінійка 100 мкм.

Fig. 4. Organ structure of rats with POS: **A** – ovary of POS animals without therapy; **B** – ovary of POS animals with CPEs therapy; **C** – uterus of POS animals without therapy; **D** is uterus of POS animals with introduced CPEs. H&E stain. Scale bar 100  $\mu$ m.





**Рис. 5.** Структура органів щурів із перекутом яєчників: **A** – яєчник із перекутом; **B** – яєчник із перекутом (тотальний крововилив); **C** – матка із перекутом яєчників; **D** – яєчник із перекутом наприкінці експерименту (мимовільний регрес). Крововиливи показано стрілками. **B–D** – забарвлення гематоксилином та еозином; масштабна лінійка 200 мкм.

**Fig. 5.** Structure of rat organs with ovarian torsion: **A** – ovary with torsion; **B** – ovary with torsion (total hemorrhage); **C** – uterus of animals with ovarian torsion; **D** – ovary with torsion at the end of experiment (involuntary regression). Hemorrhages are indicated by arrows. **B–D** – H&S staining; scale bar 200  $\mu$ m.

При моделюванні перекуту яєчників на момент повторної лапаротомії у тварин спостерігали крововиливи у яєчники та матку, які досягали розмірів 10–15 мм (рис. 5, A). При гістологічному дослідженні виявляли масивні крововиливи у паренхімі, фолікулах, жовтих тілах та воротах яєчника (рис. 5, B). У матці спостерігали крововиливи у внутрішніх шарах – ближче до ендометрію (рис. 5, C). Наприкінці повторного дослідження яєчники (рис. 5, D) та матка не мали ознак крововиливів.

Під час аутопсії було виявлено, що у тварин групи 2 на місці перекуту була різко зменшена кількість жовтих тіл, місць імплантації та живих плодів (табл. 7). Середня маса плаценти та плода майже не відрізнялася від контрольних показників. Спайки виявлялися рідко.

Показано, що у самоць групи 1 (лікування КЕП) кількість жовтих тіл, живих плодів, місць імплантації, а також маса плодів та плаценти не відрізнялися від групи 3 (хибнооперовані тварини). Спостерігали

as fetal and placental weight did not differ from group 3 (sham-operated animals). There was observed an increased number of adhesions in abdominal cavity as compared to sham-operated animals and those with ovarian torsion with no therapy (Table 7).

Thus, the CPEs use in animals with simulated ischemia in terms of ovarian torsion enables recovering the function of the organ, as evidenced by an increased number of yellow bodies and live fetuses, but contributes to increased adhesion formation.

As a result of studying the CPEs effect on reproductive system of experimental animals, their effect was revealed to have common features with MSCs [2, 8, 10, 16], on the one hand, and the similar ones with placental effect on female organism during pregnancy, on the other hand [1, 20]. Thus, a positive trophic effect on uterus and ovaries under normal conditions and ischemization was revealed, herewith the folliculogenesis was temporarily suppressed, that might be explained by human chorionic gonadotropin



збільшену кількість спайок у черевній порожнині порівняно із хібнооперованими тваринами та тваринами з перекрутом яєчників без лікування (табл. 7).

Таким чином, введення КЕП тваринам із моделлю ішемії на прикладі перекруту яєчників дозволяє відновити функцію останніх, про що свідчить збільшення кількості жовтих тіл та живих плодів, але викликає підвищене утворення спайок.

У результаті дослідження дії КЕП на статеву систему дослідних тварин було виявлено, що вплив КЕП, з одного боку, має спільні риси з дією МСК [3, 9, 15, 18], з іншого – з впливом плаценти на жіночий організм під час вагітності [8, 20]. Так, виявлено позитивний трофічний ефект на матку та яєчники у нормі й при ішемії, при цьому фолікулогенез тимчасово пригнічується, що можна пояснити дією хоріонічного гонадотропіну та статевих гормонів у комплексі з антиоксидантними та ростовими факторами [3, 8, 9, 15]. Подібна реакція спостерігається при застосуванні плацентарного матеріалу для лікування наслідків хіміотерапії [9]. Показано позитивну дію МСК та вагітності на перебіг аутоімунної патології [12, 20]. Відновлення фертильності при СПКЯ у моделі, викликаній блокуванням прогестеронових рецепторів та порушенням регуляції, може бути пов'язане як із центральними механізмами, через дію гонадотропінів та естрогенів, так і з відновленням після прямого впливу на яєчники та матку. Крім того, для СПКЯ описано роль оксидативного стресу та хронічного запалення в патогенезі [14], які можуть невілюватися застосуванням похідних плаценти [3, 5, 18]. Після введення КЕП відбувалася активація інфекційного процесу, що можна пояснити загальним імуносупресивним впливом плаценти, який спостерігається під час вагітності [20]. Інтенсивність спайкоутворення в моделях інфекційного процесу та перекруту, при якому відбувається асептичне запалення, можна пояснити активацією не тільки інфекційного процесу, а й проліферативної фази запалення, що має негативні наслідки [2].

Результати проведеного дослідження з урахуванням літературних даних дозволяє характеризувати КЕП та, можливо, інші плацентарні біооб'єк-

Таблиця 7. Репродуктивні показники тварин із моделлю СПКЯ

Table 7. Reproductive indices of animals with POS model

Група тварин Animal group	Кількість жовтих тіл Number of yellow bodies	Кількість місць імплантації Number of implantation sites	Кількість плодів Number of fetuses	Середня маса плода, г Average fetal weight, g	Середня маса плаценти, г Average placental weight, g	Кількість тварин зі спайками, % Number of animals with adhesions, %
Перекрут яєчників та введення КЕП Ovarian torsion and CPEs introduction	6,2 ± 0,5	5,1 ± 0,5	4,8 ± 0,8	2,3 ± 0,3	0,7 ± 0,06	60*
Перекрут яєчників Ovarian torsion	3,5 ± 0,2*	3,3 ± 0,3*	3,5 ± 0,2*	2,2 ± 0,5	0,8 ± 0,09	20
Хібнооперовані тварини Sham-operated animals	7,5 ± 0,6	6,9 ± 0,7	6,2 ± 0,6	2,3 ± 0,8	0,7 ± 0,1	20

Примітка: \* – різниця статистично значуща порівняно з тваринами групи 3,  $p < 0,05$ .

Note: \* – difference is statistically significant as compared to sham-operated animals,  $p < 0.05$ .

and sex hormones effect combined with antioxidants and growth factors [1, 2, 8, 10]. A similar response is observed when applying placental material to treat chemotherapy effects [2]. There was demonstrated a positive effect on autoimmune pathology course, being characteristic of both MSCs and proceeding of these processes during pregnancy [6, 20]. The restoration of fertility in POS in the model caused by blocking progesterone receptors and regulation disorder may be associated with both central mechanism via gonadotropins and estrogens effect, and recovery after a direct effect on ovaries and uterus. For POS there was also described the role of oxidative stress and chronic inflammation in pathogenesis [9], which might be inhibited by use of placental derivatives [8, 11, 16]. At the same time, following application of CPEs we observed the strengthening of infectious process, which was explained by general immunosuppressive effect of placenta, observed during pregnancy [19]. An increased adhesion formation in the models of infection process and torsion, where an aseptic inflammation occurs, may be explained not only by activation of infection process, but particularly a proliferative phase of inflammation, which has negative effect [5].

Our findings together with the previously reported data enable characterising the CPEs and possibly other placental bioobjects as a promising product for using in therapy or rehabilitation of pathological states of female reproductive system, which pathogenesis is associated with endocrinopathy, autoimmune processes, ovarian failure and ischemia. The presence of acute infectious or aseptic inflammation in abdominal cavity is a contraindication for CPEs use.



ти як перспективні у лікуванні (реабілітації) патологічних станів жіночої статеві системи, в патогенезі яких є ендокринопатія, аутоімунний компонент, яєчниковна недостатність, ішемія. Наявність гострого інфекційного або асептичного запалення в черевній порожнині вважається протипоказанням для застосування КЕП.

### Висновки

У результаті проведених досліджень щодо впливу КЕП на жіночу репродуктивну систему в нормі та при патологічних станах можна зробити наступні висновки.

1. Гуморальні фактори, які виділяються після введення кріоконсервованих експлантів плаценти людини мишам-самицям, мають позитивний трофічний вплив на матку та яєчники. При цьому повноцінний фолікулогенез та овуляція тимчасово пригнічуються, що можна пояснити дією хоріонічного гонадотропіну.

2. Кріоконсервовані експланти плаценти людини позитивно впливають на саногенез при патологічних станах, пов'язаних із аутоімунними процесами, ендокринопатією (зокрема, СПКЯ, пов'язаним із гіперестрогенією) та яєчникомовою недостатністю.

3. Кріоконсервовані експланти плаценти негативно впливають на перебіг інфекційного процесу: підвищують ризик формування спайок, підсилюють запалення у малому тазу. При цьому можлива активація інфекційного процесу або формування трубно-оваріального безпліддя.

### Література

1. Доклінічні дослідження лікарських засобів: Метод. рекомендації / За ред. О.В. Стефанова. – К.: Авіцена, 2001. – 528 с.
2. Кулаков В.И., Адамян Л.В., Мынбаев О.А. Послеоперационные спайки: этиология, патогенез, профилактика. – М.: Медицина, 1998. – 526 с.
3. Насадюк К.М. Клеточные технологии в репродуктологии, акушерстве и гинекологии // Клітинна та органна трансплантологія. – 2013. – Т. 1, №1. – С. 56–60.
4. Прокопюк В.Ю., Прокопюк О.С., Мусатова И.Б. и др. Оценка сохранности эксплантов плаценты и плодных оболочек после криоконсервирования // Клітинна та органна трансплантологія. – 2015. – Т. 3, №1. – С. 28–33.
5. Прокопюк О.С., Прокопюк В.Ю., Пасієшвілі Н.М. та ін. Імплантація кріоконсервованих фрагментів плаценти людини відновлює прооксидантно-антиоксидантний баланс у експериментальних тварин пізнього онтогенезу // Проблеми криобіології і криомедицини. – 2017. – Т. 27, №1. – С. 61–70.
6. Трифонов В.Ю., Прокопюк В.Ю., Зайченко А.В. Криоконсервованная сыворотка кордовой крови в восстановлении репродуктивной функции при антифосфолипидном синдроме // Проблемы криобіології. – 2011. – Т. 21, №1. – С. 75–84.
7. Шевченко Н.О., Сомова К.В., Волина В.В. та ін. Динаміка активності та тривалості функціонування кріоконсервованих кріоекстракту, клітин та фрагментів плаценти в орга-

### Conclusions

Our findings on CPEs effect on female reproductive system under normal and pathological conditions enable concluding as follows.

1. The humoral factors, released after administering human cryopreserved placenta explants to female mice had a positive trophic effect on uterus and ovaries. Herewith a complete folliculogenesis and ovulation were temporarily suppressed, which might be explained by chorionic gonadotropin effect.

2. Human cryopreserved placental explants positively affected the sanogenesis in pathological states associated with autoimmune processes, endocrinopathy (in particular, hyperestrogeny-associated POS) and ovarian failure.

3. Cryopreserved placental explants negatively affected the course of infectious process, by increasing the risk of adhesion formation, strengthening the inflammation in small pelvis, herewith the activation of infectious process or formation of tubo-ovarian infertility were possible.

### References

1. Cole L.A. Biological functions of hCG and hCG-related molecules. *Reprod Biol Endocrinol* 2010; 8: 102.
2. Guan-Yu X., I-Hsuan L., Chun-Chun C. et al. Amniotic fluid stem cells prevent follicle atresia and rescue fertility of mice with premature ovarian failure induced by chemotherapy. *PLoS One* 2014; 9(9): e106538.
3. Han N.R., Park C.L., Kim N.R. et al. Protective effect of porcine placenta in a menopausal ovariectomized mouse. *Reproduction* 2015; 150(3): 173–181.
4. Hanson B., Johnstone E., Dorais J. et al. Female infertility, infertility-associated diagnoses, and comorbidities: a review. *J Assist Reprod Genet* 2016; 34(2): 167–177.
5. Kulakov V.I., Adamyan L.V., Mynbayev O.A. Postoperative adhesions: etiology, pathogenesis, prevention. Moscow: Meditsina; 1998.
6. Lee J.M., Jung J., Lee H.J. et al. Comparison of immunomodulatory effects of placenta mesenchymal stem cells with bone marrow and adipose mesenchymal stem cells. *Int Immunopharmacol* 2012; 13(2): 219–224.
7. Lee Y.K., Chung H.H., Kang S.B. et al. Efficacy and safety of human placenta extract in alleviating climacteric symptoms: prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Obstet Gynaecol Res* 2009; 35(6): 1096–1101.
8. Nasadyuk K.M. Cell technologies in reproductive, obstetrics and gynecology. *Cell and Organ Transplantation* 2013; 1(1): 61–65.
9. Pandey V., Singh A., Singh A. et al. Role of oxidative stress and low-grade inflammation in letrozole-induced polycystic ovary syndrome in the rat. *Reprod Biol* 2016; 16(1): 70–77.
10. 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.
11. Prokopyuk O.S., Prokopyuk V.Yu., Pasiesshvilii N.M. et al. Implantation of cryopreserved human placental fragments restores pro-oxidant-antioxidant balance in experimental animals of late ontogeny. *Probl Cryobiol Cryomed* 2017; 27(1): 61–70.
12. Prokopyuk V.Yu., Prokopyuk O.S., Musatova I.B. et al. Safety of placental, umbilical cord and fetal membrane explants after



- нізмі експериментальних тварин // Морфологія. – 2016. – Т. 10, №2. – С. 93–98.
8. Cole L.A. Biological functions of hCG and hCG-related molecules // *Reprod Biol Endocrinol.* – 2010. – №8. – P. 102.
  9. Guan-Yu X., I-Hsuan L., Chun-Chun C. et al. Amniotic fluid stem cells prevent follicle atresia and rescue fertility of mice with premature ovarian failure induced by chemotherapy // *PLoS One.* – 2014. – Vol. 9, №9. – e106538.
  10. Han N.R., Park C.L., Kim N.R. et al. Protective effect of porcine placenta in a menopausal ovariectomized mouse // *Reproduction.* – 2015. – Vol. 150, №3. – P. 173–181.
  11. Hanson B., Johnstone E., Dorais J. et al. Female infertility, infertility-associated diagnoses, and comorbidities: a review // *J. Assist. Reprod. Genet.* – 2016. – Vol. 34, №2. – P. 167–177.
  12. Lee J.M., Jung J., Lee H.J. et al. Comparison of immunomodulatory effects of placenta mesenchymal stem cells with bone marrow and adipose mesenchymal stem cells // *Int. Immunopharmacol.* – 2012. – Vol. 13, № 2. – P. 219–224.
  13. Lee Y.K., Chung H.H., Kang S.B. et al. Efficacy and safety of human placenta extract in alleviating climacteric symptoms: prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled trial // *J. Obstet. Gynaecol. Res.* – 2009. – Vol. 35, №6. – P. 1096–1101.
  14. Pandey V., Singh A., Singh A. et al. Role of oxidative stress and low-grade inflammation in letrozole-induced polycystic ovary syndrome in the rat // *Reprod Biol.* – 2016. – Vol. 16, №1. – P. 70–77.
  15. Pipino C., Shangaris P., Resca E. et al. Placenta as a reservoir of stem cells: an underutilized resource? // *Br. Med. Bull.* – 2013. – Vol. 105. – P. 43–68.
  16. Rittirsch D., Huber-Lang M.S., Flierl M.A., Ward P.A. Immunodisign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture // *Nat. Protoc.* – 2009. – Vol. 4, №1. – P. 31–36.
  17. Ruiz A., Aguilar R., Tebar M. et al. RU486-treated rats show endocrine and morphological responses to therapies analogous to responses of women with polycystic ovary syndrome treated with similar therapies // *Biol. Reprod.* – 1996. – Vol. 55, №6. – P. 1284–1291.
  18. 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. – P. 162.
  19. Taskin O., Birincioglu M., Aydin A. et al. The effects of twisted ischaemic adnexa managed by detorsion on ovarian viability and histology: an ischaemia-reperfusion rodent model // *Hum. Reprod.* – 1998. – Vol. 13, №10. – P. 2823–2827.
  20. Veenstra van Nieuwenhoven A.L., Heineman M.J., Faas M.M. The immunology of successful pregnancy // *Hum. Reprod.* – 2003. – Vol. 9, №4. – P. 347–357.
  21. Velayuthaprabhu S., Archunan G., Balakrishnan K. Placental Thrombosis in Experimental Anticardiolipin Antibodies-Mediated Intrauterine Fetal Death // *Am. J. Reprod. Immunol.* – 2007. – Vol. 57, №4. – P. 270–276.
  22. World health statistics 2016: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals. ISBN 978 92 4 156526 4. – 136 p. [Electron resource]. – Access mode: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/206498/1/9789241565264\\_eng.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/206498/1/9789241565264_eng.pdf?ua=1) (May, 23, 2016).
  23. Zarinara A., Zeraati H., Kamali K. et al. Models predicting success of infertility treatment: a systematic review // *J. Reprod. Infertil.* – 2016. – Vol. 17, №2. – P. 68–81.
  - cryopreservation. *Cell and Organ Transplantology* 2015; 3(1): 34–38.
  13. Rittirsch D., Huber-Lang M.S., Flierl M.A., Ward P.A. Immunodisign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. *Nat Protoc* 2009; 4(1): 31–36.
  14. Ruiz A., Aguilar R., Tebar M. et al. RU486-treated rats show endocrine and morphological responses to therapies analogous to responses of women with polycystic ovary syndrome treated with similar therapies. *Biol Reprod* 1996; 55(6): 1284–1291.
  15. Schevchenko N.O., Somova K.V., Prokopyuk V.Yu. 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.
  16. 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.
  17. Stefanov O.V., editor. *Preclinical trials of medicines [guidelines]*. Kyiv: Avitsena; 2001.
  18. Taskin O, Birincioglu M, Aydin A. et al. The effects of twisted ischaemic adnexa managed by detorsion on ovarian viability and histology: an ischaemia-reperfusion rodent model. *Hum Reprod* 1998; 13(10): 2823–2827.
  19. Trifonov V.Y., Prokopyuk V.Y., Zaychenko A.V. Cryopreserved cord blood serum for reproductive function restoration during antiphospholipid syndrome. *Probl Cryobiol* 2011; 21(1), 75–84.
  20. Veenstra van Nieuwenhoven A.L., Heineman M.J., Faas M.M. The immunology of successful pregnancy. *Hum Reprod* 2003; 9(4): 347–57.
  21. Velayuthaprabhu S., Archunan G., Balakrishnan K. Placental thrombosis in experimental anticardiolipin antibodies-mediated intrauterine fetal death. *Am J Reprod Immunol* 2007; 57(4): 270–276.
  22. World health statistics 2016: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals. 136 p. [Electron resource]. Available from: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/206498/1/9789241565264\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/206498/1/9789241565264_eng.pdf) (May, 23, 2016).
  23. Zarinara A., Zeraati H., Kamali K. et al. Models predicting success of infertility treatment: a systematic review. *J Reprod Infertil* 2016; 17(2): 68–81.