

Н.О.Шевченко¹
К.В.Сомова²
В.В.Воліна¹
В.Ю.Прокопюк¹
О.С.Прокопюк¹

¹ Інститут проблем
кріобіології і кріомедицини
НАН України

² Харківський національний
університет ім. В.Н.Каразіна

Ключові слова: кріоекстракт
плаценти, клітини плаценти,
фрагменти плаценти, альфа-
фетопротеїн, хоріонічний
гонадотропін людини.

Надійшла: 13.04.2016

Прийнята: 27.05.2016

УДК 615.361.013.85.014.41:57.089.2

ДИНАМІКА АКТИВНОСТІ ТА ТРИВА- ЛОСТІ ФУНКЦІОНУВАННЯ КРІОКОН- СЕРВОВАНИХ КРІОЕКСТРАКТУ, КЛІ- ТИН ТА ФРАГМЕНТІВ ПЛАЦЕНТИ В ОРГАНІЗМІ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ТВАРИН

Реферат. Визначення секретії хоріонічного гонадотропіну і альфафетопротеїну проводили на 1, 2, 3, 7, 14, 21, 28, 60-ту добу після введення шурам кріоконсервованих екстракту, клітин і фрагментів плаценти; проводили гістологічне дослідження місця трансплантації кріоконсервованого фрагменту плаценти. Після введення кріоконсервованого екстракту плаценти досліджувані сполуки виявляються у максимальній концентрації у першу добу, тривалість їхнього визначення обмежується тижнем. Введення клітинних і тканинних структур плаценти приводить до більш плавного вивільнення досліджуваних речовин, тривалість їхнього виявлення в 4-9 разів довше. Результати дослідження структури імплантованих фрагментів плаценти і оточуючих тканин показали, що вони досить тривалий час (до 60 діб) визначаються в організмі експериментальних тварин, зберігаючи типове для плаценти ворсинчасту структуру.

Morphologia. – 2016. – Т. 10, № 2. – С. 93-98.

© Н.О.Шевченко, К.В.Сомова, В.В.Воліна, В.Ю.Прокопюк, О.С.Прокопюк, 2016

✉ cryo@online.kharkov.ua

Shevchenko N.O., Somova K.V., Volina V.V., Prokopiuk V.Yu., Prokopiuk O.S. Dynamics of activity and duration of functioning of cryopreserved cryoextract, placental cells and fragments in the organism of experimental animals.

ABSTRACT. Background. Due to the fact that the regenerative medicine has been actively developing, an actual task is to study the features of functioning of biological objects in a patient's body. **Objective.** The aim was to study the dynamics of human chorionic gonadotropin, alphafetoprotein secretion and biodegradation in an organism of experimental animals of cryopreserved cryoextract, suspension of cells and fragments of human placenta. **Methods.** After administering the cryopreserved extract, fragments and suspension of placental cells to experimental animals we determined the content of alphafetoprotein and human chorionic gonadotropin at days 1-3, 7, 14, 21, 28 and 60; the site of cryopreserved placental fragment transplantation was histologically examined. **Results.** After application of cryopreserved placental cryoextract, the test compounds were identified in the highest concentration on the first day, the period of complete elimination from the blood of animals was limited by a week. After application of cryopreserved placental cells and fragments a slow increase of the alphafetoprotein and human chorionic gonadotropin concentrations were observed. Maximal concentration was detected during the first week, a gradual decrease was observed to the 28th day in case of cells and 60 days – placental fragments. The results of histological study of implanted placental fragment and surrounding tissues showed preserved typical for placental villous structure; they have been determined in a body of experimental animals for a long time (up to 60 days) and. **Conclusion.** The acellular object (placental cryoextract) was demonstrated to cause a pronounced and maximum effect in the first day after administration, their impact on a body was limited by a week. The introduction of placental cellular and tissue structures results in a more gradual release of the studied substances, the duration of their identification is 4-9 times longer. Our findings are crucial in selecting the cryopreserved biological objects of placental origin depending on the disintegration degree when administering them in the certain clinical situation.

Key words: placental cryoextract, placental cells, placental fragments, alphafetoprotein, human chorionic gonadotropin.

Citation:

Shevchenko NO, Somova KV, Volina VV, Prokopiuk VYu, Prokopiuk OS. [Dynamics of activity and duration of functioning of cryopreserved cryoextract, placental cells and fragments in the organism of experimental animals]. *Morphologia*. 2016;10(2):93-8. Ukrainian.

Вступ

Плацента являє собою провізорний орган, який забезпечує ріст та розвиток плоду, його спі-

віснування з материнським організмом, а також їхню взаємну адаптацію [1; 2]. Вона містить високий рівень різних гормонів, мікроелементів,

вітамінів, цитокінів, ростових факторів, стовбурових клітин, за рахунок яких знаходить своє застосування у практичній та експериментальній медицині у вигляді екстрактів, суспензій клітин і фрагментів [3].

Розроблені методи кріоконсервування дають можливість одержувати кріоконсервовані біооб'єкти плацентарного походження з високим ступенем вітальності, дозволяють якісно перевірити матеріал, створити запаси матеріалу з різними характеристиками [4; 5]. У результаті експериментальних та доклінічних досліджень отримано позитивні результати застосування кріоконсервованих біооб'єктів плацентарного походження при корекції ряду патологічних станів, таких як трофічні розлади, яєчникова дисфункція, атеросклероз, цукровий діабет, клімактеричний синдром та інші [6–10].

Для вибору плацентарного біооб'єкту та визначення особливостей їхнього застосування за тієї чи іншої патології актуальним буде дослідження концентрації та тривалості виявлення плацентарних сполук у організмі реципієнта після введення кріоекстаркту, суспензії кріоконсервованих клітин та фрагментів плаценти в динаміці спостереження.

Метою даної роботи стало визначення динаміки виявлення в організмі експериментальних тварин альфафеторотейну, як маркера біодеградації та хоріонічного гонадотропіну людини, як маркера життєздатності при застосуванні кріоконсервованих кріоекстаркту, суспензії клітин і фрагментів плаценти людини. Для дослідження процесів біодеградації кріоконсервованого фрагменту плаценти в організмі реципієнта буде проведено гістологічне дослідження місця його введення.

Матеріали та методи дослідження

Об'єктами дослідження були кріоконсервовані кріоекстракт плаценти (КЕП), фрагменти плаценти (КФП) і суспензія мезенхімальних стромальних клітин плаценти (ККП), отримані з посліду породілей, які були проінформовані та надали письмові згоди на його використання з експериментальною метою.

КЕП отримували методом кріодеструкції-кріоекстракції за раніше розробленою нами методикою: три цикли заморожування-відігріву подрібненої плацентарної тканини у водно-сольовому розчині з наступним відокремленням детриту шляхом центрифугування, надосад розливали у стерильні контейнери та заморожували прямим зануренням у рідкий азот.

Суспензію клітин плаценти отримували методом, який передбачає дезагрегацію тканини трипсином. Клітини кріоконсервували із застосуванням 10%-го розчину диметилсульфоксиду («Sigma», Германия) за двоетапною програмою (1 град/хв до -70°C з наступним зануренням у рідкий азот) [4]. У роботі [11] представлено харак-

теристику клітин за маркерами стовбурових клітин та напрямком їхнього диференціювання за адипогенним, остеогенним та хондрогенним типами. Кількість клітин підраховували у гемоцетометрі. Життєздатність визначали методом проточної цитофлуориметрії на цитофлуориметрії «FACS Calibur» (Becton Dickinson, США) з забарвленням пропідіум йодидом.

З метою отримання фрагментів плацентарний матеріал розрізали на частки розміром $1,0 \times 0,5 \times 0,5$ см. Кріоконсервування фрагментів проводили у 10%-му розчині диметилсульфоксиду («Sigma», Германия) за двоетапною програмою [4].

Усі біооб'єкти кріоконсервували у стерильних поліпропіленових контейнерах («Nunc», Германия) на програмному заморозувачі «ЗП-10» (Україна), розморозували безпосередньо перед дослідженням шляхом відігрівання на водяній бані «ВБ-4» (Китай) при температурі $37 \dots 40^{\circ}\text{C}$.

Дослідження динаміки активності та тривалості функціонування кріоконсервованих біооб'єктів плацентарного походження проводили на 6-місячних щурах лінії Вістар масою 250 г.

Лабораторні тварини були розділені на шість груп. Тваринам 1-ї групи підшкірно імплантували КФП $m=0,3$ г ($n=12$); 2-ї групи – внутрішньом'язово вводили 0,5 мл ККП загальною кількістю 1 млн клітин ($n=12$); 3-ї групи – внутрішньом'язово вводили 0,5 мл КЕП ($n=12$). Контролем слугували тварини 4-ї групи, яким вводили 0,5 мл розчину 0,9% NaCl ($n=3$), 5-ї групи – хібнооперовані щури ($n=3$) та 6-ї групи – інтактні тварини ($n=3$). Додатково проводили імплантацію КФП для визначення стану фрагменту плаценти *in vivo* в динаміці ($n=15$). Розрахунок дози, яка вводилася експериментальним тваринам, проводили за Стефановим О.В. [11].

Динаміку вмісту біологічно активних сполук плаценти, а саме альфафетопроїну (АФП) і хоріонічного гонадотропіну людини (ХГЛ), в організмі експериментальних тварин досліджували методом твердофазного імуноферментного аналізу з реактивами фірми «Вектор-бест» (Росія) на планшетному спектрофотометрі «Stat Fax» (США) згідно з інструкцією виробника, на 1–3, 7, 14, 21, 28, 60-ту доби після введення кріоконсервованих біооб'єктів (забір крові проводили з хвостової вени). АФП та ХГЛ було обрано як маркерні речовини, тому що вони природно не містяться в організмі гризунів і спостерігаються тільки при введенні біооб'єктів, виділених з плаценти людини, як безклітинних (кріоекстракт) так і клітинно-тканних (суспензія клітин і фрагменти). При цьому ХГЛ синтезується клітинами плаценти та характеризує синтетичну активність, а АФП тільки поступово вивільняється та характеризує деградацію біооб'єктів, які досліджували.

У ці ж терміни спостереження проводили гі-

стологічне дослідження місця введення КФП, для оцінки стану імплантованої тканини та оточуючих тканин. З експерименту виводили по 3 тварини, гострим шляхом відокремлювали місце імплантації, яке фіксували у формаліні, промивали проточною водою, обезводнювали у спиртах зростаючої концентрації, висвітлювали у ксилолі та заливали у парафін для отримання гістологічних препаратів [12]. Гістологічні зрізи забарвлені гематоксилином і еозином досліджували методом мікроскопії за допомогою мікроскопа «XSP-139TP» (Японія) та програмного забезпечення TourView V 3.7.

Експерименти на лабораторних тваринах проводилися з дотриманням загальних Національних норм з біоетики (1-й Національний конгрес з біоетики, Київ, 2001) і положень «Європейської Конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1985), які були підтримані Комітетом з біоетики ІПКіК

НАН України.

Для отримання статистично вірогідних висновків застосовували критерій Мана-Уїтні. Для статистичних розрахунків та обробки даних використовували комп'ютерну програму Statgraphics V 2.1.

Результати та обговорення

Проведені дослідження показали, що після введення КЕП тваринам 3-ї групи вміст АФП і ХГЛ був максимальним у першу добу, після чого різко знижувався протягом 7-и діб і в подальшому ці сполуки не визначалися (рис. 1).

При імплантації фрагментів плаценти щурам 1-ї групи, спостерігали поступове підвищення концентрації ХГЛ і АФП, починаючи з 3–4 доби, до кінця тижня відзначали їхній максимум, після чого такий рівень цих сполук залишався стабільним протягом місяця потім поступово знижувався та до кінця другого місяця відповідав вихідним даним (рис. 1).

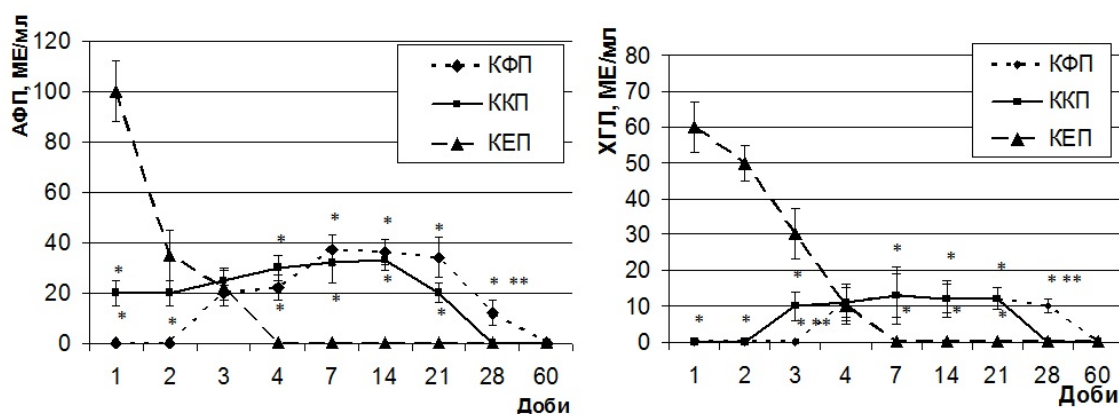


Рис. 1. Динаміка рівня АФП і ХГЛ у крові лабораторних тварин після введення кріоконсервованих біооб'єктів плацентарного походження, МОД/мл.

Примітки: * – вірогідно значуща різниця відносно КЕП ($p \leq 0,05$); ** – порівняно з ККП ($p \leq 0,05$).

При введенні ККП лабораторним тваринам 2-ї групи рівень АФП підвищувався вже з першої доби, ХГЛ ресструвався в крові на 3-ю добу, концентрації цих сполук наростали протягом тижня і залишалися на такому рівні до 30-ти діб, після чого практично одночасно знижувалися до вихідних даних (рис. 1). Таким чином, визначено, що після введення КФП і ККП кінетика коливань вмісту АФП і ХГЛ в організмі та їхня елімінація подібні.

У крові щурів усіх контрольних груп досліджуваних сполук плаценти виявлено не було.

Для визначення особливості функціонування кріоконсервованих фрагментів плаценти в організмі реципієнта важливо дослідити їхню структуру і оточуючі тканини для виявлення реакції організму на введення ксенотрансплантату. Суттєвим є дослідження означених змін у динаміці та проведення кореляції морфологічного стану фрагментів з коливанням рівнів біологічно

активних речовин плацентарного походження в системі *in vivo*.

Для імплантації використовували кріоконсервовані фрагменти плаценти, які зберегли свою структуру, що було доведено даними гістологічного дослідження (рис. 2).

Кріоконсервування фрагментів плаценти за даним методом дозволяє практично зберегти структуру та функцію клітин трофобласта при мінімізації міжклітинних взаємодій, що підтверджується їхніми культуральними властивостями (споживання глюкози в середовищі, активність ферментів, реакції відновлення формазану та резазурину) та вітальним забарвленням.

У першу добу після введення експериментальним тваринам під шкіру стегна КФП на гістологічних зрізах вони виглядали морфологічно збереженими. Серед термінальних ворсин плаценти виявлялися спеціалізовані форми з периферичним розташуванням капілярів і синцитіаль-

них вузлів. Однак щільність цих структур в ворсинах була меншою, ніж в інтактній тканині, спостерігалось збільшення кількості безсудин-

них ворсин і подекуди відшарування синцитіотрофобласту. Ворсини розташовувалися близько одна до одної (рис. 3, а).

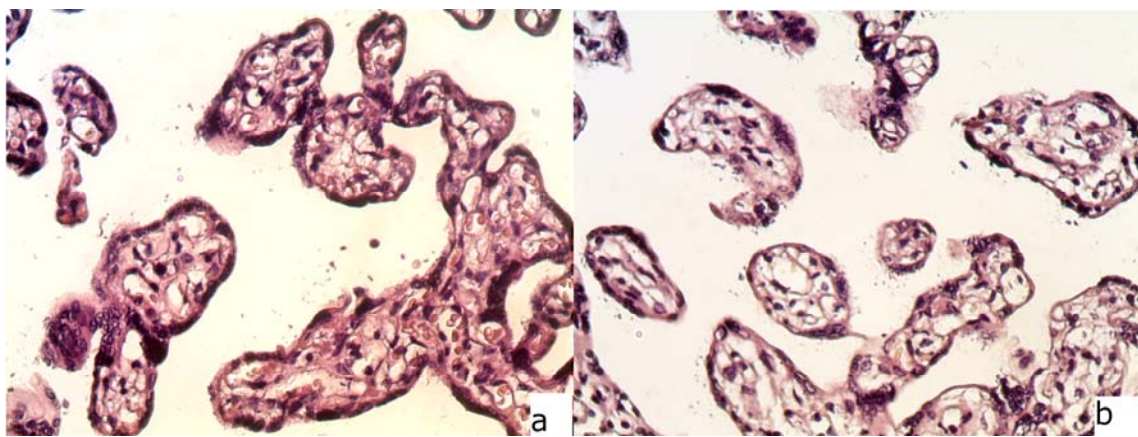


Рис. 2. Фрагмент плаценти людини: а – нативна тканина; б – кріоконсервована тканина. Забарвлення гематоксилином і еозином, $\times 400$.

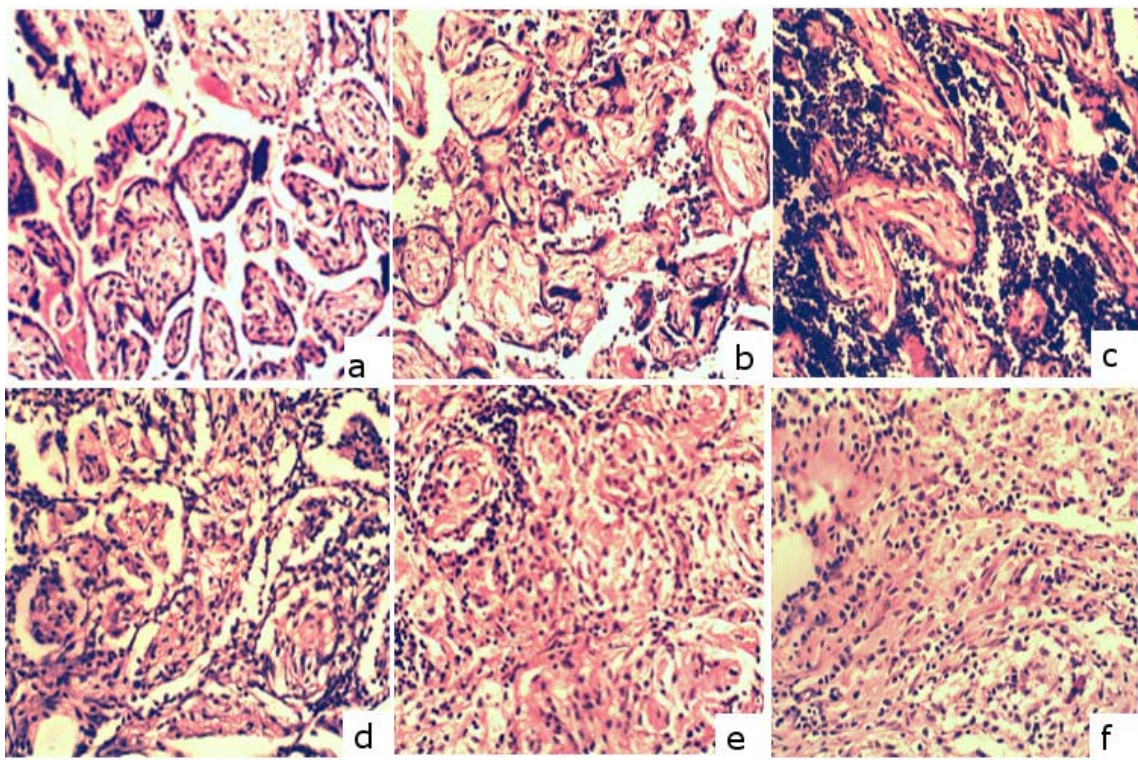


Рис. 3. Гістологічний аналіз місця імплантації кріоконсервованих фрагментів плаценти : а – на 1 добу, б – на 3 добу, с – на 7 добу, d – на 14 добу, e – на 28 добу, f – на 60 добу. Забарвлення гематоксилином і еозином, $\times 200$.

На 3-ю добу після введення у КФП візуалізувалося набухання стромы ворсин, місцями – дистрофічні процеси в трофобласті. При цьому синцитіальні вузли зберігалися. Спостерігалось нерівномірне розширення і звуження інтервільного простору. Були помітні ознаки асептичного запального процесу у вигляді помірної лейкоци-

тарної інфільтрації (рис. 3, б).

Через 7 діб після імплантації КФП між групами щільно прилеглих одна до одної термінальних ворсин і окремими термінальними ворсинами виявлялася макрофагально-лейкоцитарна інфільтрація, що зазвичай розвивається у відповідь на пошкодження тканини. При цьому у терміна-

льних ворсинах практично не визначалися плацентарні кровоносні судини, водночас спостерігався початок васкуляризації імплантованого КФП судинами реципієнта. Набухання строми ворсин було більш вираженим (рис. 3, с).

Через 14 діб реакція ложа імплантації визначалася у вигляді випотівання білкової рідини з судин (набряк), міграції лейкоцитів, формування грануляційного валу, продовження васкуляризації КФП *de novo* (рис. 3, d).

Молоді сполучнотканинні клітини різної величини і форми, які є нащадками місцевих клітин сполучної тканини, розташовувалися переважно навколо молодих судин. Серед цих клітин розрізнялися: дрібні круглі клітини, морфологічно подібні до лімфоцитів крові, макрофаги, великі лімфоїдні клітини зі світлим ядром і чітко помітним цитоплазматичним шаром, у якому знаходилися зерна, вакуолі, клітинний детрит (що вказувало на їх фагоцитарну діяльність), плазматичні клітини, фібробласти. Серед вищевказаних клітин у ранні періоди розвитку грануляційної тканини знаходилося багато поліморфноядерних лейкоцитів.

Взагалі проведення межі між запаленням і гранулюванням не завжди можливо, і розвиток грануляційної тканини іноді відбувається паралельно з запаленням, яке вважають грануляційною або репаративною складовою запалення. Підставою для цього є те, що запалення з самого початку протікає з більш-менш вираженими проліферативними явищами з боку сполучнотканинних елементів, що і спостерігалось в даному випадку. Таким чином, грануляційна тканина по суті являється відновною тканиною.

На 30-у добу у всіх тварин місце імплантації КФП являло собою структуру з осередками цитотрофобласта в молодій сполучній тканині, в якій клітини майже витіснили білкову рідину (рис. 3, e) при цьому зменшилась кількість лейкоцитів і зникли дрібні лімфоїдні клітини, а почали переважати більші пластинчасті клітинні елементи, які набували витягнутої форми і, розташовуючись один до одного, утворювали пучки колагенових волокон і виявляли властивості фібробластів. Капіляри були помірно повнокровні.

Через 60 діб після імплантації КФП (рис. 3, f) майже в усіх тварин на місці імплантата виявлялося зменшення кількості клітин і судин грануляційної тканини, з'являлися стійкі елементи сполучної тканини у вигляді колагенових волокон і нормально розвинені кровоносні судини, вздовж яких спостерігалися муфти з лімфоцитів і плазматичних клітин. При збільшенні кількості колагенових волокон грануляційна тканина поступово перетворювалась на зрілу волокнисту сполучну тканину. У розвитку стійких елементів сполучної тканини на місці імплантованого КФП брали участь усі клітини грануляційної тканини, за винятком лейкоцитів. Поряд з фібробластами

в розвитку сполучної тканини важливу роль відігравали лімфоїдні форми, які зазвичай позначаються як полібласти. Осередки трофобласта визначалися рідко, лише в окремих полях зору, в основній масі вони були заміщені сполучною тканиною.

Підсумок

Таким чином, результати морфологічного дослідження імплантованих КФП і місця їхнього введення корелюють з отриманими даними щодо динаміки циркуляції і виведення біологічно активних речовин плаценти (АФП, ХГЛ) та демонструють достатньо високу морфофункціональну збереженість КФП.

З усього вищезазначеного можна зробити наступні висновки. При застосуванні кріоконсервованого екстракту плаценти ХГЛ та АФП спостерігаються в організмі з першої доби у великій концентрації, яка різко знижується протягом 3-х діб. Введення кріоконсервованих фрагментів та суспензії клітин плаценти приводить до більш плавного вивільнення сполук, що досліджувалися, тривалість їхнього виявлення сягає 28-60 діб, що може пояснюватися функціонуванням в організмі збережених кріоконсервованих фрагментів і клітин плаценти. Результати дослідження структури імплантованих КФП і оточуючих тканин свідчать про те, що вони досить тривалий час (до 60 діб) виявляються в організмі експериментальних тварин.

Отримані дані мають значення при виборі кріоконсервованого біооб'єкта плацентарного походження при їхньому призначенні у кожній конкретній клінічній ситуації. Для досягнення швидкого, максимально можливого, короткочасного ефекту при стабільному гомеостазі, чи достатньому власному потенціалі відновлення його балансу – доцільно застосування КЕП. Відповідно, в ситуаціях, коли потрібна довготривала замісна і регуляторна дія біологічно активними сполуками плаценти, а також з метою запобігання різких коливань в системі гомеостазу препаратом вибору є клітинно-тканинні біооб'єкти. При цьому слід зазначити, що при застосуванні кріоконсервованих фрагментів плаценти ХГЛ та АФП виявляються в крові тварин довше, але при застосуванні суспензії кріоконсервованих клітин відсутня місцева реакція за рахунок можливості внутрішньовенного введення.

Можна припустити, що КЕП доцільно використовувати для лікування патологічних процесів з гострим перебігом, застосовуючи кілька введень, не частіше ніж один раз в тиждень. КФП та ККП доцільно використовувати при хронічній патології. Введення КФП доцільно не частіше одного разу в два місяці, ККП – не частіше одного разу в місяць.

Перспективами подальших досліджень є визначення впливу кріоконсервованих біооб'єктів плацентарного походження на перебіг

Літературні джерела References

1. Regnault T.R.H., Galan H.L., Parker T.A., Anthony R.V. Placental development in normal and compromised pregnancies – a review. *Placenta*. 2002;23 (Suppl A):119–129.
2. Pipino C.L., Shangaris P., Resca E., Zia S., Deprest J., Sebire N.J., David A.L., Guillot P.V., De Coppi P. Placenta as a reservoir of stem cells: an underutilized resource? *Br. Med. Bull.* 2013;105:43–68. doi: 10.1093/bmb/lds033.
3. Goltsev A.M., Yurchenko T.N. Placenta: kriokonservirovanie, klinicheskoe primenenie [Placenta: cryopreservation, structure, properties, perspectives for clinical application]. Kharkiv. 2013, 318 p. (Russian)
4. Prokopyuk VYu, Prokopyuk OS, Musatova IB, Shevchenko NA, Roenko AA, Terehova EA, Volina VV. Safety of placental, umbilical cord and fetal membrane explants after cryopreservation. *Cell and organ transplantology*. 2015;3(1): 34-38.
5. Grischenko VI, Prokopyuk OS, Volkova NA, Perchik OA. [Effect of Various Low Temperature Storage Regimens on Placenta Cryoextract Hormone Content]. *Problems of Cryobiology*. 2004;4:8–11. Russian.
6. Thirumala S, Goebel WS, Woods EJ. Clinical grade adult stem cell banking. *Organogenesis*. 2009;5(3):143–154.
7. Han NR, Park CL, Kim NR, Kim HY, Yoou MS, Nam SY, Moon PD, Jeong HJ, Kim HM. Protective effect of porcine placenta in a menopausal ovariectomized mouse. *Reproduction*. 2015;150(3):173–181.
8. Hong JW, Lee WJ, Hahn SB, Kim BJ, Lew DH. The effect of human placenta extract in a wound healing model. *Ann. Plast. Surg.* 2010;65(1):96–100.
9. Siok May Chua L, O'Connell J, Kang S. An open label prospective pilot study to evaluate the efficacy of cryopreserved amniotic tissue grafts for chronic nonhealing ulcers. *Wounds*. 2014;26(5):30–38.
10. Pogozhykh D, Prokopyuk V, Pogozhykh O, Mueller T, Prokopyuk O. Influence of Factors of Cryopreservation and Hypothermic Storage on Survival and Functional Parameters of Multipotent Stromal Cells of Placental Origin. *PLoS One*. 2015;2(10):1–16.
11. Stefanov OV. Doklinični doslidžennja likarskyx zasobiv: Metodyčni rekomendaciji [Preclinical studies of drugs: Guidelines]. K.: Avicena. 2001, 528 p. (Ukraine)
12. Merkulov GA. Course patohistolohycheskoy tehniky [The course of pathohistological techniques]. Leningrad: Medgiz; 1961. 343 p.

Шевченко Н.А., Сомова Е.В., Волина В.В., Прокопюк В.Ю., Прокопюк О.С. Динамика активности и длительности функционирования криоконсервированных криоэкстракта, клеток и фрагментов плаценты в организме экспериментальных животных.

Реферат. Определение секреции хорионического гонадотропина и альфафетопротеина проводили на 1, 2, 3, 7, 14, 21, 28, 60-е сутки после введения крысам криоконсервированных криоэкстракта, клеток и фрагментов плаценты, в эти же сроки проводили гистологическое исследование места трансплантации криоконсервированного фрагмента плаценты. После введения криоконсервированного криоэкстракта плаценты исследуемые соединения выявляются в максимальной концентрации в первые сутки, продолжительность их определения ограничивается неделей. Введение клеточных и тканевых структур плаценты приводит к более плавному высвобождению исследуемых веществ, продолжительность их обнаружения в 4-9 раз дольше. Результаты исследования структуры имплантированных фрагментов плаценты и окружающих тканей показали, что они достаточно длительное время (до 60 суток) определяются в организме экспериментальных животных, сохраняя типичную для плаценты ворсинчатую структуру.

Ключевые слова: криоэкстракт плаценты, клетки плаценты, фрагменты плаценты, альфафетопротеин, хорионический гонадотропин человека.