Інститут проблем кріобіології і кріомедицини
Національна академія наук України

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

ЧУБ ОЛЕГ ВОЛОДИМИРОВИЧ

УДК 615.361.013.85.014.41 : 616.831-005-02: 618.173

ДИСЕРТАЦІЯ

ВПЛИВ КРІОКОНСЕРВОВАНИХ ЕКСПЛАНТІВ ПЛАЦЕНТИ НА ПЕРЕБІГ ДИСЦИРКУЛЯТОРНОЇ ЕНЦЕФАЛОПАТІЇ В ПОСТМЕНОПАУЗІ (ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ)

14.01.35 – кріомедицина
22 – охорона здоров'я

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук (доктора філософії)
Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело
_____(підпис, ініціали та прізвище здобувача)

Науковий керівник Прокопюк Ольга Степанівна, доктор медичних наук, професор

Харків – 2019

АНОТАЦІЯ

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

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук (доктора філософії) за спеціальністю 14.01.35 «Кріомедицина» (222 – Медицина). – Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків, 2019.

Кріомедичні технології з використанням плацентарних структур позитивно впливають на саногенез ряду захворювань і патологічних станів. Введення похідних плаценти стимулює функції ендокринних органів, печінки, покращує трофіку серцево-судинної системи, підвищує репаративні можливості тканин, резистентність організму до несприятливих чинників зовнішнього середовища і стресових ситуацій. Проте характер та механізми біологічної дії кріоконсервованих експлантів плаценти (КЕП) на перебіг дисциркуляторної енцефалопатії (ДЕ) в постменопаузі (ПМП) не з’ясовані.

Проблема корекції дисциркуляторної енцефалопаті в постменопаузі заслуговує особливої уваги, оскільки ДЕ істотно знижує якість життя і працездатність, супроводжується порушеннями психоемоційної сфери, є чинником ризику мозкового інсульту – однієї з головних причин інвалідизації та смертності.

Кріоконсервування робить можливим використання біологічних структур із збереженістю їх природних властивостей. Введення КЕП, які містять комплекс гормонів, регуляторних молекул, нейротрофінів, нейромедіаторів,

чинників росту судин та нервів, може позитивно впливати на відновлення порушеного гомеостазу організму жінки в постменопаузі, ускладненій ДЕ.

З огляду на вищенаведене доцільним є визначення впливу імплантації кріоконсервованих експлантів плаценти на перебіг дисциркуляторної енцефалопатії в постменопаузі на експериментальних моделях для патогенетичного обґрунтування і розробки ефективного лікувально-терапевтичного метода терапії ДЕ у жінок в постменопаузальному періоді.

Для кріоконсервування експлантів плаценти використовували кріобіологічні, а для введення КЕП – кріомедичні методи. Для визначення біологічної дії плацентарних речовин використовували методи культивування нервових клітин головного мозку (ГМ) новонароджених щурів в присутності есенціальних сполук КЕП, моделювання глутаматної ексайтотоксічності на культурі нервових клітин новонароджених щурів, а також моделювання ДЕ в постменопаузі на лабораторних мишах. Морфологічними методами досліджували головний мозок (моторну кору півкуль і гіпокамп) мишей, використовуючи забарвлення гематоксиліном та еозином. Для дослідження загальних фізичних характеристик експериментальних тварин оцінювали зовнішній вигляд, зміну ваги, зросту, фізичної сили. Поведінкові реакції, міжпівкульну асиметрію, когнітивні функції досліджували нейрофізіологічними методами за допомогою відповідних тестів. Використовували методи комп’ютерної обробки зображень та статистичного аналізу даних.

При дослідженні впливу середовищ, які вміщують есенціальні сполуки КЕП, на метаболічну активність нервових клітин новонароджених щурів за допомогою МТТ-тесту вперше виявлено, що культивування нервових клітин в середовищі DMEM, кондиційованому з КЕП, збільшує їх метаболічну активність в порівнянні з відповідним показником у контролі більше, ніж на 30 %. Середовище, кондиційоване з КЕП, характеризується нейротрофічною (відновлювальною) дією в моделі глутаматної ексайтотоксичності *in vitro*: збільшує метаболічну активність нервових клітин на 20,6 %. Нейропротекторна

дія середовища, кондиційованого з КЕП, була більш значною: метаболічна активність нервових клітин після ексайтотоксичного впливу глутамату збільшувалася на 41,2 % при попередньому їх культивуванні в середовищі, кондиційованому з КЕП. В середовищах, що піддавалися нагріванню до 95 ^{0}С, плацентарні сполуки не демонструють захисної або відновлювальної дії, що свідчить про їх термолабільність і обгрунтовує пріоритет кріобіологічних методів створення плацентарних біопрепаратів для корекції неврологічних уражень.

Результатами експериментальних досліджень впливу КЕП на виживання, тривалість та якість життя лабораторних тварин вперше доведено, що введення КЕП не змінює тривалість життя самиць, однак збільшує їх виживання в репродуктивному віці, а також покращує зоосоціальну, орієнтаційно-дослідницьку поведінку і значуще зменшує тривожність. Введення КЕП збільшує тривалість життя самців (середня тривалість життя збільшується на 18 %, максимальна – на 17 %, 50-відсоткове виживання – на 17 %, 90-відсоткове виживання – на 20 %), покращує показники зовнішнього вигляду і фізичну силу, проте погіршує показники орієнтаційно-дослідницької, зоосоціальної та анксіолітичної поведінки. Отримані результати можуть бути наслідком дії жіночих статевих гормонів та інших плацентарних біологічно активних речовин (БАР) в складі КЕП на організм самців, що виражалося в анаболічному ефекті та дезадаптації центральної нервової системи (ЦНС).

При дослідженні впливу імплантації КЕП на ЦНС самиць мишей різних вікових груп виявлено, що у старіючих самиць мишей в порівнянні з групами молодих тварин збільшується вертикальна локомоторна активність, але кількість актів грумінгу, який часто спостерігається при новизні подразників, зменшується, що відображає перевагу дослідницької поведінки перед страхом в умовах стресу новизни. Результати досліджень показали, що самиці мишей у віці 12 місяців проводять вірогідно більше часу в закритому відрізку підведеного хрестоподібного лабіринту, ніж у 6-тимісячному віці, що є свідоцтвом чутливості ЦНС старіючих самиць до стресорних чинників та

призводить до значного підвищення тривожності. Введення КЕП позитивно впливає на вікові зміни поведінки самиць мишей в пізньому онтогенезі: вірогідно підвищує вертикальну та горизонтальну локомоторну активність, скорочує час, проведений в закритому рукаві підведеного хрестоподібного лабіринту, збільшує час, проведений з різно- та одностатевими тваринами в тестах зоосоціальної активності.

Введення КЕП позитивно впливає також на морфологію гіпокампу і моторної кори старіючих мишей. Вперше доведено, що введення КЕП оваріоектомованим мишам при моделюванні ДЕ дозволяє відновити цитоархітектоніку, мікроциркуляцію, проліферацію ендотеліоцитів та пірамідних нейронів в зовнішній пластинці моторної кори і зубчастій звивині Амонова рогу гіпокампа. Вперше встановлено суттєве збільшення ширини шару нейронів моторної кори (в 1,5 рази від значення в експериментальній моделі) та збільшення в 3,5 рази ширини шару нейронів зубчастої звивини Амонова рогу гіпокампа, що доводить відновлюючу дію КЕП на нейрогенез в моторній корі та гіпокампі.

Вперше показано, що введення КЕП позитивно впливає на орієнтаційно-дослідницьку поведінку мишей, наближуючи показники вертикальної та горизонтальної локомоторної активності до норми. Виявлено також збільшення часу дослідження нового об'єкта, що інтерпретується, як покращення когнітивних функцій. Після введення КЕП спостерігається відновлення міжпівкульної асиметрії, що свідчить про позитивний вплив плацентарних сполук на адаптаційні функції ЦНС.

Визначені ефекти можуть реалізуватися за декількома механізмами. Це – відновлення порушеного балансу нейромедіаторів, нейротрофінів, ростових чинників та інших БАР в ГМ піддослідних тварин, а також – безпосередній нейротропний вплив жіночих статевих гормонів і пептидів у складі КЕП та включення їх в регуляторні нейромедіаторні системи шляхом залучення до модулювання нейрохімічних процесів. Стимулювати нейрогенез та проліферацію ендотеліоцитів природним чином можуть плацентарні чинники

росту, нейротрофічні та інші тканинно-специфічні речовини, що посилюють репаративний білковий синтез.

Новизна роботи полягає в тому, що вперше досліджено і визначено нейропротекторну та нейротрофічну дію БАР КЕП на культуру нервових клітин ГМ новонароджених щурів. Показано, що нейропротекторна дія плацентарних речовин вдвічі потужніша за нейротрофічну та не виявляється при нагріванні до 95^0 С середовища, кондиційованого з КЕП. Вперше досліджено вплив імплантації КЕП на тривалість та якість життя мишей в залежності від статі: виявлено, що КЕП подовжують життя самців та зменшеншують вірогідність смерті самиць в репродуктивному віці. Вперше визначено позитивний вплив імплантації КЕП на поведінку та морфологію моторної кори головного мозку і гіпокампу старіючих самиць мишей. Вперше доведено, що завдяки введенню КЕП покращується дослідницька поведінка, адаптаційні функції та відновлюється нейрогенез, проліферація ендотеліоцитів і мікроциркуляція в ГМ оваріоектомованих мишей в моделі ДЕ. На підставі проведених досліджень запропоновано та одержано патент України на корисну модель «Спосіб лікування когнітивних порушень при дисциркуляторній енцефалопатії в постменопаузі».

Результати дослідження впроваджено в науково-дослідну та педагогічну роботу Харківської медичної академії післядипломної освіти МОЗ України, Харківського національного медичного університету МОЗ України.

Проведене експериментальне дослідження дозволяє визначити введення КЕП пацієнткам в перименопаузальний період, як перспективний, патогенетично обгрунтований лікувально-профілактичний метод боротьби з ДЕ та її наслідками. Виявлені механізми терапевтичної дії КЕП можуть використовуватися в розробці нових і вдосконалення існуючих методів лікування патологій, пов’язаних з недостатністю нейротрофінів, порушенням нейрогенезу та адаптаційних функцій ЦНС. Результати дисертаційної роботи можуть бути включені в програму навчання студентів біологічних і медичних спеціальностей та програму підвищення кваліфікації лікарів-інтернів.

Перспективним вбачається подальше вивчення та ідентифікація нейротрофічних та нейропротекторних плацентарних БАР.

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

ПЕРЕЛІК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації

Статті у фахових виданнях

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

Structures in Senescent Mice. *Neurophysiology*. Vol. 49. No. 5. October, 2017. P. 363–371. SCOPUS.

Патенти України на корисну модель

6. Прокопюк В. Ю., Мусатова И. Б., **Чуб О. В.**, Прокопюк О. С., Воліна В. В. Спосіб лікування когнітивних порушень при дисциркуляторній енцефалопатії в постменопаузі. Патент на корисну модель №124910 Україна (51)МПК А61К 35/16 (2015.01); заявл. 20.11.2017; опубл. 25.04.2018. Бюл. №8. Патентовласник: ІПК і К НАН України.

Статті в збірках матеріалів конференцій

7. **Чуб О. В.**, Мусатова И. Б., Прокопюк В. Ю., Карпенко В. Г. Влияние имплантации криоконсервированных эксплантов плаценты на структуру поведения самок мышей позднего онтогенеза. *Холод в біології та медицині: матеріали 39-ої щорічної конференції молодих вчених, м. Харків, 20-21 травня 2015 р. Проблемы криобиологии и криомедицины.* 2015. Т. 25. № 2. С. 192. SCOPUS.
8. Мусатова И.Б., **Чуб О. В.**, Прокопюк В. Ю., Прокопюк О. С., Фалько О. В., Шевченко Н. А. Структура поведения мышей позднего онтогенеза после имплантации криоконсервированных эксплантов плаценты. *Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине: материалы VIII международной науч.-практ. конф. Санкт-Петербург (Россия), 20-22 мая 2015 года. Проблемы развития высоких технологий.* 2015**.** Т.1 С. 84–87.
9. **Чуб О. В.**, Шевченко М. А., Прокопюк В. Ю. Нейропротекторный эффект факторов плацентарного происхождения в модели глутамат-индуцированной токсичности клеток головного мозга новорожденных крыс. *Холод в біології та медицині: матеріали 40-ої щорічної конференції молодих вчених, м. Харків, 23-24 травня 2016 р. Проблемы криобиологии и криомедицины*. 2016. Т. 26. № 2. С. 176. SCOPUS.
10. **Чуб О. В.**, Прокопюк В. Ю., Прокопюк О .С., Мусатова І. Б., Шевченко М. В. Кріоконсервовані плацентарні біопрепарати в профілактиці

і корекції дисфункції ЦНС в пізньому онтогенезі (експериментальне дослідження). *Матеріали VI Національного конгресу геронтологів і геріатрів України, м. Київ, 19-21 жовтня 2016 р. Проблемы старения и долголетия.* 2016. Т.25. С. 44.

11. **Чуб О. В.**, Прокопюк В. Ю., Мусатова И. Б., Прокопюк О. С. Влияние имплантации криоконсервированных эксплантов плаценты на продолжительность и качество жизни (экспериментальное исследование) *Холод в біології та медицині: матеріали 41-ої щорічної конференції молодих вчених, м. Харків, 24-25 травня 2017 р. Проблемы криобиологии и криомедицины.* 2017. Т. 27. № 2. С. 184. SCOPUS.

<u>Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації</u>

<u>Тези конференцій</u>

12. Skybina K. P., **Chub O. V.**, Prokopyuk V. Yu., Shevchenko M. V. Placental factors protects neural cells from glutamate-induced toxicity *Topical issues of new drugs development: Abstracts of XXIII International Scientific And Practical Conference Of Young Scientists And Student, April 21, 2016, Kharkiv, in 2 vol.* Kh.: Publishing Office NUPh, 2016. Vol.2. P. 106.
13. Прокопюк В. Ю., **Чуб О. В.**, Шевченко М. А. Глутаматна ексайтотоксичність як метод вибору оцінки нейропротекторної дії лікарських препаратів in vitro. *Патофізіологія і фармація: шляхи інтеграції: тези доповідей VII Національного конгресу патофізіологів України з міжнародною участю, м. Харків, 5 – 7 жовтня 2016.* Харків: Вид-во НФаУ, 2016. С. 187.
14. **Чуб О. В.**, Мусатова І. Б., Прокопюк Ю. В., Карпенко В .Г. Адаптаційні можливості організму мишей пізнього онтогенезу після імплантації кріоконсервованих експлантів плаценти. *Стратегії профілактики неінфекційних хвороб та шляхи їх реалізації: від постулатів минулого в*

майбутнє: матеріали наук.-прак.ї конференції за участю міжнародних спеціалістів, м. Харків, 4 листопада 2016 р. Харків, 2016. С.240.

15. **Chub O. V.**, Prokopiuk V. Y., Musatova I. B., Prokopiuk O. S. Placental factors can increase lifespan and healthspan in mice. *Збірка наукових публікацій I всеукраїнського конкурсу наукових робіт студентів та молодих вчених медико-фармацевтичного профілю, м. Київ, 17 лютого 2017 р* .Київ, 2017. С. 43–44.
16. **Чуб О. В.**, Прокопюк В. Ю., Мусатова І. Б., Прокопюк О. С. Кріоконсервовані експланти плаценти підвищують тривалість життя самців і знижують імовірність смерті самиць в репродуктивний період. *Актуальні питання сучасної медицини: тези доповідей XIV Міжнародної наукової конференції студентів, аспірантів, докторантів, молодих вчених та фахівців, м. Харків, 30–31 березня 2017 р.* Харків, 2017. С. 88–89.
17. Prokopiuk V. Yu., Musatova I. B., Shevchenko M. V., Shevchenko N. O., Prokopiuk O. S., **Chub O. V**. Placental MSCs, explants,extract protect neural cells against glutamate-induced toxicity. *Program and Abstract Book 8th International Symposium on Experimental and Clinical Neurobiolog, Kosice, Slovakia, June 18 – 21, 2017.* Kosice, 2017. P. 72.

ANNOTATION

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

Thesis for the degree of Candidate of Medical Science (Philosophy Doctor), in specialty 14.01.35 "Cryomedicine" (222 – Medicine). - Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, 2019.

Cryomedical technologies involving placental structures have a positive effect on the sanogenesis of a number of diseases and pathological conditions. Injection of placental fragments has been shown to stimulate the functions of endocrine organs, liver, improves the trophism of cardiovascular system, increases the reparative capacity of tissues, body resistance to adverse environmental factors and stressful situations. However, the nature and mechanisms of biological effect of cryopreserved placental explants (CPE) on the course of dyscirculatory encephalopathy (DE) in postmenopausal patients have not been clarified.

Cryopreservation makes it possible to use biological structures with preservation of their natural properties. The injection of CPE, containing a combination of hormones, regulatory molecules, neurotrophins, neurotransmitters, vascular and nerve growth factors can positively affect the restoration of an impaired homeostasis of woman's organism at postmenopausal period, complicated by DE.

In view of the above, it is expedient to determine the influence of CPE on the course of experimental DE in postmenopausal period in experimental models aiming to prove the pathogenetic basis and to develop the effective treatment of DE in women at postmenopausal period.

For cryopreservation of placental explants cryobiological methods were used, and cryomedical were the ones applied for the CPE injection. For determination of the biological effect of placental substances, the methods of culturing of brain neuronal cells of newborn rats in the presence of CPE essential compounds, modeling of glutamate excitotoxicity in the culture of neuronal cells of neonatal rats, as well as DE simulating in postmenopausal laboratory mice were used. Morphological methods were applied to examine the brain (motor cortex and hippocampus) of mice, using hematoxylin and eosin staining. The study of the general physical characteristics of experimental animals, physiological methods (estimation of external appearance, measurement of weight, height, physical strength) were used. Behavioral reactions, laterization of brain function, and cognitive function were investigated by means of neurophysiological methods using appropriate tests. Methods of computer image processing and statistical analysis of data were applied.

During investigation of the influence of media containing CPE essential compounds on metabolic activity of newborn rats' neural cells, using the MTT test, for the first time, it was discovered that culturing of neuronal cells in DMEM, conditioned with CPE, increased their metabolic activity in comparison with the control more than by 30%. The CPE conditioned medium was characterized with neurotrophic (recovering) effect in the model of glutamate excitotoxicity *in vitro*: increased the metabolic activity of neuronal cells by 20.6% and significantly enhanced neuroprotective effect: increased metabolic activity of neuronal cells after excitotoxic effects of glutamate by 41.2% at their previous culturing in the medium conditioned with CPE. Placental factors in the media heated up to 95 ° C did not show protective or regenerative effects on neuronal cells, indicating their thermolability and justifying the priority of cryobiological methods for the creation of placental products in the correction of neurological lesions.

Experimental study of the CPE effect on survival, duration and quality of life of laboratory animals showed that the injected CPE did not affect the life expectancy of females, but increased their survival in reproductive age, as well as improved social, orientational and investigative behavior and significantly reduced anxiety. The

injected CPE significantly increased the life expectancy of males (average life expectancy was increased by 18%, the maximal one by 17%, 50% survival by 17%, 90% survival by 20%), improved their appearance and physical strength, however, the indices of orientational and investigative, social and anxiolytic behavior worsened. Such findings can result from the action of female sex hormones and other placental biologically active substances (BAS) in the composition of the CPE on the body of males, which was expressed in the anabolic effect and central nervous system maladaptation.

In the study of the implantation effect of cryopreserved placental explants on the central nervous system of females of different age groups, it was found that in aged females the investigative activity increased in comparison with the groups of young animals, but the number of grooming acts, which is often observed at the novelty of stimuli, decreased, reflecting the superiority of the investigative behavior in the face of fear in stress novelty state. The results of the studies showed that females in the 12-month age group were more likely to spend more time in the cross-labyrinth closed segment than in the 6-month-old age, which is an evidence of CNS sensitivity of aging females to stressors at this age and leads to a significant increase in anxiety. The CPE injection in aging animals had a positive effect on age-related behavior of females in late ontogenesis, as it was likely to increase vertical and horizontal locomotor activity, shorten the time spent in a crossed labyrinth closed sleeve, and enhanced the time spent with different and same-sex animals in social activity tests.

The injection of CPE also had a positive effect on morphology of the hippocampus and motor cortex of aging mice. For the first time it has been proven that the injection of CPE to ovariectomized mice during the DE modeling can restore cytoarchitectonics, microcirculation and proliferation of endothelial cells and pyramidal neurons in the external lamina of the motor cortex and the hippocampus Ammon’s horn dentate gyrus. For the first time, a significant increase in the width of the motor cortical neuron layer (in 1.5 times versus the value in the model) and an increase of 3.5 times in the width of the layer of neurons of the hippocampus

Ammon's horn dentate gyrus was determined, that proves the restorative effect of CPE on microcirculation and neurogenesis in the motor cortex and in hippocampus.

It has been shown for the first time that the injected CPE positively affect the orientational and investigative behavior of mice, approaching the indices of vertical and horizontal locomotor activity to normal. An increased time for investigating a new object, which is interpreted as an improvement of cognitive functions, has been also revealed. After the CPE injection, there was observed a recovered laterization of brain function, indicating a positive effect of placental compounds on the CNS adaptive functions.

The revealed effects can be implemented by several mechanisms, including the restoration of the disturbed balance of neurotransmitters, neurotrophins and other BASs in the brain of experimental animals, as well as direct neurotropic effects of female sex hormones and peptides in the CPE composition and their incorporation into regulatory neurotransmitter systems and involvement into modulation of neurochemical processes. The placental growth factors, neurotrophic and other tissue-specific substances that enhance reparative protein synthesis may naturally stimulate the neurogenesis and proliferation of endothelial cells.

The novelty of this research consists in the fact that for the first time the neuroprotective and neurotrophic action of CPE BAS was investigated using the culture of brain neuronal cells of newborn rats. It has been shown that the neuroprotective effect of placental substances is twice as powerful as neurotrophic and is not found when heating a medium conditioned with CPE up to 95°C. The effect of CPE implantation on the duration and quality of life of mice, depending on sex has been investigated for the first time. BAS of CPE prolong the life of males, while in females the reduced probability of death in reproductive age was found. For the first time, the positive effect of CPE implantation on the behavior and morphology of brain motor cortex and hippocampus of aging female mice was revealed. It has been proven for the first time that due to the injection of CPE, research behavior, adaptive functions and neurogenesis, endothelial cell proliferation, and microcirculation in the brain of ovariectomized mice in the dyscirculatory

encephalopathy model have been restored. On the basis of the performed studies, the Ukrainian patent for the utility model "A method for the treatment of cognitive impairments in post-menopausal dyscirculatory encephalopathy" was proposed and obtained.

The results of the study were introduced into the educational and pedagogical activity of the Kharkiv Medical Academy of Postgraduate Education.

The performed experimental study enables to determine the injection of CPE to patients in the perimenopausal period, as a promising, pathogenetically substantiated therapeutic and prophylactic method of combating the DE and its consequences. The revealed mechanisms of therapeutic action of CPE can be used in the development of new and improved existing methods to treat the pathologies associated with neurotrophin deficiency, neurogenesis and adaptive CNS functions. The results of this thesis can be included into the program of training of students of biological and medical specialties and into the professional internship program as well. The further study and identification of neurotrophic and neuroprotective placental BAS is prospective.

Key words: placenta cryopreservation, dyscirculatory encephalopathy, postmenopausal period, cognitive function, behavior.

ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ 2
ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ ТА УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ 19
ВСТУП 21
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ 30
1.1 Кріоконсервовані структури плаценти та їх біологічна дія на організм 30
1.1.1 Ефективность кріоконсервованих препаратів плаценти в експериментальних моделях захворювань у лабораторних тварин 30
1.1.2 Клінічне застосування кріоконсервованих біооб'єктів плацентарного походження 32
1.1.3 Плацентарні біологічно активні речовини 34
1.2 Сучасні уявлення про етіопатогенез і принципи корекції дисциркуляторної енцефалопатії в постменопаузі 39
1.2.1 Етіопатогенез дисциркуляторної енцефалопатії в постменопаузі 39
1.2.2 Принципи та можливості терапії дисциркуляторної енцефалопатії в постменопаузі 45
1.3 Нейрофізіологічні процеси в постменопаузі і роль біологічно активних речовин в їх регуляції 48
1.3.1 Патогенетичні зміни в організмі жінки в постменопаузі, що обумовлюють розвиток дисциркуляторної енцефалопатії 48
1.3.2 Вплив статевих гормонів на нейротрансмітерні системи 53
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ 58
2.1 Дизайн дослідження та кількість тварин в експериментах 58
2.2 Методи отримання кріоконсервування та оцінки збереженості експлантів плаценти 60
2.3 Методи дослідження нейропротекторної та нейротерапевтичної дії кріоконсервованих експлантів плаценти *in vitro* 61
2.4 Методи дослідження біологічної дії кріоконсервованих експлантів плаценти *in vivo* 64
2.4.1 Дослідження фізичних показників, поведінки, виживання і тривалості

життя мишей 66
2.4.2 Моделювання експериментальної дисциркуляторної енцефалопатії в постменопаузі та її обгрунтування 67
2.4.3 Методи дослідження міжпівкульної асиметрії, когнітивно-мнестичних функцій та поведінки мишей 68
2.4.4 Морфологічні дослідження структур головного мозку мишей 72
2.5 Статистична обробка результатів досліджень 73
РОЗДІЛ 3. ВПЛИВ КРІОКОНСЕРВОВАНИХ ЕКСПЛАНТІВ ПЛАЦЕНТИ НА СТАН НЕРВОВИХ КЛІТИН В МОДЕЛІ ГЛУТАМАТ-ІНДУКОВАНОЇ ЕКСАЙТОТОКСИЧНОСТІ *IN VITRO* 74
РОЗДІЛ 4. ВПЛИВ ІМПЛАНТАЦІЇ КРІОКОНСЕРВОВАНИХ ЕКСПЛАНТІВ ПЛАЦЕНТИ НА ПОКАЗНИКИ ВИЖИВАННЯ ТА ТРИВАЛІСТЬ ЖИТТЯ МИШЕЙ 82
РОЗДІЛ 5. ВПЛИВ ІМПЛАНТАЦІЇ КРІОКОНСЕРВОВАНИХ ЕКСПЛАНТІВ ПЛАЦЕНТИ НА ПОВЕДІНКОВІ РЕАКЦІЇ, ФІЗИЧНИЙ СТАН ТА СТРУКТУРУ МОТОРНОЇ КОРИ І ЗУБЧАСТОЇ ЗВИВИНИ АМОНОВА РОГУ ГІПОКАМПА МИШЕЙ 87
5.1 Вплив імплантації кріоконсервованих експлантів плаценти на орієнтаційно-дослідницьку, анксиолітичну, зоосоціальну поведінку та фізичні показники старіючих мишей 89
5.2 Вплив імплантації кріоконсервованих експлантів плаценти на структуру зовнішньої пластинки моторної кори півкуль головного мозку та зубчастої звивини Амонова рогу гіпокампа старіючих мишей 94
РОЗДІЛ 6. ОЦІНКА ЕФЕКТИВНОСТІ ЗАСТОСУВАННЯ ІМПЛАНТАЦІЇ КРІОКОНСЕРВОВАНИХ ЕКСПЛАНТІВ ПЛАЦЕНТИ ДЛЯ КОРЕКЦІЇ ПОРУШЕНЬ ЦНС У САМИЦЬ МИШЕЙ В МОДЕЛІ ДИСЦИРКУЛЯТОРНОЇ ЕНЦЕФАЛОПАТІЇ В ПОСТМЕНОПАУЗІ 99
6.1 Поведінкові реакції оваріоектомованих самиць мишей в моделі дисциркуляторної енцефалопатії та після імплантації кріоконсервованих експлантів плаценти 99

6.2 Вплив імплантації кріоконсервованих експлантів плаценти на міжпівкульну асиметрію та когнітивно-мнестичні функції самиць мишей в моделі дисциркуляторної енцефалопатії в постменопаузі 101
6.3 Вплив імплантації кріоконсервованих експлантів плаценти на структури головного мозку самиць мишей в моделі дисциркуляторної енцефалопатії в постменопаузі 107
6.3.1 Морфологічні характеристики гіпокампу і моторної кори півкуль головного мозку хибнооперованих самиць мишей 107
6.3.2 Морфологічні характеристики головного мозку самиць мишей в моделі дисциркуляторної енцефалопатії 109
6.3.3 Морфологічні характеристики головного мозку оваріоектомованих самиць мишей 113
6.3.4 Морфологічні характеристики головного мозку самиць мишей при моделюванні дисциркуляторної енцефалопатії в постменопаузі 115
6.3.5 Морфологічні зміни в головному мозку самиць мишей при моделюванні дисциркуляторної енцефалопатії в постменопаузі після імплантації кріоконсервованих експлантів плаценти 118
6.3.6 Морфологічні зміни ендотелію судин кори головного мозку мишей в модельних експериментах та після імплантації кріоконсервованих експлантів плаценти 120
6.3.7 Морфометричне дослідження структур головного мозку самиць мишей після імплантації кріоконсервованих експлантів плаценти в моделі дисциркуляторної енцефалопатії в постменопаузі 124
УЗАГАЛЬНЕННЯ ТА ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ 128
ВИСНОВКИ 143
ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ 145
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ 147
ДОДАТОК А. Список публікацій здобувача за темою дисертації 180
ДОДАТОК Б. Відомості про апробацію результатів дисертації 184

ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ ТА УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

АГ – артеріальна гіпертензія

АКТГ – аденокортикотропний гормон

АТФ – аденозинтрифосфат

БАР – біологічно активні речовини

ВООЗ – Всесвітня організація охорони здоров’я

ГАМК – γ-аміномасляна кислота

ГМ – головний мозок

ДЕ – дисциркуляторна енцефалопатія

ДМСО – диметилсульфоксид

ЕЕГ – електроенцефалограма

ЗГТ – замісна гормональна терапія

ІЛ – інтерлейкін

КЕП – кріоконсервований експлант плаценти

КМА – коефіцієнт міжпівкульної асиметрії

КС – клімактеричний синдром

ЛГ – лютеїнізуючий гормон

МА – міжпівкульна асиметрія

МАО – моноамінооксидаза

НА – норадреналін

НК – нервові клітини

НТББО – низькотемпературний банк біологічних об’єктів

ОЕ – оваріоектомія

ОСА – оклюзія сонних артерій

5-ОТ – 5-окситриптамін

ПЛ – плацентарний лактоген

ПОЛ – перекисне окислення ліпідів,

ТТГ – тиреотропний гормон

ФСГ – фолікулостимулюючий гормон

ХГ – хоріонічний гонадотропін

ЦНС – центральна нервова система

ЧПП – чинники плацентарного походження

BDNF – нейротрофічний чинник мозку

DMEM –модифіковане Дюльбекко середовище Ігла

PBS – фосфатно-сольовий буфер

MTT – 3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифеніл-тетразоліум бромід

NGF – чинник росту нервів

NPY – нейропептид Y

ВСТУП

Обгрунтування вибору теми дослідження. Дослідженнями останніх років доведено, що кріомедичні технології з використанням плацентарних структур позитивно впливають на саногенез ряду захворювань і патологічних станів. Показано, що введення фрагментів плаценти стимулює функції ендокринних органів, печінки, покращує трофіку серцево-судинної системи, підвищує репаративні можливості тканин [1-5]. Введення плацентарних біооб'єктів пацієнтам діє на органи-мішені, стимулюючи їх функцію і підвищує неспецифічну резистентність організму до впливу несприятливих факторів зовнішнього середовища, стресових ситуацій, а також здатність відновлення при патологічних станах [6-11]. Таким чином, терапія із застосуванням КЕП може позитивно впливати на стабілізацію порушених показників гомеостазу організму жінки в постменопаузі, ускладненій ДЕ.

Проблема корекції ДЕ в постменопаузі заслуговує особливої уваги, оскільки за даними ВООЗ близько 40 % жінок в світі, старших за 45 років, перебувають в періоді перименопаузи. У зв'язку з порушенням гормонального гомеостазу, і, відповідно, роботи систем нейромедіаторів, розвиваються процеси дезадаптації в нейроендокринній та інших системах організму жінки [12], знижується активність метаболічних процесів, трофіка ЦНС, виникає дисфункція ендотелію судин, погіршується реологія крові [13,14], наслідком чого є збільшення коморбідної захворюваності з розвитком хронічної ішемії мозку та когнітивних розладів, яка лежить в основі патогенезу ДЕ. Вважається, що когнітивні розлади при ДЕ мають змішаний генез: поряд з цереброваскулярною патологією спостерігається нейродегенеративний процес та порушення в системах нейромедіаторів, зокрема в дофамінергічній та норадренергічній [15]. ДЕ істотно знижує якість життя і працездатність, супроводжується порушенням психоемоційної сфери, поведінкових реакцій і є

фактором ризику мозкового інсульту - однієї з головних причин інвалідизації і смертності. Тому проблема лікування хронічних цереброваскулярних захворювань має велике соціальне і економічне значення.

Лікування хворих на ДЕ включає призначення різних класів лікарських препаратів, комплекс заходів, спрямованих на корекцію основного судинного захворювання, профілактику повторних церебральних дисгемій, відновлення кількісних і якісних показників мозкового кровотоку і нормалізацію порушених функцій ГМ. Порівняльна характеристика судинних когнітивних порушень у хворих з дисциркуляторною енцефалопатією I і II стадій показала, що ядром клінічної картини є когнітивні порушення [16], що потребує коррекції.

Розроблено основні напрямки фармакологічної метаболічної терапії у осіб з цереброваскулярною патологією. При цьому застосовують фармпрепарати (пірацетам, ноотропіл, енцефабол, амінолон, кортексин,.цитиколін), які покращують окислювальний метаболізм в умовах ішемії, перешкоджають різкому зниженню рівня АТФ, стимулюють активність аденілаткінази, що дозволяє здійснювати анаеробний метаболізм глюкози без утворення лактату, підтримують міжклітинні контакти, метаболізм нервових клітин та сприяють процесу ремієлінізації [17-19]. Основним механізмом дії цитиколіну, що визначає його нейропротекторні властивості, є забезпечення збереженості зовнішніх і внутрішніх (цитоплазматичних та мітохондріальних) нейрональних мембран [20]. В результаті терапії знижується інтенсивність вільнорадикального окислення, викид нейротрансмітерів в умовах ішемії, зменшується агрегація тромбоцитів, в'язкість крові і спазм судин, внаслідок чого поліпшуються функції уваги, сприйняття, пам'яті і мислення, а також нормалізуються коркові нейродинамічні процеси, підвищується стійкість до впливів зовнішнього середовища.

Встановлено [21,22], що виражений ноотропний ефект має ендогенний регулятор функції ЦНС – семакс. Вивчення біохімічних основ дії семакса показало, що препарат пригнічує процеси перекисного окислення при глобальній ішемії мозку. Дослідження в культурі гліальних клітин виявили

експресію нейротрофічних ростових чинників мозку (NGF, BDNF) під впливом даного олігопептида. Експериментально продемонстровано, що семакс збільшує адаптаційні можливості організму, підвищує його стійкість до гіпоксії. Стимулюючи функцію переднього мозку, він підсилює увагу в момент сприйняття інформації, покращує консолідацію пам'яті, підвищує здатність до навчання. На клініко-психічний статус хворих ДЕ, підтверджений позитивною динамікою показників електроенцефалограми (ЕЕГ), благотворно впливає введення церебролізину [23,24]. Відновлення адекватного рівня кровотоку, метаболізму і синаптичної передачі за підтримки структурної цілісності мембран нейронів і функціональної активності синаптичної передачі виявлено при використанні актовегіну [25]. Для покращення когнітивних функцій та уповільнення прогресування когнітивних порушень застосовують інгібітори ацетилхолінестерази (галантамін, ривастигмін), антагоніст NMDA-рецепторів мемантин [26-28].

Вважають, що головною патогенетичною ланкою, яка обумовлює дизбаланс медіаторів у жінок в постменопаузі, є зниження вироблення яєчникових гормонів – естрогену і прогестерону, а також компенсаторне збільшення вироблення тропних гормонів – фолікулостимулюючого (ФСГ) і лютеїнізуючого (ЛГ), що супроводжується порушенням нейромедіаторної функції гіпоталамуса з посиленням активності норадренергічного тонусу, зниженням активності β-ендорфінів та серотонінової системи [29]. Тобто терапія ДЕ у жінок у віці постменопаузи без корекції естрогенного дефіциту ефективна не в повній мірі.

Однак корекція патологічних станів у жінок в постменопаузі за допомогою замісної гормональної терапії (ЗГТ) має обмеження і побічні дії [30,31]. Лікування ДЕ, в зв'язку з необхідністю застосування комплексу лікувальних засобів, також є фармагресивним [32]. Тому актуальність пошуку нових методів терапії при поєднаній патології з одночасною дією як на стан хронічного порушення мозкового кровообігу, так і на клімактеричні розлади, безперечна.

Інтенсивний розвиток клітинної і тканинної терапії відкриває нові можливості в лікуванні ряду малокурабельних захворювань і станів шляхом активації репаративних можливостей організму [5,33,34]. Успіхи клітинної терапії багато в чому визначені досягненнями кріобіології, яка розробляє методи низькотемпературної консервації клітинних, безклітинних і тканинних біоматеріалів, в тому числі отриманих з плаценти, таких, як КЕП [35,36].

В Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України розроблено метод кріоконсервування експлантов плаценти, а в низькотемпературному банку біологічних об'єктів інституту створено колекцію цього біоматеріалу. Лабораторні дослідження показали, що після кріоконсервування БАР в КЕП залишаються збереженими [37,38].

Відомо, що плацента містить велику кількість гормонів, вітамінів, імунорегуляторів, ростових чинників та інших сполук, які сприяють розвитку органів і систем плода [39]. БАР забезпечують потужний ефект плацентарних біопрепаратів, завдяки чому вони широко використовуються в клінічній практиці. У періоді вагітності в тканині плаценти синтезуються пептиди – структурні аналоги опіатів - ендорфінів і енкефалінів, що впливають на метаболізм, імунний захист та беруть участь в підтримці сталості внутрішнього середовища і від яких залежить пам'ять і настрій [40]. В плаценті здійснюється синтез білків, що відносяться до класу інтерлейкінів: – ІЛ-1, ІЛ-2, ІЛ-6, ІЛ-8, однією з функцій яких є індукція гуморальних факторів неспецифічної резистентності, що стимулюють репарацію за рахунок активації мезенхімальних клітин і процесів неоваскуляризації [41].

Питанням використання препаратів плацентарного комплексу в геронтології присвячена достатня кількість робіт [42-45]. Однак характер біологічної дії та механізми реалізації терапевтичних ефектів застосування КЕП вивчені недостатньо. У зв'язку з вищевикладеним дослідження, спрямовані на розробку методів лікування ДЕ в постменопаузі (ПМП) і виявлення можливих механізмів терапевтичної дії з використанням кріоконсервованих плацентарних біоматеріалів, представляються актуальними.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами.

Робота виконана в рамках відомчої НДР відділу КСР Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України № 89 «Дослідження геропротекторної та геротерапевтичної дії кріоконсервованих плацентарних біооб'єктів» (шифр – 2.2.6.89, № держреєстрації 0114U001319), договорів № 2Н /11-14, № 2Н /11-15 та № 2Н /11-16 на виконання робіт зі збереження та забезпечення належного функціонування наукового об'єкта, що становить національне надбання, українсько-словацького наукового проекту «Нейропротективний потенціал кріоконсервованих плацентарних МСК, екстракту, сироватки плацентарної крові при ушкодженнях спинного мозку».

Мета і завдання дослідження.

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

1. Дослідити нейротропну дію середовищ, кондиційованих з КЕП, на культуру нервових клітини в моделях *in vitro*.
2. Оцінити вплив імплантації КЕП на виживання, тривалість життя, фізичний стан піддослідних тварин.
3. Дослідити показники якості життя, орієнтаційно-дослідницьку, зоосоціальну та анксиолітичну поведінку піддослідних тварин на тлі введення КЕП.
4. Визначити гістологічні ознаки змін в зовнішній пластинці моторної кори півкуль головного мозку і зубчастій звивини Амонова рогу гіпокампа мишей після імплантації КЕП.
5. Дослідити вплив імплантації КЕП на цитоархітектоніку зовнішньої пластинки моторної кори півкуль головного мозку і зубчастої звивини Амонова рогу гіпокампа піддослідних мишей в моделі ДЕ в ПМП.

6. Вивчити функціональний стан ЦНС мишей в експериментальній моделі ДЕ в ПМП за допомогою оцінки їх поведінкових реакцій, міжпівкульної асиметрії та когнітивних функцій після імплантації КЕП.

Об'єкт і предмет дослідження.

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

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

Методи дослідження.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертації доповідались і обговорювались на наукових форумах: конференціях молодих вчених ІПК і К НАН України «Холод в биологии и медицине» (Харків, 2015; 2016; 2017), на VI Національному конгресі геронтологів і геріатрів України

(Київ, 2016), 23-ій міжнародній науково-практичній конференції молодих вчених та студентів «Topical issues of new drugs development» (Харків, 2016), Національному конгресі патофізіологів України з міжнародною участю «Патофізіологія і фармація: шляхи інтеграції» (Харків, 2016), науково-практичній конференції за участю міжнародних спеціалістів «Стратегії профілактики неінфекційних хвороб та шляхи їх реалізації: від постулатів минулого в майбутнє» (Харків, 2016), XIV Міжнародній науковій конференції студентів, аспірантів, докторантів, молодих вчених та фахівців «Актуальні питання сучасної медицини» (Харків, 2017), I Всеукраїнському конкурсі наукових робіт студентів та молодих вчених медико-фармацевтичного профілю (Київ, 2017), 8-th International Symposium on Experimental and Clinical Neurobiology (Kosice, Slovakia, 2017).

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

Обсяг і структура дисертації. Дисертаційна робота викладена на 184 сторінках (з яких 146 сторінок – основної частини) і складається з анотації, вступу, огляду літератури, опису матеріалів і методів дослідження, 4 розділів власних досліджень, узагальнення, висновків, практичних рекомендацій, списку літератури та 2 додатків. Список літератури містить 312 джерел, у тому числі 148 – кирилицею та 164 – латиницею. Робота ілюстрована 7 таблицями та 29 рисунками, в яких представлена 41 мікрофотографія.

РОЗДІЛ 1
ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Кріоконсервовані структури плаценти та їх біологічна дія на організм.

1.1.1 Ефективность кріоконсервованих препаратів плаценти в експериментальних моделях захворювань у лабораторних тварин.

Кріомедичні технології з використанням плацентарних структур розглядаються сучасною медичною наукою в якості перспективних методів ефективного лікування хворих. До плацентарних біопрепаратів відносять кріоконсервовані екстракти, фрагменти, експланти, клітини плаценти, хоріону, плодових оболонок, пуповини, компоненти плацентарної крові – сироватку, плазму, клітинні суспензії та біоінженерні конструкції з похідних плаценти. Кріоконсервування дозволяє зберегти плацентарні, стовбурові клітини, біологічно активні речовини (гормони, мікроелементи, вітаміни, ростові та інші чинники), тестувати плацентарні біопрепарати на етапі заготівлі і потім, після отримання підтвердження про відсутність інфікованості, використовувати в технологічному процесі виробництва стандартизованих препаратів для експериментальних досліджень і клінічного застосування [1,5,10,35].

Важливим завданням сучасної кріомедицини є визначення біологічної дії кріоконсервованих похідних плаценти на організм лабораторних тварин з моделюванням у них захворювань людини для патогенетичного обґрунтування і розробки новітніх ефективних методів лікування. Терапевтичну дію кріоконсервованих біооб'єктів плацентарного походження доведено при моделюванні ряду патологій органів і систем у експериментальних тварин. Показана ефективність застосування сироватки плацентарної (кордової) крові

при моделюванні антифосфоліпідного синдрому [46], постгістеректомічного синдрому [47], лікуванні холодових ран [48], остеоартрозу колінних суглобів [49], атеросклерозу [50]. Виявлено антиатерогенний влив імплантації алогенної кріоіонсервованної тканини плаценти при експериментальному атеросклерозі за рахунок дії плацентарних естрадіола і тироксина, що стимулюють рецепторозалежний катаболізм ліпопротеїдів низької щільності [51].

Встановлено позитивну терапевтичну дію плацентарної крові з метою корекції лімбальної недостатності рогівки [52], ретинопатії [53], структурних змін шкіри при експериментальному гіпотиреозі [54], структурно-функціонального стану серцево-судинної системи при експериментальній гіпертензії [55]. Введення кріоекстракту і фрагментів плаценти призводило до корегування патологічних змін, що розвивалися при експериментальному посткастраційному синдромі [45], стало ефективним в попередженні негативних наслідків холодового стресу на серцево-судинну систему [56]. Експериментально доведено високу ефективність застосування фрагментів плацентарної тканини для корекції сенильно-інволютивних, геронтологічних відхилень [44], при дисфункції щитоподібної залози [57], аутоімунному ад'ювантному артриті [58], запаленні [59]. У модельному експерименті при навантаженні на серцево-судинну систему лабораторних тварин пізнього онтогенезу показано протекторну дію імплантованих кріоконсервованих фрагментів хоріону з відновленням білків міокардіоцитів та електорофізіологічних показників діяльності серця [37].

В експериментальній неврології кріоконсервовані препарати кордової крові та екстракт плаценти виявилися ефективними при лікуванні ішемічного ураження ГМ [60,61], нейродегенеративних захворювань [62,63]. Доведено, що введення кріоконсервованих клітин кордової крові людини та екстракту плаценти сприяють корекції порушень, пов'язаних з активацією перекисного окислення ліпідів через зниження рівня вільнорадикального окислення в тканині ГМ, покращенню утилізації кисню тканинами, що пережили гіпоксію, відновленню системи антиоксидантного захисту [64], а також репаративного

потенціалу нервової тканини головного та спинного мозку: локальних нейронів та глії [60,61].

Незважаючи на велику кількість експериментальних досліджень, присвячених застосуванню біопрепаратів плацентарного походження, актуальною і маловивченою проблемою залишається дослідження впливу імплантації кріоконсервованих експлантів плаценти на ЦНС і можливість їх використання для лікування такої поширеної і малокурабельної патології, як дисциркуляторна енцефалопатія в постменопаузі.

1.1.2 Клінічне застосування кріоконсервованих біооб`єктів плацентарного походження.

Верифікація ефективності кріоконсервованих структур з плаценти в доклінічних дослідженнях призвела до того, що в світовій медицині для лікування широкого спектру захворювань все активніше звертають увагу на похідні плаценти людини. Застосування в клінічній практиці кріоконсервованого матеріалу плацентарного походження є продовженням робіт акад. Філатова В.П. в області створення біогенних стимуляторів [65] і тканинної терапії. Однак необхідно було багато зусиль і наукових досліджень для того, щоб цей метод лікування був використаний в клінічній практиці. Величезний внесок у створення і клінічне розповсюдження тканинної терапії, лікування плацентарними біопрепаратами нового покоління вніс академік НАН України В.І. Грищенко. Під його керівництвом Інститут проблем кріобіології і кріомедицини став одним з лідерів в галузі фундаментальних розробок і експериментального дослідження проблем тканинної терапії кріоконсервованими плацентарними біопрепаратами. На базі інституту було створено перший в Європі низькотемпературний банк кордової крові, розроблено та сертифіковано біотехнології отримання медичних імунобіологічних препаратів з плаценти. Їх застосування в наукових дослідженнях і в клініці для лікування хвороб, пов'язаних з порушеннями

нервової, ендокринної, імунної систем людини, дозволило частково або повністю відновити здоров'я, уповільнити старіння, підвищити якість життя [1,33,44].

Так, в результаті проведення гетеротопічної трансплантаціЇ кріоконсервованої тканини і введення кріоекстракту плаценти підвищувалась ефективність корекції емоційно-психічних, метаболічних, вазомоторних та урогінекологічних розладів при патологічному клімаксі [66,45,7].

Введення в організм хворих на цукровий діабет комплексу біологічно активних сполук в складі кріоконсервованих фрагментів, експлантів плаценти, сироватки плацентарної крові дозволило корегувати порушення обміну вуглеводів і прояви нейроангіопатій, зокрема підвищити ефективність хірургічного лікування діабетичної стопи через нормалізацію нейро-ендокринних взаємодій і стимуляції репаративних процесів [8].

Доведено, що використання кріоконсервованих похідних плаценти в допоміжних репродуктивних технологіях підвищує їх ефективність шляхом стимуляції овуляції, відновлення фізіологічної проліферації ендометрія і забезпечує імплантацію зародка при ендокринних розладах, що обумовили неплідця жінки [67].

Патогенетично обгрунтованним стало застосування плацентарних біопрепаратів при акушерській патології, в основі якої була плацентарна недостатність. Авторами показана доцільність такої лікувально-профілактичної тактики при прегравідарній підготовці жінок з антифосфоліпідним синдромом [46], внутрішньоутробною гіпоксією і гіпотрофією плоду [68], невиношуванням та імуноконфліктом вагітності [2], що суттєво покращило результати вагітності і пологів як для новонародженого, так і для породіллі.

Таким чином, в результаті експериментальних, доклінічних і клінічних досліджень отримані позивні результати застосування біопрепаратів плаценти при корекції ряду патологічних станів [2,3,4,7,8], однак на теперішній час відсутні дані, щодо впливу плацентарних біопрепаратів на ЦНС, не з’ясовані механізми реалізації цього впливу у жінок в постменопаузі, ускладненій ДЕ.

Визначення особливостей біологічної дії імплантації КЕП на ЦНС в модельному експерименті на лабораторних тваринах обумовить вирішення цієї актуальної науково-медичної задачі, а також допоможе визначити ефективність і механізми дії тканинноспецифічних есенціальних сполук КЕП на нейрофізіологічні порушення при ДЕ в постменопаузальному віці.

1.1.3 Плацентарні біологічно активні речовини.

Плацента вважається некласичною високоактивною ендокринною залозою, яка забезпечує баланс, розвиток і протекцію, зокрема, нейроендокринних та імунологічних процесів за рахунок продукції її клітинами БАР [40]. Імунорегуляторні ефекти плацентарних препаратів обумовлені як безпосередньо імуномодулюючими властивостями білків і інших компонентів, що входять до їх складу, так і їх антиоксидантними властивостями [6-8].

Аналіз наукової літератури показав, що в плаценті людини синтезується, накопичується і секретується велика кількість біологічно активних речовин з ендокринною та нервовою компетенцією: аналоги гормонів гіпофіза та гонад, гіпоталамоподібні вивільняючі або інгібуючі гормони, фактори росту, цитокіни та нейропептиди [40,69,70].

Плацентарні структури в своєму складі мають велику кількість гормонів: білкових – хоріонічний гонадотропін (ХГ), плацентарний лактоген (ПЛ), релаксин і стероїдних - прогестерон, естрогени. Відомо, що ХГ, крім збільшення зростання фолікулів, утворення жовтого тіла, стимулювання вироблення прогестерону, запобігання відторгненню зародка організмом матері, має протиалергічну дію. У ранні терміни вагітності ХГ стимулює стероїдогенез в жовтому тілі яєчника, у другій половині – синтез естрогенів в плаценті, а також бере участь в механізмах статевого диференціювання плоду. Одним з найважливіших плацентарних гормонів білкової природи є плацентарний лактоген (ПЛ), за структурою ПЛ близький до гормону росту аденогіпофізу, практично повністю надходить в материнську кров та активно

бере участь у вуглеводному і жировому обміні. ПЛ впливає на молочні залози подібно пролактину та підвищує синтез білка в організмі матері. Одночасно зростає вміст вільних жирних кислот, підвищується стійкість до дії інсуліну [12].

Плацента разом з гіпофізом матері і плоду виробляє пролактин, синтезує також статеві стероїдні гормони: естроген, прогестерон, кортизол. Естрогени (естрадіол, естрон, естріол) продукуються плацентою в зростаючій кількості, при цьому найбільш високі концентрації цих гормонів спостерігаються перед пологами. Близько 90% естрогенів плаценти представлені естріолом. Релаксин секретується на пізніх стадіях розвитку вагітності, розслаблює зв'язки лонного зчленування, знижує тонус матки і її скоротність [71].

Petraglia F. зі співавт. [72] була запропонована модель специфічної регуляції плацентарного стероїдогенезу за допомогою гонадотропін-рилізінгового гормону і ХГ, як плацентарної внутрішньої регуляторної системи, що діє на виробництво стероїдів з плаценти людини. Активін і інгібін запропоновані, як додаткові регуляторні речовини синтезу і секреції стероїдів.

Показано, що плацентарний естроген позитивно впливає на регуляцію біосинтезу прогестерону. Дія естрогену на нейрони здійснюється через активацію ядерних α- і β-рецепторів естрогену, що викликає довгострокові геномні ефекти, а також активацію цитоплазматичних механізмів сигналізації [73]. В експерименті на щурах, які отримали травму ГМ та піддавалися лікуванню естроном, доведено, що естрон посилює сигналізацію захисних механізмів через ERK1/2- і BDNF-шляхи, зменшує ішемічну вторинну травму і апоптотично-опосередковану загибель клітин [74].

У плаценті виробляється також глюкокортикоїдний стероїд кортизол. Відкритим залишається питання про продукцію плацентою АКТГ і ТТГ.

Пацентарні чинники представлені більш, ніж 4000 різних білків, включаючи чинники росту, цитохроми, фактори фібринолізу, ферменти енергетичного метаболізму і т.д., простагландини, енкефаліни, нейропептиди, мікроелементи. Механізмами їх дії є регуляція проліферації, диференціювання і

спрямованого руху клітин, підтримання захисних функцій організму за допомогою ростових і інших регуляторних чинників. Чинники росту або цитокіни (пептиди-біорегулятори) здатні адаптувати і нормалізувати функції клітин шляхом здійснення інформаційного зв'язку малих груп клітин, впливаючи таким чином на їх функціональну активність. Ендогенні регуляторні системи: нервова, ендокринна, імунна, реалізують свою дію в окремих органах і тканинах-мішенях через ці системи специфічних посередників, які синтезуються під дією гормонів і безпосередньо здійснюють регуляцію функцій клітин. На відміну від класичних ендогенних систем регуляції, що діють на функції клітин, виявлені регуляторні пептиди, асоційовані з хроматином, що регулюють розподіл і дозрівання клітин [40]. Наявність в плацентарних препаратах цих регуляторних пептидів дозволяє оптимізувати процеси регенерації в органах і тканинах.

У плаценті присутні також тканинні гормони – БАР, що діють в місці свого утворення, не потрапляючи в кров. Простагландини утворюються в мікросомах всіх тканин, беруть участь в регуляції секреції травних соків, зміні тонусу гладких м'язів судин і бронхів, процесі агрегації тромбоцитів. До тканинних гормонів, що регулюють місцевий кровообіг, відносяться гістамін, який розширює судини, і серотонін, що викликає пресорну дію. Тканинними гормонами вважають медіатори нервової системи - норадреналін і ацетилхолін [75].

Застосування плацентарних біооб'єктів призводить до збільшення рівнів моноамінів норадреналіну, дофаміну і серотоніну в ГМ щурів і зниження активності моноаміноксидази [76], що сприяє мобілізації захисних і регенеративних резервів ЦНС.

Zhang C.L. зі співавт. [77] зробили висновок, що плацента людини містить багато видів БАР, подібних таким в гіпоталамо-гіпофізарно-гонадній осі. Виявили, що в плацентарних ворсинах присутні багато видів нейропептидів і нейротрансмітерів, що вказує на існування в плаценті людини механізму саморегуляції синтезу і секреції плацентарних гормонів і нейротрансмітерів.

Тому, на їхню думку, плаценту людини можна розглядати як нейроендокринний орган.

Нейротрофічна дія екстрактів плаценти може бути частково обумовлена присутністю в їх складі глутамату, який стимулює хемотаксис нейтрофілів, регулює нейрогенез, синаптогенез, зростання нейритів і виживання нейронів. Вплив глутамату обумовлює рівні мозкового нейротрофічного чинника (BDNF), чинника росту нервів (NGF) та ін. У фізіологічних концентраціях глутамат стимулює синтез мозкового нейротрофічного чинника BDNF, який, в свою чергу, змінює чутливість нейронів до глутамату та пластичність синапсів [78]. Клітини-попередники нейронів при впливі на них глутамату збільшують швидкість ділення і потенціал до відновлення. Один з основних нейротрофічних чинників мозку – чинник росту нервів (NGF) – був виявлений у складі плаценти [79]. NGF має не тільки нейротрофічну, а й нейропротекторну дію, пов'язану з активацією механізмів внутрішньоклітинної сигналізації [80], що зменшує схильність нервових клітин до апоптозу.

Відомо, що нейротрофічні і ростові чинники – це поліпептиди в кілька десятків (до 200) амінокислотних залишків, організованих в одно- або двохланцюгові форми, які відіграють визначальну роль в розвитку та збереженні структур центральної та периферичної нервової системи [81]. Вважається, що нейротрофічні ефекти плацентарних біооб'єктів можуть бути обумовлені наявністю різноманітних чинників росту, таких як BDNF, NGF, IGF-I, HGF, EGF-подібних чинників [43].

Дія нейротрофічних чинників полягає в модуляції біологічних процесів, що здійснюються на різних рівнях, шляхом регуляції експресії генів функціонально значущих білків, рецепторів, медіаторів і, відповідно, включення та/або виключення альтернативних регуляторних ланок (систем). На клітинному рівні нейротрофічні чинники регулюють широкий спектр процесів не тільки в здоровому, а й у хворому і старіючому мозку, контролюючи зростання і диференціювання нейронів, функціональну стабільність і пластичність нейрональних процесів, стимулювання нейрогенезу [82,83].

Оскільки за хімічними ознаками і за характером біологічної активності немає чіткого поділу між нейротрофічними і ростовими чинниками, то вважається, що як нейротрофіни, так і майже всі відомі класичні та нещодавно відкриті чинники росту в певних умовах можуть надавати трофічну підтримку певних груп нейронів. Це пов'язано з присутністю в нервовій системі рецепторів більшості трофічних чинників і з тим, що внутрішньоклітинні системи передачі сигналів в ядро використовуються різними рецепторами і взаємно перекриваються [83]. Основна роль цих чинників полягає в регуляції переживання, диференціювання і зростання клітин різних тканин і організації основних фізіологічних процесів. Чинники синтезуються в лімітованих кількостях, активно експресуються відповідно до функціональної необхідності. Частина їх діє локально в межах популяції клітин (ауто- або паракринна регуляція), інші (або в інших ситуаціях) – дистанційно, циркулюючи з током крові. Нейротрофічні чинники підтримують необхідний рівень експресії ДНК в нейронах, зберігаючи їх функції на фізіологічному рівні, а при неврологічних порушеннях активізують захисні резерви організму і відновлення мозку [83,85,86].

Ростові чинники, відіграючи ключову роль в міжклітинній сигналізації, контролюючи проліферацію, диференціювання і спрямований рух нервових клітин для нормального протікання цих процесів, забезпечують правильний розвиток і збереження захисних реакцій організму. Таким чином, процеси проліферації клітин і набуття ними спеціалізованого характеру відбуваються в результаті узгоджених міжклітинних взаємодій, які активують внутрішньоклітинні програми, що визначають поведінку клітини в залежності від поведінки її сусідів і від потреб організму.

Крім відновлення пошкоджених нейронів вважається можливим участь нейротрофінів в реакціях навчання у тварин, оскільки нейротрофічний чинник мозку BDNF бере участь в підтримці функцій холінергічних нейронів переднього мозку, організації процесів пам'яті та когнітивних функцій [85,86].

Було визначено особливості впливу ростових чинників на біохімічні процеси, пов'язані з формуванням пам'яті, та участі їх в стимуляції здатності до навчання. Виявлено відмінності в трансфекції NGF в клітинах гіпокампу, які були істотними для корекції дефіциту просторового навчання [83,85].

Виявлено також, що хронічний стрес у оваріоектомованих самиць щурів і мишей викликає морфологічні (зменшення нейронів в гіпокампі) і поведінкові (когнітивна дисфункція) зміни, які коригувалися пероральним введенням екстракту плаценти [87].

Таким чином, тканинноспецифічні плацентарні чинники росту і нейротрофічні сполуки, а також нейротрансмітери і гормони, присутні в структурах плаценти, мають потужний потенціал нейропротекторної, нейропластичної та нейротрофічної дії, який доцільно застосовувати в терапії ДЕ на тлі дефіциту естрогенів в постменопаузальному віці. Особливої уваги заслуговує комплексний і природно збалансований склад плацентарних чинників, що містяться в КЕП.

1.2 Сучасні уявлення про етіопатогенез і принципи корекції дисциркуляторної енцефалопатії в постменопаузі.

1.2.1 Етіопатогенез дисциркуляторної енцефалопатії в постменопаузі.

Термін «дисциркуляторна енцефалопатія» був запропонований в 70-х роках минулого століття видатними неврологами Шмідтом Е. В. та Максудовим Г. А. для позначення хронічної прогресуючої недостатності мозкового кровообігу [88]. У нашій країні цей термін став широко застосовуватися після затвердження класифікації судинних захворювань ГМ на пленумі наукового товариства з неврології в 1984 році. Згідно цієї класифікації, ДЕ етіологічно пов'язана з багатьма чинниками і виникає в результаті повільно прогресуючої недостатності мозкового кровообігу, що веде до множинних дрібновогнищевих або дифузних уражень і обумовлює розвиток порушень

функції ГМ. Діагноз ДЕ встановлюється при наявності основного судинного захворювання і розсіяних вогнищевих неврологічних симптомів у поєднанні з загальномозковими. Вище вказана патологія – це поліетіологічна нозологічна група, що характеризується хронічним перебігом, в основі патогенезу якого лежить судинна і лікворна дисфункція. ДЕ супроводжується облітерацією або атеросклеротичним ураженням малих внутрішньомозкових артерій, гіпертонічним стенозом, що призводить до порушення кровотоку в басейні цих судин і розвитку найбільш типових малих (нерідко німих) глибинних (лакунарних) інфарктів головного мозку [89].

Термін «дисциркуляторна енцефалопатія» в Міжнародній класифікації хвороб 10-го перегляду (МКБ-10) відсутний. За кордоном хронічні форми цереброваскулярних патологій зводять переважно до судинної деменції, яку патогенетично пов'язують тільки з інсультами. Судинні ураження ГМ, що є однією з найбільш частих причин когнітивних розладів у осіб похилого віку, останнім часом позначають терміном «судинні когнітивні порушення», а не «судинна деменція» [90]. Вважають, що термін «судинні когнітивні порушення» повніше відображає весь перелік цереброваскулярних порушень, включаючи судинну деменцію, судинні помірні когнітивні порушення і інші варіанти церебральних васкулопатий, що призводять до порушень вищих мозкових функцій. Однак термін «судинні когнітивні порушення» має суттєві недоліки - відсутність чітких критеріїв діагностики та акцентуації тільки на порушення вищих психічних функцій, при тому, що спектр взаємопов'язаних неврологічних і нейропсихологічних розладів при цереброваскулярній патології значно ширше. Таким чином, термін «дисциркуляторна енцефалопатія» вважається більш патогенетично і клінічно виправданим.

Залежно від етіології виділяють атеросклеротичну, гіпертонічну, венозну, змішану (при поєднанні декількох етіологічних факторів) хронічну ішемію мозку. В основі патогенезу – артеріальна судинна мозкова недостатність: патологія екстракраніальних відділів магістральних артерій внаслідок атеросклеротичного, артеріосклеротичного, запального, ангіоматозного,

обмінного ураження цих судин, а також патологія серця. До патогенетичних механізмів ДЕ відносять не тільки порушення венозного відтоку, ангіоспазм, а й повторні мікротромбози, мікроемболії, мікрогеморагії, що формують інсульти. Таким чином, ДЕ виникає при різних захворюваннях, але має багато спільного як в характері клінічних проявів, так і в перебігу, однак її особливості залежать від етіологічного чинника [91,92].

Провідним етіологічним чинником патологічних процесів в постменопаузі є синдром гіпоестрогенемії: гормональна секреція яєчників зупиняється, замінюючись надниркової секрецією і стійким високим рівнем гонадотропінів. Відомо, що існує патогенетичний зв'язок між синдромом гіпоестрогенемії і формуванням атерогенних дисліпідемій, патологією гемостазу, а також розвитком артеріальної гіпертензії та атеросклерозу судин ГМ і серця, клімактеричного синдрому (КС) [93,94]. Вважають, що зміни у функціональному стані нервової системи при патологічному перебігу клімаксу є свідченням наростання процесів збудження і ослаблення процесів гальмування. Таким чином, головними факторами патогенезу КС розглядають підвищене збудження гіпоталамічних центрів і лабільність механізмів регуляції вегетативних відділів нервової системи і системи кровообігу, що виникає внаслідок цього.

Поява багатьох клінічних симптомів, характерних для порушення функції вегетативних відділів нервової системи, дозволяє стверджувати, що реакція дезадаптації або стресу при КС, визначається діяльністю як периферичних механізмів за участю глюкокортикоїдів і катехоламінів мозкового відділу кори надниркових залоз, так і центральних нейромедіаторів, що контролюють синтез і вивільнення кортиколіберіну в нейросекреторних клітинах гіпоталамуса. При КС відзначена також різноспрямованість зміни рівнів пролактину і тиреотропного гормонів [95].

Таким чином, ряд симптомів при КС виникають не стільки від нестачі або надлишку певних гормонів, скільки від розбалансованості нейроендокринної системи. Крім того, завдяки особливостям будови і кровообігу гіпоталамуса, в

клімактеричному періоді організм знаходиться в стадії морфологічної та функціональної інволютивної перебудови і дуже вразливий для стресових факторів і інфекційних агентів [96].

У клімактеричному періоді у жінок спостерігається значне збільшення частоти гострих і хронічних порушень мозкового кровообігу атеросклеротичного та гіпертонічного ґенезу. ДЕ при гіпертензії виникає внаслідок розвитку судинної дисциркуляції, гемодинамічних порушень, гіпоксії. Остання на перших етапах може викликати реакції нейродинамічного характеру, а потім індукує структурні зміни в тканинах мозку. Викликані ішемією зміни пов'язані з виходом в екстрацелюлярний простір нейротрансмітерів, головним чином збуджуючих амінокислот і катехоламінів, та взаємодію їх з відповідними рецепторами [97].

В основі клінічних проявів доінсультних стадій цереброваскулярних захворювань, до яких відносять початкові прояви недостатності мозкового кровообігу і ранні форми ДЕ, лежить недостатнє гемодинамічне забезпечення підвищеної функціональної активності мозку, що можна пояснити неефективністю компенсаторно-пристосувальних реакцій [98]. Облігатними симптомам ДЕ є головний біль, запаморочення, дратівливість, зниження пам'яті і працездатності, швидка стомлюваність, поганий сон, біль в шийному відділі, непереносимість фізичних навантажень. ДЕ проявляється морфологічними змінами як в судинах, так і в паренхімі мозку. При довготривалій артеріальній гіпертензії (АГ) змінюється конфігурація внутрішньомозкових та екстракраніальних артерій, порушується їх еластичний каркас, відбувається фрагментація внутрішньої еластичної мембрани з деструкцією м’язового шару, гинуть гладком’язові волокна. При цьому порушується проникність судин, виникають плазморагії, гіаліноз або фібриноїдний некроз, що призводить до склерозування з наступним звуженням і закриттям просвіту судини, формуванням лакунарного стану та лейкоареозу [99]. Навколо судин, в результаті загибелі нервової тканини, формуються периваскулярні лакуни. Таким чином розвиваються дифузні дрібновогнищеві зміни мозкової тканини,

що зумовлюють прогресуючу атрофію підкіркової білої речовини півкуль ГМ при відносній інтактності кори і наростання порушень функції ГМ.

Розвиток фільтраційного набряку мозку призводить до підвищення внутрішньотканинного тиску, в результаті чого стискається мікроциркуляторне русло мозкових артерій, виникає ішемія мозку. Найбільш вразливими є артеріо-артеріальні анастомози, які представлені в потиличній зоні, тому для гіпертонічних кризів характерні потиличні болі і зорові симптоми [100].

Важлива роль в зниженні мозкового кровообігу відводиться структурній перебудові, адаптації судин до підвищення артеріального тиску спочатку у вигляді гіпертрофії м'язової оболонки, а потім проліферації сполучнотканинних елементів і склерозу судин, що веде до підвищення ригідності і звуження просвіту судин. При тривалому підвищенні артеріального тиску судини стають звивистими, деформуються, виникають міліарні аневризми, які становлять реальну загрозу розриву артерії і крововиливу в мозок [101].

За даними багатьох досліджень при ДЕ, що виникла на фоні АГ, у 89% пацієнтів спостерігається венозний застій. При прогресуванні процесу відбувається вичерпування компенсаторних адаптаційних можливостей колатерального венозного відтоку, що сприяє поглибленню венозної дисциркуляції, виникненню внутрішньочерепної гіпертензії та гідроцефалії із наступною атрофією головного мозку [102].

Бурцев Є. М. [103] запропонував класифікацію ДЕ з виділенням I (початкової) стадії бездефіцитарної психопатологічної симптоматики, II А і II В стадії з наявністю клінічного прихованого або маніфестного нервово-психічного дефекту, III стадії з проявами паркінсонізму, псевдобульбарного синдрому, деменції. За даними МРТ і КТ при I стадії визначаються розширення субарахноїдальних просторів і шлуночків мозку, перивентрикулярна атрофія, рідше – субкортикальний лейкоареоз. В II стадії ДЕ з’являються ознаки дифузної і локальної атрофії мозкової тканини, розширення шлуночкової системи, лейкоареоз, лакунарні інфаркти в підкіркових вузлах. III стадія хронічної ішемії мозку характеризується повторними інсультами, минущими

порушеннями мозкового кровообігу, тяжкими формами гіпертонічної хвороби з частими церебральними гіпертонічними кризами. Домінують ознаки ураження окремих областей мозку з вираженою дифузною патологією. Формуються синдроми: псевдобульбарний, пірамідний, атаксичний, судинного паркінсонізму, деменції, які, як правило, поєднуються. Лабораторні дослідження свідчать про прогрес ліпідних порушень. Виявляються множинні ураження магістральних артерій головного мозку з наявністю гемодинамічно значущих стенозів і нерідко оклюзії.

Повторні гострі епізоди порушення мозкового кровообігу призводять до лакунарного стану мозку. Крім гострих повторних порушень розвиваються явища хронічної ішемії, маркером якої є розрідження перивентрикулярної або субкортикальної білої речовини – лейкоареоз, який патоморфологічно є зоною демієлінізації, гліозу і розширення периваскулярних просторів. Разом з множинними дрібновогнищевими змінами в білій речовині півкуль мозку виявляються його дифузні зміни (персистуючий набряк, деструкція мієлінових волокон, спонгіоз і т. ін.) Особливості клінічних проявів ДЕ визначаються характером ураження мозку і переважним стражданням його глибинних відділів, що призводить до роз'єднання коркових і підкоркових структур. Це зумовлює домінуючу роль когнітивних розладів і складних порушень рухового контролю в клінічній картині ДЕ. Залежно від ступеня проявів когнітивних порушень виділяють три стадії ДЕ: легку, помірну та дементну [104].

Внаслідок хронічного порушення мозкового кровообігу виникають також значні порушення в системі біоенергетичного гомеостазу: в процесах окислювального фосфорилювання, гліколізу, пентозофосфатного циклу, ПОЛ, що впливає на церебральну гемодинаміку, посилює гіпоксію та призводить до структурних порушень та порушення загальної чутливості [105].

Таким чином, в результаті дії етіопатогенетичних чинників і структурних змін ГМ при ДЕ розвиваються неврологічні, когнітивні (зниження уваги, концентрації, порушення оперативної пам'яті, зниження розумової працездатності та ін.) та емоційні розлади [106,107].

У жінок в постменопаузальному віці виділяють два основних типи перебігу ДЕ – сприятливий і несприятливий. Сприятливий тип перебігу ДЕ частіше зустрічається у жінок з фізіологічним клімаксом. Значущими чинниками ризику несприятливого перебігу ДЕ є клімактеричний синдром, постоваріоектомічний синдром, дисфункціональні маткові кровотечі клімактеричного періоду, гіпотиреоз, гіпоталамічний синдром, цукровий діабет, а також артеріальна гіпертензія, ішемічна хвороба серця, остеохондроз шийного відділу хребта, надлишкова маса тіла, психоемоційне напруження, атерогенні дисліпідемії [97].

Отже, патогенетичні механізми судинних розладів мозкового кровообігу, що виникають в постменопаузальному віці, досить різноманітні, стосуються багатьох сторін нейрогуморальних взаємовідносин в організмі, але в даний час залишаються недостатньо вивченими, тому вимагають подальшого дослідження і пошуку шляхів їх комплексної коррекції.

1.2.2 Принципи та можливості терапії дисциркуляторної енцефалопатії в постменопаузі

Проблема ефективного і адекватного лікування ДЕ в постменопаузальному періоді є однією з пріоритетних у сучасній ангіоневрології і визначається її соціальною та економічною значущістю. Дана патологія є фактором ризику розвитку інсультів і причиною неврологічних і психічних розладів, які суттєво погіршують якість життя жінки, знижують працездатність і можуть привести до інвалідності. Основна причина важких наслідків ДЕ – не завжди правильно підібране лікування, яке б враховувало особливості перебігу даної коморбідної патології [26].

Одними з чинників розвитку ДЕ, які особливо інтенсивно впливають на здоров'я жінки в перименопаузальном віці, є дисфункція ендотелію і порушення метаболічних процесів, що погіршують реологічні властивості крові і виникають завдяки характерному для цього віку естрогенному дефіциту, який

обтяжує клінічні прояви ДЕ і знижує якість життя [93,108]. У патогенезі гострих і хронічних церебральних ішемій важливу роль відіграють також порушення метаболізму нейромедіаторів і нейротрансмітерів [109,110]. Ці порушення у жінок в постменопаузі ускладнюються ефектами естрогенної недостатності, оскільки відомо, що статеві гормони чинять складну і різноманітну дію на центральну нервову систему як опосередковану рецепторними структурами гіпоталамуса, так і безпосередньо шляхом зміни обміну нейромедіаторів. Природний процес нейроендокринної перебудови напружує адаптаційні механізми, тому дія додаткових несприятливих факторів може призводити до зриву адаптації, появі як соматовегетативних, так і психічних порушень, про що свідчить збільшення числа соматичних і психічних захворювань вже в період перименопаузи [111-113].

Таким чином, висока частота виникнення ДЕ у жінок в постменопаузальному віці ставить завдання пошуку патогенетично спрямованого лікування цієї патології з одночасною дією як на стан хронічного порушення мозкового кровообігу, так і на клімактеричні розлади.

Вважається, що найбільш ефективним патогенетично обгрунтованим методом лікування клімактеричних розладів та профілактики обмінних порушень є замісна гормональна терапія (ЗГТ) [94,108]. Для цього використовують натуральні естрогени (естрадіолу валерат, 17 - естрадіол, кон'юговані естрогени, естріол) в комбінації з гестагенами або андрогенами. Однак тривала замісна гормональна терапія, особливо розпочата в пізньому періоді життя, може підвищувати ризик раку молочної залози, частоту серцево-судинних захворювань: тромбозів, тромбоемболії, інфарктів, інсультів [114,115]. Тому медикаментозна гормональна терапія вважається частиною загальної стратегії, що включає рекомендації з лікування ДЕ, проте має обмеження до призначення і суттєву вірогідність розвитку ускладнень.

Лікування хворих на ДЕ є комплексним і включає заходи, спрямовані на корекцію основного судинного захворювання, профілактику повторних церебральних дісгемій, відновлення кількісних і якісних показників мозкового

кровотоку і нормалізації порушених функцій ГМ. Досягнення зазначених цілей визначає необхідність проведення лікування церебральних судинних порушень у жінок в постменопаузальному віці препаратами, що мають вазоактивну, ноотропну, антігіпоксантну, антиагрегантну, нейротрансмітерну, нейротрофічну і нейромодуляторну дії.

Засобами вибору в лікуванні ДЕ вважаються [21]:

– інгібітори ангіотензинперетворюючого ферменту (АПФ), під впливом яких відновлюється ендотелійзалежна регуляція, відбувається зворотний розвиток гіпертрофії міокарда і зменшення товщини резистивних артеріол;

– α- і β-адреноблокатори з мембраностабілізуючою активністю, що гальмують натрієві канали клітинних мембран і беруть участь в утворенні потенціалу дії;

– антагоністи кальцію, що, інгібують надходження кальцію в збудливі клітини, знижують тонус гладеньких м'язів судин та збільшують мозковий кровок;

– діуретики, які посилюють виведення натрію і калію з сечею, збільшують діурез і знижують обсяг циркулюючої крові і венозне повернення;

– антиагреганти, що пригнічують агрегацію тромбоцитів, зменшують в'язкість крові та підвищують деформабельність еритроцитів, нормалізуючи реологічні властивості крові .

– препарати для корекції гіперхолестеринемії;

– антиоксиданти [116,117];

– гормональні препарати: ЗГТ [108,118,119];

– церебральні вазодилататори, вазоактивні препарати;

– ноотропні препарати: покращують окислювальний метаболізм в умовах ішемії, перешкоджають різкому зниженню рівня АТФ, стимулюють активність аденілаткінази, знижують викид нейротрансмітерів в умовах ішемії, зменшують агрегацію тромбоцитів, в'язкість крові і спазм судин [120,121];

– транквілізатори, які призначають при проявах неврозоподібного синдрому;

– комплекси вітамінів та фізіотерапевтичні процедури;

Таким чином, механізми впливу лікувальних факторів комплексної терапії ДЕ в ПМП спрямовані на нормалізацію артеріального тиску і

гемодинаміки, відновлення гормональної регуляції поліпшення мікроциркуляції та оптимізацію обміну речовин в тканині мозку. При розгляді основних схем лікування ДЕ звертає на себе увагу їх громіздкість, що в сучасному розумінні інтерпретується як фармагресія з негативними наслідками і реакціями організму жінки похилого віку, що страждає на ДЕ. Незважаючи на широкий спектр медикаментозних і немедикаментозних методів лікування ДЕ, терапевтичний ефект досягається не завжди. Використання ЗГТ в загальній схемі лікування ДЕ у жінок в постменопаузі обмежено наявними протипоказаннями до її призначення. Таким чином, у зв'язку з прогресивним збільшенням тривалості життя і зростаючою потребою забезпечити необхідний рівень її якості виникає потреба в безпечних та ефективних методах лікування ДЕ в ПМП.

1.3 Нейрофізіологічні процеси в постменопаузі і роль біологічно активних речовин в їх регуляції

1.3.1 Патогенетичні зміни в організмі жінки в постменопаузі, що обумовлюють розвиток дисциркуляторної енцефалопатії

Сенильно-інволютине виключення циклічної функції гонад тягне за собою цілий ряд істотних змін в нейроендокринному статусі організму жінки. Найбільші зміни зазнає гіпоталамо-гіпофізарно-яєчникова система: підвищується поріг чутливості гіпоталамуса до естрогенів, зростають рівні ФСГ і ЛГ. Циклічна активність репродуктивної системи в постменопаузі припиняється, але не повністю: яєчники виробляють як андрогенні попередники, так і естрогени. Змінюється співвідношення естрогенів, основним стає найменш активний – естрон, що утворюється з андростендіону, його концентрація в плазмі крові жінок в постменопаузі в 3-4 рази більше, ніж естрадіолу [119]. Коли відбувається швидке зниження рівня естрогенів, у жінок частота розвитку артеріальної гіпертензії і кардіалгій зростає в два рази,

відзначається наявність тривожності, депресії, вегетативної дисфункції. Оскільки естрогени впливають на тонус судин, стимулюючи утворення ендотелієм оксиду азоту (NO) і перешкоджаючи дії на судинну стінку ангіотензину II, то дефіцит естрогенів розглядається причиною виникнення дисфункції ендотелію і вазомоторних розладів [118,119,122]. Виникнення серцево-судинної патології пов'язують також зі змінами в системі згортання крові при дефіциті естрогенів [119].

Під час менопаузи наступає розбалансування функції яєчників та тиреоїдної системи, зменшується стимулюючий вплив естрогенів на продукцію тиреоїдних гормонів та зростає частота виникнення гіпотиреозу. Це пов’язують з наявністю у тканині щитоподібної залози естрогенових рецепторів, які реагують на гіпоестрогенію [123]. Вважається, що зміни функціонального стану гіпофізарно-тиреоїдної системи та ліпідного спектру крові в постменопаузі можуть впливати на розвиток ішемічної хвороби серця [122,124].

Особливістю періоду інволюції репродуктивної системи є зміна рівня продукції гонадотропінів гіпофізом. Максимальне підвищення гонадотропінів відбувається вже через 3 роки після менопаузи і є наслідком зниження секреції статевих гормонів Висловлюються припущення про те, що гонадотропіни в постменопаузі втрачають біологічну активність в результаті дисоціації їх молекул на біологічно неактивні субодиниці [95].

Згідно з сучасними даними, в періоді клімактерію відбувається зниження глюкокортикоїдної і андрогенної функції надниркових залоз при зростаючій адренокортикотропній функції гіпофіза. Це свідчить про дискоординацію взаємодії в системі гіпоталамус – гіпофіз – кора надниркових залоз, а також про вікові зміни біологічних властивостей адренокортикотропного гормону (АКТГ) за аналогією з гіпотезою втрати біологічної активності гонадотропінів в постменопаузі. Зниження функції гонад за принципом зворотного зв'язку призводить до максимальної активності гіпофізу [94,95]. Визначальну роль в гіпоталамічній регуляції тропних функцій гіпофізу відіграє взаємодія трьох груп біологічно активних сполук: адренергічних сполук, катехолестрогенів,

опіоїдних і опіатних пептидів. Нейрони, які виробляють ці пептиди, локалізуються в тій же області гіпоталамуса (аркуатних ядрах), де і гонадоліберин-нейрони, і мають з ними тісний контакт. Загальноприйнятою нині точкою зору є уявлення про те, що катехоламінергічні речовини – необхідні компоненти системи стимуляції синтезу і секреції гіпоталамічних факторів (ліберинів) [125]. Катехолестрогени можуть виступати в якості буферної системи, змінюючи функціональну активність гіпоталамуса: зниження секреції естрогенів в період клімактерію призводить до дефіциту катехолестрогенів, що утворюються з них, до підвищення «адренергічного» тонусу гіпоталамусу і збільшення продукції гонадоліберину [95].

Оскільки гіпоталамус є структурою, не тільки пов'язаною з ендокринними функціями організму, а й центром, що регулює вегетосудинні реакції організму, підвищення його «адренергічного» тонусу може стати причиною появи у жінок в пре- і постменопаузальному періодах вегетосудинної гіперреактивності і ряду інших симптомів, характерних для клімактеричного синдрому [126,127].

На тлі дефіциту естрогенів в клімактерії із зменшенням продукції як катехолестрогенів, так і опіоїдних і опіатних пептидів, створюються сприятливі умови для підвищення «адренергічного» тонусу гіпоталамуса, з одного боку, і зняття блокади гіпоталамічного індуктора опіатами і опіоїдами – з іншого, що проявляється у вигляді гіперпродукції ЛГ і, як наслідок цього, гонадотропінів.

У зв'язку з патофізіологічними системними зрушеннями в періоді климактерію виникає ризик розвитку патологічних станів, які є наслідком як дефіциту естрогенів (КС, дистрофічні захворювання нижніх відділів сечостатевої системи, системний остеопороз, атеросклеротичні зміни серцево-судинної системи), так і підвищеної продукції статевих гормонів (гіперпластичні процеси і пухлини гормонозалежних органів). Одним з наслідків естрогендефіцітного стану в постменопаузі є збільшення частоти серцево-судинної патології, зумовленої атеросклерозом (ішемічна хвороба серця, порушення мозкового кровообігу, артеріальна гіпертензія). Виникнення серцево-судинної патології патогенетично пов'язане з підвищенням рівня

холестерину, тригліцеридів, ліпопротеїдів низької і дуже низької щільності, зниженням рівня ліпопротеїдів високої щільності, збільшенням згортання крові і зниженням антикоагулянтного потенціалу системи гемостазу [128], що провокує виникнення ДЕ.

Розвиток ішемічної хвороби серця, атеросклеротичного ураження судин і порушення мозкового кровообігу в постменопаузі пов’язують зі зміною взаємовідношення ангіотензин-альдостеронової системи і жіночих статевих гормонів: підвищується активність реніну в плазмі та пов'язана з ним продукція ангіотензину II (АТII), втрачається інгібуючий вплив естрогенів на експресію рецепторів АТII типу 1, розвивається дизбаланс між рівнями вазоактивних факторів – оксидом азоту (NO) і АТII [124] Таким чином, відбувається порушення функції ендотелію судин зі збільшенням рівня вазоконстрикторів та зниженням рівня вазодилататорів. Доведено, що гіпоестрогенія корелює також із підвищенням рівня тригліцеридів, та гемостатичних факторів [127].

При вивченні клінічних проявів клімаксу виявлена висока частота змін психоемоційної сфери в порівнянні з нейровегетативними і метаболічними порушеннями. Подібні розлади пов'язані з астенізацією нервової системи, що є одним з найбільш частих проявів гіпоталамічних порушень внаслідок дизбалансу адаптаційних і компенсаторних механізмів. Важливу роль у розвитку інволюційної психічної патології у жінок відіграє порушення динамічної рівноваги провідних нейромедіаторних систем ГМ, гетерохронність компенсаторних процесів з формуванням гіперчутливості окремих структур лімбіко-ретикулярного комплексу до ендо- і екзогенних сигналів. Розглядається внесок сенільних змін епіфіза, наслідком чого є зниження рівня мелатоніна, який обумовлює циклічність продукції регуляторних сполук, зокрема статевих гормонів та гонадотропінів, в розвиток неврологічних і психоемоційних порушень у жінок в постменопаузі [129].

Вважають, що основою формування тривожно-депресивної симптоматики в постменопаузі є порушення обміну біогенних амінів, ендогенну інтоксикацію організму продуктами ПОЛ та дисциркуляторні

процеси, які взаємно індукуються і лежать в основі порушення внутрішньомозкового гомеостазу [130,131].

Поступово прогресуючи, дисциркуляторні порушення сумісно з метаболічними порушеннями, виснаженням резервних можливостей симпатоадреналової системи у вигляді достовірного падіння екскреції дофаміну, збільшенням енергетичної щільності повільно-хвильових компонентів ЕЕГ, що характеризує наростання органічних змін з боку ГМ, забезпечують формування розладів ЦНС [132]. Позитивний ефект ЗГТ в їх лікуванні у жінок з клімактеричним синдромом свідчить про важливу роль естрогенної недостатності в патогенезі таких розладів.

Дефіцит естрогенів – частина інволюційних процесів в організмі жінки в постменопаузі і розцінюється, як закономірний фізіологічний процес, хоча грає патогенетичну роль в ушкодженні багатьох органів і систем організму. Різні симптоми, пов'язані із згасанням функції яєчників, в тому числі і ДЕ, спостерігаються більш, ніж у 70 % жінок в Україні [133]. Зважаючи на розлад в нейромедіаторних системах ГМ, викликаний гормональним дизбалансом, особливої уваги при розробці методів лікування ДЕ, як постменопаузального стану обміу нейротрансмітерів та інших нейроактивних речовин заслуговує пошук методов коррекції ДЕ в ПМП на основі комплексу гормональних нейротропних сполук, яким може, на нашу думку, бути використання для цієї мети кріоконсервованих експлантів плацентарної тканини.

1.3.2 Вплив статевих гормонів на нейротрансмітерні системи

Загальновизнаним в терапії неврологічних захворювань, включаючи ДЕ, є вплив на нейротрансмітерні системи, оскільки міжнейрональна комунікація в нервовій системі базується на зміні електричних і хімічних процесів, які забезпечують синаптичну передачу інформації. Вивільнення в синапсах

нейротрансмітерів істотно відрізняється від ендокринних сигналів. Нейромедіатори (нейротрансмітери) передають нервові імпульси через синапси хімічним шляхом, синтезуючись в тілі нейрона і транспортуючись по аксону до кінцевих цибулин, де і накопичуються. Поряд з синаптичною, в тому числі паракринною трансмісією, в основі якої лежать зміни мембранного потенціалу, нейрони здатні генерувати і отримувати різні сигнали через мережу біохімічних реакцій, які можуть не залежати від електричних характеристик клітинних мембран [134].

Існує кілька критеріїв, за якими ту чи іншу речовину можна визначити, як нейромедіатор [129]:

1 .Синтез цієї речовини відбувається в нервових клітинах.

2. Синтезована речовина накопичується в пресинаптичних закінченнях, а після виділення звідти чинить специфічну дію на постсинаптичний нейрон або ефектор.

3. При штучному введенні цієї речовини виявляється такий же ефект, як і після виділення його природним способом.

4. Існує специфічний механізм видалення медіатора з місця його дії.

За своєю хімічною природою нейромедіатори відносяться до різних груп хімічних речовин: біогенних амінів, амінокислот, нейропептидів і т. д. Медіатори поділяють на збуджуючі – ацетилхолін, адреналін, норадреналін та гальмівні – серотонін, глутамінова кислота, γ-аміномасляна кислота (ГАМК). До найважливіших нейромедіаторів мозку відносяться ацетилхолін, норадреналін, серотонін, дофамін, глутамат, ГАМК, ендорфіни і енкефаліни [125].

Встановлено, що ключова збудлива нейротрансмісія в ЦНС здійснюється в основному дикарбоновими амінокислотами глутаматом і аспартатом, які виконують функцію нейрональних трансміттерів в 40% всіх синапсів ГМ. Показано, що взаємодія цих збуджуючих нейротрансміттерів зі специфічними мембранними рецепторами відповідальна за здійснення багатьох найважливіших функцій мозку, таких як пам'ять, когнітивні, рухові і чутливі

процеси. Основним збудливим трансміттером в мозку людини вважається глутамат (глутамінова кислота), який виконує велику кількість різноманітних метаболічних функцій [134].

Деякі амінокислоти виявлені в ЦНС в досить високих концентраціях, що і викликало припущення про їх медіаторні функції. Вважається, що вони використовуються в системах великих аферентних і еферентних шляхів (збудливих і гальмівних), на відміну від ацетилхоліну і катехоламінів, є медіаторами в периферичній вегетативній нервовій системі. ГАМК синтезується тільки в нервовій системі з глутамінової кислоти при посередництві глутаматдекарбоксилази. Вона зустрічається в ЦНС всюди, в самих різних концентраціях, бере участь в пресинаптичному гальмуванні в якості медіатора в аксон-аксон синапсах. Широко поширена амінокислота гліцин також в деяких випадках служить медіатором постсинаптичного гальмування в спинному мозку. Виділення нейромедіаторів пресинаптичними закінченнями нейронів нагадує секрецію ендокринних залоз, що виділяють в кров свої гормони. Але гормони зазвичай діють на клітини, які знаходяться на відстані від самої залози, тоді як мішенями для нейротрансмітерів є тільки постсинаптичні нейрони. Іноді дія медіатора не обмежена тільки сусідньою клітиною, в таких випадках він діє, як модулятор з досить широким спектром дії. Окремі нейрони виділяють свій продукт в кров, тоді він діє, як нейрогормон. Незважаючи на те, що за своєю хімічною природою нейромедіатори істотно відрізняються, результат їх впливу (збудження або гальмування) на постсинаптичні клітини визначається не хімічною структурою, а типом іонних каналів, якими медіатор управляє за допомогою постсинаптичних рецепторів [135].

Молекули нейроактивних пептидів – це більш-менш довгі ланцюги амінокислот. Вважається, що речовина, яка служить медіатором у первинних аферентних волокнах в спинному мозку, є нейроактивним пептидом. Деякі з нейроактивних пептидів є нейрогормонами, тобто речовинами, які вивільняються з нервових клітин, а потім переносяться кровотоком до

відповідних мішеней (які не є нейронами). До таких пептидів відносяться ліберіни (рилізинг-гормони), які діють на аденогіпофіз, антидиуретичний гормон (вазопресин) і окситоцин, які синтезуються в гіпоталамусі. Ще одна група пептидів впливає на активність нейронів не посередництвом синапсів, а коли вони присутні в якості гормонів, наприклад, ендорфіни. Такі пептиди євважаються нейромодуляторами.

Відомим фактом є вплив зниження і дизбалансу рівнів статевих гормонів на ЦНС жінки в постменопаузі, що є результатом порушення балансу нейромедіаторів: серотоніну, норадреналіну, дофаміну, і, прогресуючи в клімактеричному періоді, сприяє розвитку депресивних і тривожних розладів [136,137]. Естрогени впливають на обсяг ядер, число нейронів, морфологію дендритів ГМ, підсилюють його електричну збудливість за рахунок впливу на процес генерації електричного імпульсу в нейронах певних ділянок мозку. Естрогени також впливають на нейротрансмітерні системи і рецепторні механізми, пов'язані із стероїдною активністю естрогенів: захоплення певними нейронами і зв'язування з протеїном специфічного цитозольного рецептора, транспорт стероїд-рецепторного комплексу в ядро і зв'язування активного комплексу зі специфічною ділянкою ДНК [138,139]. Стимулюючий вплив естрогенів на серотонінергічну, норадренергічну, холінергічну нейротрансмітерні системи, їх здатність підвищувати чутливість серотонінових і норадреналінових рецепторів та активність дофаміну приводить до антидепресивного та анксиолітичного впливу [137].

Вивчення обміну біогенних амінів показало значні коливання екскреції катехоламінів, причому в багатьох випадках виявлялася різнобічна спрямованість екскреції гормонів та їх попередників, що відображає гетерохронізм відновлювальних процесів, значну розбалансованість в роботі катехоламінергічної системи [131].

Специфічні внутрішньоклітинні рецептори до прогестерону виявлені в корі ГМ, гіпоталамусі, гіпокампі, до естрогену – в мигдалеподібному ядрі і гіпоталамусі [140]. Крім того, що мозок є органом-мішенню для статевих

гормонів, виявлено, що розвиток, реорганізація та здатність ГМ до відновлення можуть контролюватися статевими гормонами [141,142].

Було показано, що функціональний центральний дефіцит серотоніну, норадреналіну і дофаміну в специфічних синаптичних ділянках, особливо в лімбічній системі (мигдалеподібне ядро, гіпокамп, гіпоталамус), викликає розвиток депресії. Достовірна позитивна кореляція між загальною концентрацією естрогенів в плазмі крові і рівнем вільної плазмової фракції триптофану була виявлена у жінок в перименопаузі (триптофан – амінокислота-попередник серотоніну). Взаємодія між естрадіолом і серотоніном мозкової тканини була продемонстрована в дослідженні на оваріоектомованих мишах [143]. Зниження концентрації естрадіолу не тільки збільшувало активність транспортера серотоніну у оваріоектомованих мишей, а й зменшувало розміри їх гіпокампу.

Ще одним механізмом впливу естрогенів на обмін нейротрансмітерів є їх вплив на моноаміноксидази (МАО). Естроген викликає зниження активності МАО за рахунок посилення її руйнування. Цей процес спостерігали в гіпоталамусі і мигдалеподібному ядрі оваріоектомованих щурів. В результаті зниження рівня МАО типу А за рахунок введення естрогену базовий рівень серотоніну і норадреналіну підвищувався [144].

Біогенні аміни, такі як норадреналін, дофамін і серотонін, відіграють важливу роль у лікуванні неврологічних, психоемоційних, когнітивних розладів. Поведінкові та нейрохімічні тести, проведені на щурах, показали, що клонідин викликав депресію та уповільнення реакції в тесті рухової активності, а також значне пригнічення метаболізму моноамінів в лобовій корі, гіпоталамусі і стриатумі [145]. Здатність естрогенів підвищувати рівень норадреналіну може вказувати на зв'язок між дефіцитом естрогенів і зниженням інтелектуальної активності і настрою.

Крім впливу на серотонін- і норадреналінергічні системи, естроген також діє на холінергічну систему. Введення естрогенів оваріоектомованим щурам підвищувало активність ацетилхолінтрансферази, посилюючи синтез

ацетилхоліну, який відіграє велику роль в процесах пам'яті [140]. Підвищення активності ацетилтрансферази і центральної концентрації ацетилхоліну за допомогою естрогенів пояснює взаємозв'язок між дефіцитом естрогенів та порушеннями пам'яті в пери- та постменопаузі.

На противагу естрогену, прогестерон відомий, як інгібітор мозкової активності. Одним з механізмів, які можуть пояснити прогестероновий антагонізм ефекту естрогенів, є прогестеронзалежне зниження кількості рецепторів до ест радіолу. Прогестерон також чинить стимулюючий ефект на МАО, знижуючи тривалість дії норадреналіна, серотоніна і дофаміна [144].

Таким чином, існує багато механізмів, за допомогою яких естроген і прогестерон впливають на ЦНС. Ці властивості статевих гормонів використовуються в ЗГТ для корекції цілого ряду порушень, пов'язаних з інволюцією репродуктивної системи в постменопаузі. Але ЗГТ має велику кількість протипоказань, тому пошук БАР, які б впливали на нейротрансмітерні системи, імітуючи або блокуючи роботу нейромедіаторів, пригнічуючи дію ферментів, які їх руйнують, або навпаки, перешкоджаючи вивільненню медіаторів, залишається актуальним. З огляду на вищевикладене, розробка, вивчення і застосування нових, патогенетично обґрунтованих методів лікування ДЕ у жінок в постменопаузі з використанням кріоконсервованих плацентарних біопрепаратів, що містять сполуки, яким притаманні властивості корегувати патогенетичні процеси ДЕ в ПМП є актуальним напрямком сучасної медицини.

РОЗДІЛ 2
МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Дизайн дослідження та кількість тварин в експериментальних групах

Основний обсяг досліджень виконано на базі наукових підрозділів Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (м. Харків) відповідно до загальних принципів роботи на тваринах, схвалених Комітетом з біоетики Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (протокол № 4 від 25.11.2014 р.), узгоджених з положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986) [146] та відповідно до Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№ 3447-IV, ред. 04.08.2017) [147].

Протягом всіх експериментів тварини знаходилися при природному освітленні, отримували стандартне для даного виду тварин харчування при питному режимі *ad libitum*. Утримання тварин відповідало діючим правилам по устрою, обладнанню і утриманню віваріїв.

Дизайн дослідження склали наступні 5 етапів:

1. Отримання та кріоконсервування експлантів плаценти людини з оцінкою морфологічної та функціональної збереженості КЕП.
2. Дослідження дії КЕП на культуру нервових клітин головного мозку новонароджених щурів *in vitro:*

а) виділення та культивування нервових клітин ГМ новонароджених щурів:

б) дослідження дії КЕП на отримані нервові клітини;

в) моделювання глутаматіндукованої ексайтотоксичності нервових клітин;

г) визначення нейропротекторної дії КЕП відносно нервових клітин в моделі глутаматіндукованої ексайтотоксичності;

д) дослідження нейротрофічної, відновлювальної дії КЕП відносно нервових клітин в моделі глутаматіндукованої ексайтотоксичності;

е) визначення природи плацентарних сполук шляхом термічного вливу на середовище, кондиційоване з КЕП, з наступним дослідженням його нейропротекторної і нейротрофічної дії.

3. Дослідження дії КЕП на виживання та тривалість життя мишей обох статей (100 білих лабораторних мишей лінії BALB/c 6-місячного віку, по 25 тварин в групі): 1 група – самиці, 2 група – самці, 3 група – самиці з введеним КЕП, 4 група – самці з введеним КЕП.

4. Дослідження біологічної дії КЕП на фізичні показники (загальний оцінювальний бал, вагу, зріст, фізичну силу), орієнтаційно-дослідницьку, анксиолітичну, зоосоціальну поведінку та структури головного мозку піддослідних тварин: 60 білих лабораторних мишей лінії BALB/c, по 10 тварин в групі: 1 група – самиці 6-місячні (молоді), 2 група – самиці 12-місячні (старіючі), 3 група – самиці старіючі з введеним КЕП, 4 група – самці 6-місячні (молоді), 5 група – самці 12-місячні (старіючі), 6 група – самці старіючі з введеним КЕП.

5. Дослідження дії КЕП на перебіг ДЕ в ПМП в експериментальній моделі *in vivo*:

а) моделювання у лабораторних тварин дисциркуляторної енцефалопатії методом оклюзії сонних артерій, постменопаузи за допомогою двохсторонньої оваріоектомії і відповідної коморбідної патології – ДЕ в ПМП;

б) імплантація КЕП піддослідним тваринам з моделями ДЕ, ПМП та коморбідної патології – ДЕ в ПМП;

б) дослідження біологічної дії КЕП на фізичні показникі (загальний оцінювальний бал, вагу, зріст, фізичну силу), орієнтаційно-дослідницьку, анксиолітичну, зоосоціальну поведінку, структури головного мозку (моторну кору півкуль, зубчасту звивину Амонова рогу гіпокампа) піддослідних тварин

експериментальних груп по 10 тварин в групі: 1 група – хибнооперовані самиці (контроль), 2 група – самиці з модельованою оваріоектомією (ОЕ), 3 група – самиці з модельованою ДЕ, 4 група – самиці з моделлю ДЕ в ПМП, 5 група – самиці з моделлю ДЕ в ПМП та імплантованим КЕП.

2.2 Методи кріоконсервування та оцінки збереженності експлантів плаценти

Кріоконсервовані експланти плаценти отримували за методом, розробленим в Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України [38]. Плаценту отримували з інформованої згоди жінок після пологів з дотриманням норм біомедичної етики відповідно до рекомендацій Хельсінської декларації, Всесвітньої медичної асоціації, Етичного кодексу лікаря України, Комітету біоетики ІПК і К НАН України. Експланти плаценти отримували з плацент жінок віком 18-35 років після пологів, що доставляли в біотехнологічну лабораторію через 1-3 години після пологів в умовах вологої камери. Тканину плаценти з материнської сторони розділяли на фрагменти – експланти розміром до 0,5 см, вагою до 1 г і тричі відмивали в середовищі DMEM (BioWest, Франція) в співвідношенні 1:10. Середовищем кріоконсервування слугувало живильне середовище з 10 % диметилсульфоксиду (ДМСО, Sigma - Aldrich, США) і 10 % фосфатно-сольового буферу (PBS), що готували таким чином: до експлантів в середовищі додавали рівний об'єм середовища з подвійною концентрацією ДМСО і PBS. Експозиція біооб'єктів в кріозахисному середовищі становила 10 хвилин при Т = + 4 °С, після чого експланти переносили в кріопробірки («Nunc», США) об'ємом 1,8 мл, охолоджували за допомогою програмованого заморожувача ЗП-10 (ІПК і К НАН України) зі швидкістю 1 град/хв до Т = - 70 °С, потім занурювали в рідкий азот для зберігання при Т = - 196 °С. Розморожування проводили при Т = + 37°С на водяній бані (Micromed, Україна). Після розморожування КЕП тричі відмивали від кріопротектора в живильному

середовищі DMEM в співвідношенні 1:5 протягом 10 хвилин. Після обстеження з 10 плацент в роботу взято 6, з кожної виготовлено по 20 зразків, досліджували збереженість 3 зразків з кожної плаценти. Структурну збереженість визначали гістологічно забарвленням гематоксиліном і еозином [148], функціональний стан за МТТ-тестом [149] та тестом поглинання глюкози з середовища культивування (з використанням комерційного набору «Глюкоза Liquid 500 C» (Erba Lachema s.r.o, Чехія) у відповідності до інструкції виробника). Деконсервовані експланти плаценти, що за наведеними показниками вірогідно не відрізнялись від експлантів плаценти до кріоконсервування, було визначено в якості експериментального матеріалу і викорстовувалися для імплантації піддослідним тваринам в подальших дослідженнях.

2.3 Методи дослідження нейропротекторної та нейротерапевтичної дії кріоконсервованих експлантів плаценти *in vitro*

Визначення нейротропної дії КЕП на культуру нервових клітин новонароджених щурів *in vitro* проводили дослідженням їх стану після впливу середовища, кондиційованного з КЕП.

Первинну суспензію клітин ГМ отримували шляхом ферментативно-механічної дезагрегації тканини ГМ новонароджених щурів [150] протягом 15 хвилин в 0,25 % розчині трипсину на фосфатно-сольовому буфері (PBS) при 37 °С. Нервові клітини виділяли раніше розробленим методом, згідно з яким для ізольованих клітин в культурі характерна експресія β-тубуліну III, маркеру нейронів, нестину, маркеру нейральних СК, віментину, маркеру нейральних прогеніторних клітин, і GFAP, маркеру клітин глії [151,152]. Нервові клітини культивували в 6-лункових планшетах ("SPL", Корея) в середовищі DMEM з високим вмістом глюкози і L-глутаміну ("BioWest", Франція), збагаченому 10 % фетальної бичачої сироватки ("Lonza", Німеччина) в концентрації 2000000 клітин/мл до формування суцільного моношару, після чого моношар відкріпляли, клітини пересівали і культивували в концентрації 20000

клітин/лунку протягом 2 діб. Культивування проводили в CO_2 - інкубаторі при + 37°С в атмосфері 5 % CO_2. Через 5 діб неадгезовані клітини видаляли промиванням PBS. Решту адгезованих клітини знімали сумішшю 0,25 % трипсину і розчину Версена в співвідношенні 1:1, переносили в 96-лунковий планшет в концентрації 20000 клітин/лунку на 1 добу для прикріплення. Для експерименту було обрано культуру, яка містить різні клітини ГМ, оскільки механізми ушкодження і регенерації розглядаються рядом авторів, як процеси взаємодії нейронів з глією [153].

Середовище, кондиційоване з КЕП, отримували раніше розробленим методом [154]. Для цього по 10 мг КЕП культивували 1 добу в 24-лункових планшетах (SPL, Корея) в 1 мл середовища DMEM з високим вмістом глюкози і L-глутаміну (BioWest, Франція), збагаченого 10 % PBS (Lonza, Німеччина) в CO_2 -інкубаторі при 37 °С в атмосфері 5 % CO_2. Клітини ГМ новонароджених щурів інкубували в середовищі, кондиційованому з КЕП протягом 1 доби, після чого оцінювали їх метаболічну активність за допомогою МТТ-тесту.

Визначення нейропротекторного та нейротерапевтичного впливу КЕП на нервові клітини проводили в моделі глутамат-індукованої ексайтотоксичності, яка відповідає стану метаболічних порушень і виснаження нервових клітин при дициркуляторній енцефалопатії.

Ексайтотоксичність – цитотоксичність, властива збуджуючим нейротрансмітерам, таким, як глутамат і аспартат. Вважають, що в механізмах загибелі нейрональних систем при ішемії, нейродегенеративних захворюваннях беруть участь процеси ексайтотоксичності. Відповідно до цієї теорії, відбувається надлишковий викид в постсинаптичну щілину збуджуючих нейромедіаторів, що призводить до гіперактивації постсинаптичних глутаматних рецепторів і порушення проникності йонних каналів. Накопичення внутрішньоклітинного кальцію запускає каскад реакцій з активацією протеолітичних ферментів і руйнуванням клітинних структур, призводить до збільшення синтезу оксиду азоту, зростання ПОЛ з наступним розвитком окисного стресу і порушенням синтезу нейротрофічних чинників [155]. На

першій стадії ішемії мозку виникають зворотні функціональні зміни, перш за все, зворотна блокада синапсів. При тривалій ішемії розвиваються незворотні пошкодження нейронів, які гинуть за механізмом некрозу і апоптозу.

Глутамат-опосередкована токсичність є одним з механізмів ушкодження нейронів при різних захворюваннях, в тому числі ішемії, ДЕ, травмах ГМ і нейродегенеративних патологіях. Ці захворювання зустрічаються в першу чергу серед дорослого населення у віці 60-65 років, при цьому для жінок різке збільшення захворюваності пов'язано з настанням менопаузи [156].

Цитотоксичність моделювали інкубацією клітин ГМ новонароджених щурів в середовищі з додаванням 0,2, 2, 5, 10 або 20 мМ глутамату протягом 1 доби для визначення ефективної ексайтотоксичної дози глутамату. В результаті, для моделювання глутаматної ексайтотоксичності нервові клітини переносили в 96-лунковий планшет в концентрації 20000 клітин/лунку на 1 добу для прикріплення, після чого середовище замінювали на свіже з додаванням глутамату (Sigma, США) в кінцевій концентрації 10 мМ і інкубували 1 добу в тих же умовах.

Після цього замінювали середовище культивування на середовище DMEM, кондиційоване з КЕП для визначення можливої відновлювальної, нейротрофічної дії КЕП.

У серії експериментів для визначення можливої нейропротекторної дії КЕП глутамат додавали в середовище культивування клітин після їх попередньої інкубації в середовищі, кондиційованому з КЕП, що містить чинники плацентарного походження.

Проводили також експерименти, метою яких було встановити природу біологічно активних чинників плацентарного походження, що містяться в КЕП. Середовище, в котрому попередньо культивувалися КЕП, нагрівали протягом 10 хвилин до 95° С, відповідно до літературних даних по дослідженню нейропротекторних властивостей тканинних чинників [157], та після охолодження до кімнатної температури проводили дослідження по виявленню нейротротекторної і нейровідновлювальної дії такого середовища методами,

описаними вище в моделях глутаматіндукованої ексайтотоксичності нервових клітин головного мозку новонароджених щурів в умовах *in vitro.*

В усіх серіях експериментів стан нервових клітин ГМ новонароджених щурів за їх метаболічною активністю після 1 доби культивування оцінювали за допомогою МТТ-тесту шляхом фарбування метилтіазолілдифеніл-тетразоліум бромидом (МТТ) ("Sigma", США). Лунки промивали двічі PBS, середовище замінювали свіжим, додавали МТТ (Sigma, США) в кінцевій концентрації 0,5 мг/мл. Інкубували 4 години, після чого середовище відбирали, кристали формазану розчиняли 10 % SDS в диметилсульфоксиді (Sigma, Франція). Абсорбцію вимірювали на планшетному спектрофотометрі Utrao SM600 (Китай) при довжині хвилі 570 нм. При цьому показник МТТ-тесту для клітин, що не піддавалися впливу плацентарних чинників, брали за 100%. Контрольні клітини культивували в середовищі DMEM.

2.4 Методи дослідження біологічної дії кріоконсервованих експлантів плаценти *in vivo*

Визначення можливості корекції порушень на організменному рівні при дисциркуляторній енцефалопатії в постменопаузі потребує системних досліджень *in vivo* на моделі означеної патології. При цьому важливим є виявлення впливу можливих саногенетичних чинників, в даному дослідженні – кріоконсервованих експлантів плаценти, на такі інтегральні показники, як тривалість та якість життя, фізичний стан, а також на прояви притаманних ДЕ в ПМП порушень ЦНС шляхом дослідження когнітивно-мнестичних функцій, зоосоціальної активності, стресостійкості експериментальних тварин. Виявлення порушень в структурах головного мозку, які відповідають за означені функції, верифікує отримані дані, тому гістологічне дослідження моторної кори півкуль головного мозку, зубчастої звивини Амонова рогу гіпокампа є доцільним в даній роботі.

Передбачуваний вплив імплантації КЕП на ефекти гіпоксії/ішемії мозку в експериментальній моделі ДЕ в постменопаузі пов'язаний з унікальним складом есенціальних плацентарних сполук, який включає гормони, нейротрофіни, цитокіни, ростові чинники та ін., а також їх оптимальним природним співвідношенням та високим рівнем збереженості. Кріоконсервування робить експланти плаценти максимально придатними для терапевтичного використання. Дія гіпоксії/ішемії мозку призводить до порушення нейромедіаторного балансу в ГМ, а також загибелі клітин [33,158,159]: гіпоксія змінює роботу генетичного апарату клітини і може ініціювати транскрипцію специфічних генів, відповідальних за її програмовану загибель [85]. Для корекції загальносистемних порушень при ішемічному/гіпоксичному ураженні мозку активно використовують препарати пептидної природи [129,160]. Пептиди входять також до складу плацентарних біологічно активних сполук. Однак механізми дії пептидів на поведінку та адаптивні реакції організму досліджені недостатньо. Кожен пептид має спектр біологічної активності, який визначається, по-перше, його безпосередньою дією і, по-друге, його здатністю індукувати вихід ендогенних регуляторів, в тому числі і інших регуляторних пептидів. Існує безліч даних, що демонструють регулюючу дію нейропептидів на вищі інтегративні функції мозку: процеси навчання і пам'яті, сну, а також участь у реалізації поведінкових реакцій [161,162]. Відповідно до цього в даній серії експериментів досліджені особливості впливу імплантації КЕП на тривалість, якість життя, поведінкові реакції, структуру ГМ в нормі і моделях ДЕ на тлі дефіциту естрогенів (оваріоектомії).

2.4.1 Дослідження фізичних показників, поведінки, виживання та тривалості життя мишей на тлі імплантації кріоконсервованих експлантів плаценти

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

розраховували, відповідно до ваги, активності метаболізму, за рекомендаціями по дослідженню геропротекторов, виходячи з видового рівня обміну речовин за Стефановим О.В. [163] та спираючись на дані літератури [1].

Для оцінки впливу КЕП на виживання та тривалість життя реєстрували дату і причину смерті мишей (при виявленні такої) для проведення статистичного аналізу. Розраховували медіану тривалості життя (вік, до якого доживає 50 % популяції) та вік, до якого доживає 90 % популяції. Тривалість життя (мінімальну і максимальну), показник 50 %-го та 90 %-го виживання оцінювали за допомогою тесту Каплана-Мейєра. Відмінності визначали за допомогою Log-rank (Mantel-Cox) тесту [164].

Якість життя тварин оцінювали по загальним фізичним характеристикам за Донцовим В. І. [165]. Протягом експерименту тварини знаходилися при природному освітленні, отримували стандартне харчування *ad libitum*. Для об'єктивної оцінки індивідуальних особливостей експериментальних тварин досліджували їх фізичні параметри (зовнішній вигляд в балах, зріст, вага, довжина хвоста), вимірювали температуру тіла, оцінювали фізичну силу методом динамометрії і тестом «висіння на струні» [165], проводили тестування методом "відкритого поля", який полягає в обліку представленості різних форм поведінки: кількості вставань на задні лапи (вертикальна локомоторна активність), кількості відвіданих квадратів в досліджуваному полі (горизонтальна локомоторна активність) і кількості актів грумінгу [166-168]. Крім того, тварин тестували методом «підведеного хрестоподібного лабіринту», який дозволяє визначити ступінь тривожності і здатність тварин адаптуватися до стресу [169], визначали зоосоціальну активність [167] .

2.4.2 Моделювання експериментальної дисциркуляторної енцефалопатії в постменопаузі та її обгрунтування

Мета використання моделі ДЕ в умовах дефіциту естрогенів на тваринах – наблизитись до розуміння складних патофізіологічних процесів, які

призводять до ДЕ в постменопаузальному періоді та з'ясувати механізми пошкодження ГМ в результаті ішемії на тлі відсутності статевих гормонів для пошуку нових, ефективних, максимально безпечних методів терапії ДЕ в постменопаузі.

Моделювання функціональних постменопаузальних порушень в організмі експериментальних тварин, пов'язаних, в першу чергу, з дефіцитом естрогенів, проводили шляхом двохсторонньої оваріоектомії, описаної в літературі і широко використовуваної [170].

Аналіз літературних даних показав, що оптимальною для вивчення патогенезу хронічної церебральної ішемії і циркуляторної гіпоксії є експериментальна модель білатеральної оклюзії каротид у гризунів, оскільки вони не мають артерії, що з'єднує сонну артерію і вертебробазилярну артеріальну систему [171]. Тому для моделювання ДЕ у піддослідних мишей використовували двохсторонню оклюзію загальних сонних артерій (ОСА) [172]. Операцію ОСА проводили наступним чином: робили поздовжнє розсічення від краю нижньої щелепи до верхнього краю грудини, відпрепаровували загальні сонні артерії, на них накладали лігатури. Рану зашивали пошарово. Всі хірургічні процедури проводили з дотриманням правил асептики і антисептики. Хибнооперованим тваринам контрольної групи було виконано лише препарування артерій без накладання лігатур.

Дослідження змін поведінки тварин проводили через 3 тижні після операцій, оскільки Hernandez T.D et al. [173] показали, що в такий час посттравматична депресія нейронів викликає сенсомоторний дефіцит, тому зміни в ЦНС оперованих тварин слід оцінювати в означений термін.

2.4.3 Методи дослідження міжпівкульної асиметрії, когнітивно-мнестичних функцій та поведінки мишей

Провідними симптомами в комплексі облігатних проявів дисциркуляторної енцефалопатії в постменопаузі є головний біль, зниження пам'яті, інтелекту, стресостійкості, що призводить до психоемоційних розладів, порушення взаємовідносин і соціальної дезадаптації. Для виявлення можливого коригуючого впливу КЕП на ці симптоми досліджено їх нейрофізіологічні експериментальні аналоги у піддослідних тварин на тлі введення КЕП. Користуючись літературними даними, ми вибрали найбільш інформативні тести для дослідження функціональної міжпівкульної асиметрії [174], когнітивно-мнестичних функцій [167,175], а також поведінки піддослідних тварин [166-169].

Існує декілька напрямків у вивченні поведінкових реакцій експериментальних тварин. Один з них – застосування поведінкових тестів, заснованих на вивченні орієнтаційно-дослідницьких реакцій. Методологічною основою, здатною узагальнити окремі реакції поведінкового характеру з позицій фізіології, є теорія про функціональну систему, порушення цілісності якої призводить до зміни поведінкового акту. Основою прояву будь-яких поведінкових реакцій тварин є орієнтовний рефлекс (ОР). Поняття про ОР розроблені школою Павлова І. П. [176]. Однією з основних характеристик ОР є те, що він являє собою настановну реакцію, яка відображає діяльність цілого організму, тому поведінкові реакції слід розглядати, перш за все, в якості інтегральних показників стану організму.

Поведінкові реакції вивчалися за комплексом параметрів, що характеризують індивідуальні особливості рухової і орієнтаційно-дослідницької активності експериментальних тварин в тесті «відкрите поле» [168]. Тест описує поведінку в умовах новизни. Велику роль у формуванні поведінки тварини в цих умовах відіграє баланс мотивацій - прагнення досліджувати нову обстановку (неофілія) і страх перед нею (неофобія, тривога).

Визначалися наступні показники: кількість пересічених квадратів (горизонтальна локомоторная активність), кількість актів грумінгу, а також число вставання на задні лапи (кількість стійок). В умовах тесту моторні реакції відображають рухову і дослідницьку активність тварини.

Відповідно до сучасних уявлень, локомоторна активність є генетично запрограмованою видовою ознакою, її інтенсивність впливає на формування і прояв найважливіших морфофункціональних особливостей у видів та індивідуумів, включаючи характер метаболізму та розвиток фізіологічних систем [177].

У загальну категорію «локомоторної активності» потрапляє ряд різних форм поведінки. Це пов'язано з тим, що локомоція, якими б не були її центральні нервові механізми, здійснюється різними тваринами ритмічно для різних адаптивних цілей. Показано, що з кількісними показниками орієнтаційно-дослідницької поведінки в тесті «відкрите поле» корелюють індивідуальна стійкість до стресу у щурів [178] та первинна гуморальна імунна відповідь у мишей [179].

Локомоторна активність зазвичай виникає у відповідь на пряму зовнішню стимуляцію – зниження інтенсивності світла, підвищення температури, запахи, видимий рух [180]. Якщо в лабораторних умовах аналогічні стимули (освітленість або темрява, температура, запах, зорові подразники) будуть діяти з постійною інтенсивністю, то локомоторна активність тварин буде або результатом внутрішніх (пов'язаних з мотивацією) змін в порозі чутливості до цих стимулів, або наслідком порушення чи розгальмування в ЦНС, що призводить до так званої спонтанної активності. Мотиваційні зміни виникають під дією ряду фізіологічних сигналів, з яких найбільше значення мають рівень статевих гормонів, позбавлення їжі або води і добова (сезонна) ритмічність. Мотиваційні зміни неминуче впливають одна на одну, наприклад циркадний ритм локомоції істотно змінюється під впливом голоду, а локомоторна реакція на їжу помітно варіює залежно від циркадного часу [181]. Тому тестування проводили в один і той же час доби (з 10 до 14 годин) при максимальному

обмеженні зовнішніх подразників., в одному приміщенні, з однаковим освітленням і температурою.

Дизайн експерименту відображено в таблиці 2.4.3.

Період тестування становив 5 хвилин. Кожну тварину тестували 10 разів. При формуванні однорідної вибірки враховували схожість середніх представленостей реєстрованих поведінкових актів за 10 тестувань. Ті тварини, у яких розглянуті ознаки були досить близькими, становили експериментальну групу. На них проводили дослідження і контрольні спостереження.

Таблиця 2.4.3

Дизайн експерименту з вивчення поведінки мишей на моделі дисциркуляторної енцефалопатії в постменопаузі.

Групи	1 (n = 10)	2(ОЕ) (n = 10)	3 (n = 10)	4(ОЕ) (n = 10)	5(ОЕ+КЕП) (n = 10)
ДЕ	–	–	+	+	+

У процесі досліджень здійснювали якісну ідентифікацію поведінки мишей і проводили облік їх кількісної представленості. При кількісному обліку вертикальної локомоції підраховували число вставання на задні лапи протягом 5 хвилин. Горизонтальну локомоцію оцінювали шляхом підрахунку пройдених клітин (10 х 10 см) підлоги камери (40 х 50 см) за 5 хвилин. Підраховували кількість актів грумінгу (умивань) за 5 хвилин.

Зміна поведінки на перших етапах адаптації до впливу різних екстремальних факторів, на думку деяких авторів, є навіть більш інтегральним показником характеру відповіді на дію, ніж біохімічні і фізіологічні порушення [182]. Встановлено також, що у тварин з різним рівнем стресостійкості існують відмінності в розподілі нейромедіаторів в мозку [183].

Функціональна міжпівкульна асиметрія характеризує як стійкість тварин до стресу, так і здатність до аналізу і пошуку оптимального рішення.

Міжпівкульна асиметрія оцінюється по сенсорним і моторним асиметріям [182], або по часу сенсомоторної реакції при реагуванні на аудіальні чи візуальні стимули [184,185].

Вивчення латерального профілю, що відображає міжпівкульну асиметрію, дає можливість виявити ступінь впливу ішемії на структури правої і лівої півкуль ГМ. Латеральний профіль досліджували, використовуючи тест кафедри нейрофізіології Стенфордського університету (США) «Т-подібний лабіринт», або лабіринт «спонтанного вибору» [186], динамічний тест для вивчення дослідницької поведінки у тварин, особливо гризунів, в моделях уражень ЦНС різного ґенезу, а також старіння. Цей тест використовується для кількісного визначення пізнавальних дефіцитів, оцінки впливу нових препаратів на когнітивні функції та пам'ять гризунів. Використовуючи описаний тест, можливо виявити коригуючий вплив імплантації КЕП на порушені функції ЦНС тварин в модельних експериментах.

Коефіцієнти міжпівкульної асиметрії (КМА) обчислювалися для кожної миші з наступним усередненням результатів по групі за формулою : КМА = (П - Л)/(П + Л) х 100% [174,187], де Л і П - сумарна кількість лівобічних і правобічних пробіжок і ротацій (розворотів в коридорах). При виконанні тесту лівобічні пробіжки і розвороти відображають більшою мірою активність правої півкулі, так як лівостороння моторна реакція здійснюється під контролем моторних зон правої півкулі. Цю тезу можна застосувати і для оцінки функціональної активності лівої півкулі. Позитивне значення КМА вказує на домінування лівої півкулі, негативне – на домінування правої.

Дослідження когнітивних здібностей і пам'яті в моделі ДЕ, ускладненій дефіцитом естрогенів, має велике значення для з'ясування механізмів порушень ЦНС в постменопаузальному віці. Доведено, що когнітивні порушення при ДЕ в початковій стадії мають нейрорегуляторний характер [188,189], отже існує можливість їх корекції імплантацією КЕП, як джерела різноманітних БАР з потужною регуляторною та відновлювальною дією.

Для дослідження когнітивних здібностей і пам'яті піддослідних тварин використовували тест запам'ятовування положення об'єкта, який дає можливість оцінити просторову пам'ять і здатність знаходити відмінності в положенні і формі об'єкта [167,175]. Цей тест заснований на спонтанній тенденції гризунів витрачати більше часу на дослідження нового об'єкта, ніж знайомого, а також дізнаватися, чи був переміщений об'єкт. Тест проходив в боксі – відкритому полі, до якого тварини в перший день звикали. На наступний день чотири об'єкти з однакового матеріалу, але різних форм, розміщували на поле рівновіддалено один від одного і від бортів боксу. Реєстрували кількість часу, яке витрачала піддослідна тварина на дослідження кожного з 4-х об'єктів, потім два об'єкти міняли місцями і фіксували час, який витрачала тварина на дослідження нового положення об'єктів в боксі. Порівнювали отримані показники.

2.4.4 Морфологічні дослідження структур головного мозку піддослідних мишей

При визначенні впливу імплантації КЕП на організм тварин звертали увагу на ті особливості організму, які перш за все змінюються при ДЕ і дефіциті естрогенів в постменопаузі та суттєво впливають на якість життя в літньому віці. Тому для морфологічного дослідження вибрали структури ГМ (гіпокамп, моторна кора ГМ), які відповідають за когнітивні та моторні функції, стресостійкість, адаптацію. Після проведених експериментів швидко забирали ГМ мишей після зміщення шийних хребців та декапітації, ГМ фіксували у 10% розчині нейтрального формаліну. Гістологічні дослідження виконували за стандартними протоколами, використовуючи для забарвлення препаратів ГМ експериментальних тварин гематоксилін та еозин [148]. Зображення отримували, використовуючи тринокулярний мікроскоп з фото/відеовиходом XSP-139TP («JNOEC», Японія-Китай), цифрову камеру Sigeta UCMOS 3100 (Китай) та програмне забезпечення «ToupView 3.7» (Китай).

2.5 Статистична обробка результатів досліджень

Відмінності між групами визначали з використанням параметричних (t-критерій Стьюдента) і непараметричних (критерій Манна-Уітні) методів аналізу. Для виявлення достовірності впливу чинників в експериментальних групах використовували уніваріантний дисперсійний метод. Статистичну обробку результатів здійснювали з використанням програмного забезпечення MS Excle, Wizard V 1.5. і Past V. 3.25 [190]. Достовірними вважали відмінності при $p < 0,05$.

РОЗДІЛ 3
ВПЛИВ КРІОКОНСЕРВОВАНИХ ЕКСПЛАНТІВ ПЛАЦЕНТИ НА СТАН НЕРВОВИХ КЛІТИН В МОДЕЛІ ГЛУТАМАТ-ІНДУКОВАНОЇ ЕКСАЙТОТОКСИЧНОСТІ *IN VITRO*

Нейротрофічна терапія і нейропротекція – основні напрямки лікування в неврології. Актуальним завданням є пошук нових ефективних біологічно активних препаратів, які зменшують пошкодження, запобігають загибелі і сприяють відновленню нейронів і глії в процесах підтримки і регенерації ЦНС в рамках геронтологічної терапії.

Численними дослідженнями показано, що терапія мезенхімальними стовбуровими клітинами (МСК), в тому числі плацентарного походження, може бути ефективна при різних захворюваннях нервової системи, включаючи інсульти і травми [191,192]. Крім того, показано позитивну дію на нервову систему тканинних, клітинних чинників [158,159,193], жіночих статевих гормонів і екстракту плаценти [194,195,87]. При цьому механізм нейропротекторної дії МСК пов'язують з паракринними взаємодіями, впливом на нейрони та глію [193,196].

Грунтуючись на представлених даних про позитивний вплив чинників плацентарного походження на нервові клітини і тканину ГМ, можна припустити, що похідні плаценти, такі як експланти плаценти, мають нейропротекторну і терапевтичну дію.

Кріоконсервування дозволяє здійснювати зберігання експлантів плаценти протягом тривалого терміну, проте при цьму може відбуватися зміна властивостей біологічного матеріалу [38,197-199]. Тому виникає необхідність оцінки ступеню таких змін, яку можливо здійснити за допомогою дослідження збереженості нейропротекторної та нейротрофічної активності КЕП.

Таким чином, метою даної частини експериментальної роботи було дослідження нейропротекторної та нейротрофічної активності КЕП. Для вивчення дії КЕП була обрана модель глутаматної ексайтотоксичності, яка має місце в патогенезі ряду неврологічних захворювань та є стандартним методом дослідження нейропротекторної активності ряду сполук, речовин, екстрактів, клітин і експлантів [200-202].

На першому етапі роботи досліджували вплив ЧПП на метаболічну активність НК. Для цього клітини протягом 1 доби культивували в середовищі DMEM, кондиційованому з КЕП, яке отримували за раніше розробленою методикою [150]. Після цього вимірювали мітохондріальне конвертування МТТ в кристали формазану метаболічно активними НК.

Таблиця 3.1

Дизайн експерименту

Група	День 1	День 2	День 3
Позитивний контроль	-	-	МТТ
Негативний контроль	-	Глутамат	МТТ
Етап 1 (дія на інтактні НК)	-	Середовище КЕП	МТТ
Етап 2 (нейропротекторна дія)	Середовище КЕП	Глутамат	МТТ
Етап 3 (нейротрофічна дія)	Глутамат	Середовище КЕП	МТТ

В якості контролю виступали клітини, які культивували в середовищі DMEM без додавання середовища, кондиційованого з КЕП.

Було виявлено, що культивування в середовищі, кондиційованому з КЕП, призводить до збільшення метаболічної активності НК. За результатами МТТ-тесту, після культивування НК в середовищі DMEM, кондиційованому з КЕП, їх метаболічна активність збільшувалася в порівнянні з відповідним показником у контролі, більш, ніж на 30 % (рис. 3.1).

У той же час, якщо НК культивували в середовищі, кондиційованому з КЕП, попередньо інактивованому нагріванням, показник МТТ-тесту залишався на рівні контролю (рис. 3.1, штрихування).

На наступному етапі роботи проводили дослідження можливої нейропротекторної і нейротрофічної дії КЕП. Для цього НК піддавали дії глутамату, підвищені концентрації якого викликають ушкодження і, в залежності від ступеню отриманих ушкоджень, можливу подальшу загибель клітин.

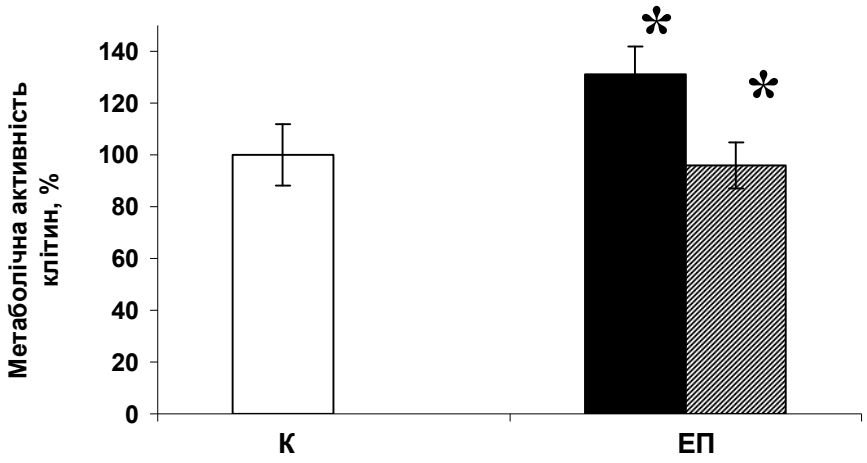


Рис. 3.1. Метаболічна активність нейроклітин за результатами МТТ-тесту: К – контроль; ЕП – в середовищі DMEM, кондиційованому з КЕП; штрихування – в середовищі, кондиційованому з КЕП та інактивованому нагріванням; * – статистично значущі відмінності від показників контролю ($p < 0,05$).

Нейропротекторну дію КЕП досліджували, культивуючи НК в середовищі DMEM з додаванням плацентарних чинників, перед ексайтотоксичним впливом глутамату, а нейротрофічну, – після такого впливу.

Глутамат є важливим збуджуючим нейротрансмітером, основна роль якого полягає в активації нейроклітин. При нормальних концентраціях глутамат має вирішальне значення в здійсненні таких функцій мозку, як навчання і пам'ять. У той же час високі концентрації позаклітинного глутамату

є токсичними для нейронів. Підвищена активність, викликана глутаматом, сприяє надмірному збудженню нервових клітин, що призводить до їх пошкодження та загибелі. З цієї причини глутамат відноситься до ексайтотоксинів. Показано негативний вплив підвищених концентрацій глутамату в позаклітинному середовищі на життєздатність нейроклітин (0,2 - 20 ммоль) [200-202]. Для моделювання глутамат-індукованої токсичності і визначення специфічної концентрації глутамату, при якій виявляється його негативний вплив на метаболічну активність НК, ми досліджували п'ять різних концентрацій глутамату: 0,2, 2, 5, 10 і 20 ммоль.

При додаванні глутамату в середовище культивування НК в концентрації 20 ммоль відбувалося істотне зниження метаболічної активності НК, тобто при використанні даної концентрації втрачалася специфічність дії глутамату на НК (рис. 3.2).

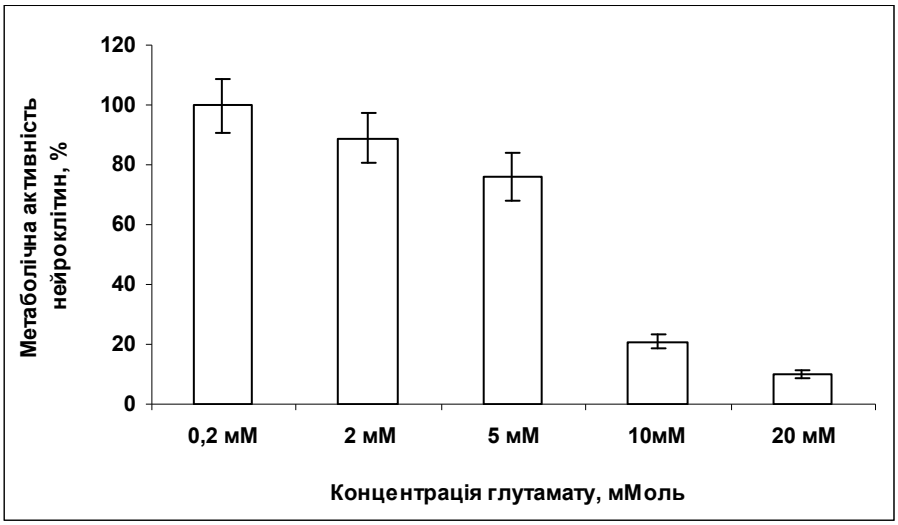


Рис. 3.2. Метаболічна активність нейроклітин після інкубування в середовищі DMEM з додаванням різних концентрацій глутамату.

При інкубуванні клітин з глутаматом в концентрації 0,2 ммоль метаболічна активність НК не змінювалася (рис. 3.2). При використанні глутамату в концентрації 2-5 ммоль спостерігалося незначне зниження метаболічної активності НК в межах 11-24 %, що вказує на недостатність даної

концентрації глутамату для прояву його негативної дії на НК. У присутності глутамату в концентрації 10 ммоль в середовищі інкубації відбувалося істотне зниження метаболічної активності НК (на 79,2 %) (рис. 3.2). Таким чином, було виявлено, що ефективна концентрація, при якій глутамат виявляє ексайтотоксичний вплив на метаболічну активність НК, становить 10 ммоль, тому в наступних експериментах глутамат-індуковану цитотоксичність НК моделювали, використовуючи експериментально знайдену концентрацію глутамату.

Для дослідження нейропротекторної дії чинників плацентарного походження НК культивували протягом 1 доби в середовищі DMEM, кондиційованому з КЕП, далі піддавали їх ексайтотоксичному впливу глутамату, після чого вимірювали мітохондріальне конвертування МТТ в кристали формазану метаболічно активними клітинами (рис. 3.3).

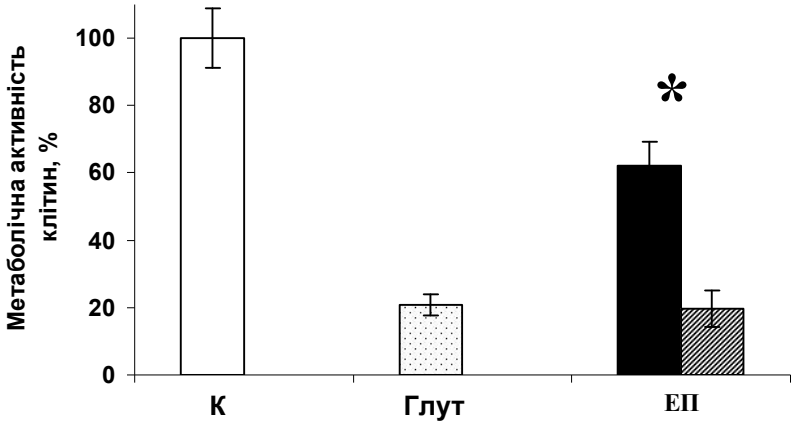


Рис. 3.3. Метаболічна активність нервових клітин при культивуванні у присутності чинників плацентарного походження до обробки клітин глутаматом: К – контроль; Глут – після інкубування в середовищі DMEM з додаванням 10 ммоль глутамату; ЕП – в середовищі DMEM, кондиційованому з КЕП; штрихування – в середовищі, інактивованому нагріванням. * – статистично значущі відмінності від показників НК, які культивували з глутаматом без захисних добавок ($p < 0,05$).

Для дослідження терапевтичної дії КЕП нервові клітини культивували в середовищі, кондицийованному з КЕП, після ексайтотоксичного впливу глутамату (рис. 3.4).

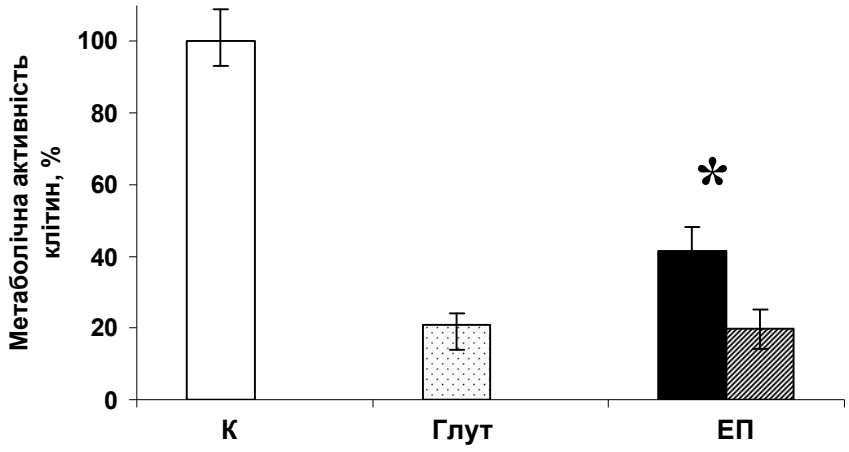


Рис. 3.4. Метаболічна активність нервових клітин у присутності чинників плацентарного походження після обробки клітин глутаматом: К – контроль, Глут – після інкубації в середовищі DMEM з додаванням 10 ммоль глутамату; ЕП – в середовищі DMEM, кондиційованому з КЕП; штрихування – в середовищі, інактивованому нагріванням. * – статистично значущі відмінності від показників НК, які культивували з глутаматом без захисних добавок ($p < 0,05$).

Було виявлено, що метаболічна активність НК після культивування в середовищі DMEM, кондиційованому з КЕП, збільшувалася, в порівнянні з глутамат-обробленими клітинами, на 20,6 % Таким чином, позитивна терапевтична дія плацентарних чинників КЕП на НК була в два рази менше вираженою, ніж у випадку, коли НК культивували в середовищі, що містить плацентарні чинники до впливу глутамату. При культивуванні НК в середовищі DMEM, кондиційованому з КЕП, попередньо інактивованих нагріванням, терапевтична дія втрачалася: метаболічна активність НК залишалася на рівні глутамат-оброблених клітин (рис. 3.4).

Таким чином, було показано, що КЕП сприяють збільшенню метаболічної активності НК, характеризуються нейропротекторною та нейротрофічною (терапевтичною) дією. Середовища, кондиційовані з КЕП, які піддавали нагріванню до 95 °С протягом 10 хвилин, не демонстрували захисної дії проти глутамат-індукованої цитотоксичності, що може вказувати на білкову або білок-асоційовану природу плацентарних чинників, яка обумовлює термолабільність сполук з плаценти, що реалізували позитивні нейротропні ефекти.

Отримані нами дані про позитивний вплив чинників плацентарного походження в середовищі культивування відносно НК, що піддавалися обробці глутаматом, узгоджуються з даними інших авторів [157,199], що вказують на нейропротекторну дію як стовбурових клітин, виділених з тканин плаценти, так і експлантів плаценти.

Механізм позитивної дії біооб'єктів плацентарного походження на НК пов'язують з продукцією стовбуровими клітинами в їх складі різного роду чинників [203,204], а також з впливом паракринних медіаторів [205,206] і з цитокіновими ефектами [207-209]. Показано, що МСК плацентарного походження, а також епітеліальні клітини амніону людини здатні синтезувати і виділяти нейротрофічні чинники та нейротрансмітери [210,211].

Терапія з використанням МСК сприяє збільшенню інтенсивності проліферації і зменшенню апоптотичної загибелі клітин [212-214]. Описано нейропротекторні і нейрорегенеративні властивості середовищ, кондиційованих з епітеліальними клітинами амніону людини [210,211,215].

Ще один механізм позитивної дії похідних плаценти на НК може бути пов'язаний з їх участю в протидії окислювальному стресу. Показано, що похідні плаценти сприяють пригніченню утворення вільних радикалів і забезпечують антиоксидантний захист мембран органел і клітин [216,217].

Механізм позитивної дії КЕП на НК може бути пов'язаний також з присутністю в складі плаценти великої кількості біологічно активних молекул, таких як білки, пептиди, глікозаміноглікани, амінокислоти, гормони, ферменти,

чинники росту і цитокіни, які активують процеси регенерації [41]. Крім того, плацента містить естрогени, які демонструють нейромодулюючу дію [218, 219], що здійснюється в тому числі за допомогою ряду нейротрофінів [220]. Наприклад показано, що нейротрофічний чинник мозку впливає на виживання нейроклітин, диференціювання і синаптичну пластичність [221, 222].

Таким чином, есенціальні сполуки КЕП мають як нейротрофічну, так і виражену нейропротекторну дію. Встановлено, що профілактичне використання КЕП є більш ефективним в порівнянні з їх використанням після шкідливої дії токсичних агентів.

За матеріалами розділу 3 опубліковані роботи [154, 223-227].

РОЗДІЛ 4
ВПЛИВ ІМПЛАНТАЦІЇ КРІОКОНСЕРВОВАНИХ ЕКСПЛАНТІВ ПЛАЦЕНТИ НА ПОКАЗНИКИ ВИЖИВАННЯ ТА ТРИВАЛІСТЬ ЖИТТЯ МИШЕЙ

Тривалість та якість життя є інтегральними показниками, що представляють системний вплив застосування імплантації КЕП на організм. Водночас, еволюційно обумовлена двохвекторна роль плаценти, спрямована на розвиток плоду, який може бути чоловічої чи жіночої статі та на перебудову жіночого організму під час вагітності, потребує визначення впливу імплантації КЕП відносно статі та віку реціпієнта.

Більшість геропротекторів з доведеною ефективністю впливають на імунну, нервову системи, клітинний цикл, метаболізм вуглеводів, стимулюють аутофагію [228]. Зазвичай препарати по-різному діють на особин чоловічої і жіночої статі, більшою мірою збільшуючи тривалість життя самців [229]. Але фармпрепарати, що впливають на тривалість життя, мають виражені побічні ефекти і використовуються для лікування важких захворювань [228,230].

Раніше нашими дослідженнями і в літературі показана геропротекторна активність плацентарних чинників, подібна до дії стовбурових клітин [231,232,233]. У той же час екстракти і клітини плаценти мають естрогеноподібну дію, в тому числі нейропротекторну активність [234,235]. Таким чином можна припустити, що плацентарні препарати, впливаючи на організм комплексно, можуть продовжувати життя. З препаратів плаценти (екстракт, клітини, експланти) нами були обрані експланти плаценти, як препарат з найбільш тривалим і м'яким впливом [199], при якому есенціальні плацентарні сполуки вивільняються поступово без ризику виникнення високих концентрацій БАР, токсичних для нейроклітин.

Оскільки для проведення клітинної і тканинної терапії необхідна наявність безпечного неінфікованого матеріалу, в експерименті використовували КЕП, досліджуючи можливість продовження життя мишей за допомогою імплантації їм КЕП.

Аналіз кривої виживання інтактних самців і самиць (рис. 4.1, а, табл. 4.1) показав, що до 8 місяців їх смертність була мінімальною, після цього крива виживання самців носила лінійний характер, у самиць в період з 10 до 23 місяців смертність різко знижувалася, потім носила лінійну залежність, як і у самців. Початок різкого збільшення смертності збігався з віком дуже старих мишей (21-30 міс), за яким слідував вік довгожителів, до якого дожили поодинокі миші жіночої статі.

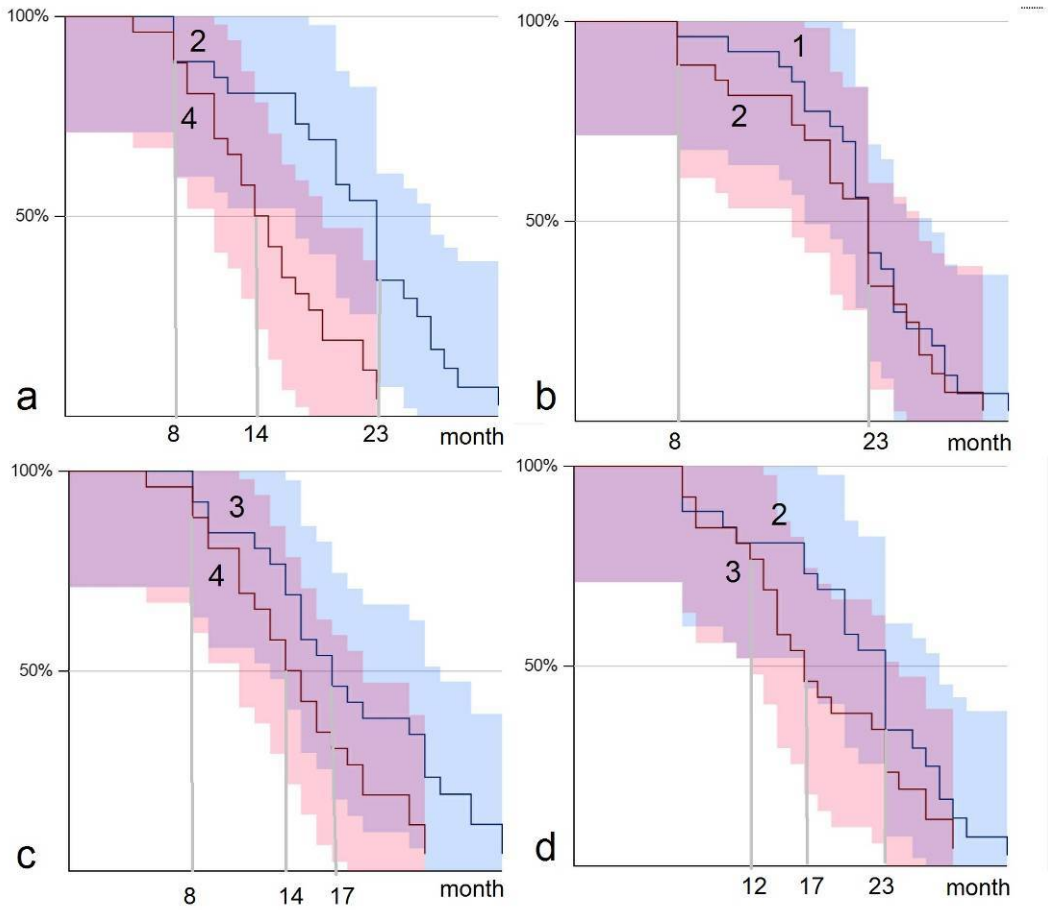


Рис. 4.1. Порівняння кривих виживання експериментальних груп. Номери груп позначені цифрами 1-4, пояснення в тексті, довірчі інтервали виділені тим же кольором, що і графік.

Такий нелінійний характер кривих виживання в жіночій популяції більшість дослідників пов'язують з протекторною дією естрогенів, перш за все на серцево-судинну систему, що припиняється в клімактеричному віці [234,235]. Смертність зростає, коли за біохімічними змінами слідують функціональні і морфологічні зміни в стадії декомпенсації, тобто в старечому віці (глибока менопауза) [236].

При порівнянні кривих виживання самців і самиць за методом log-rank виявлені достовірні відмінності ($z = 3,88$, $p < 0,001$). Середня тривалість життя самиць була більше на 29,1 %, медіана – на 30 %, 90 % виживання – на 29,6 %, максимальна тривалість життя – на 28,1 %. Отримані результати показали, що досліджені параметри виживання і тривалості життя мишей мають ті ж тенденції, що і в людській популяції, проте відмінності між тривалістю життя чоловіків і жінок, за даними ВООЗ, становить 7-9 % [237].

Таблиця 4.1

Показники кривих виживання мишей експериментальних груп (n=25 в кожній групі)

Показник / Група	Середня тривалість життя, міс	50 %-е виживання, міс	90 %-е виживання, міс	Максимальна тривалість життя, міс
1 (самиці з імплантованим КЕП)	22,48	23	28	34
2 (самиці інтактні)	20,48	23	27	32
3 (самці з імплантованим КЕП)	17,72	17	24	28
4 (самці інтактні)	14,52	14	19	23

При порівнянні кривих виживання самиць мишей (рис. 4.1, В), яким проводилися імплантації КЕП, достовірних відмінностей не отримано (log-rank

test: z = 0,78, p = 0,44), проте в першій половині життя (до медіани – 23 місяців) криві мали тенденцію до різниці (log-rank test: z = 1,84, p = 0,065). Тобто в репродуктивний період застосування КЕП впливало на виживання, що може бути пов'язано з впливом плацентарних чинників на функціонуючу репродуктивну систему, і не впливало на виживання після виснаження яєчникового резерву. Нелінійний характер кривих виживання в жіночій популяції більшість дослідників пов'язують з протекторною дією естрогенів, перш за все на серцево-судинну систему, що припиняється в пізньому онтогенезі [234,235]. Відсутність ефекту імплантації КЕП на тривалість життя самиць в періоді пізнього онтогенезу узгоджується з даними про недоцільність замісної гормонотерапії в глибокій старості [236]. Подальше введення КЕП не викликало розбіжностей досліджуваних параметрів.

На відміну від самиць, криві виживання самців (рис. 4.1., C) достовірно відрізнялись на всьому протязі життя тварин (log-rank test: z = 2,27, p = 0,0233). 50 % -е виживання зростало на 17,6 %, середня тривалість життя – на 18,1 %, 90 % -е виживання – на 20,8 %, максимальна тривалість життя – на 17,9 %. Обидві криві носили лінійний характер і з віком розходилися. Таким чином, застосування КЕП достовірно подовжує життя самців мишей незалежно від віку. Отримані дані по виживанню мишей показали: імплантація КЕП виявилася більш ефективною для цієї мети, ніж застосування естрогенів, описане в науковій літературі [229], що говорить про комплексну дію плацентарних чинників в складі КЕП. При цьому слід зазначити, що раніше отримані дані про позитивний вплив КЕП на чоловічу репродуктивну систему робить їх застосування більш перспективним, оскільки більшість геропротекторов пригнічують функцію чоловічої статевої системи [229,230].

При подальшому аналізі виживання було встановлено, що у самців після застосування КЕП показники виживання не відрізнялися від показників виживання інтактних самиць (рис. 4.1., D, log-rank test: z = 1,6, p = 0,11), однак відрізнялися від таких у самиць з імплантованим КЕП (log-rank test: z = 2,4, p = 0,0165). При цьому у самиць в середині життя (з 12 по 23 міс – старечий період,

але не глибока старість) ймовірність померти була достовірно нижчою (log-rank test z = 3,68, p <0,001), ніж у самців, а в кінці життя криві виживання самців, яким вводили КЕП і інтактних самиць, збігалися.

Таким чином, імплантація КЕП впливає на виживання та тривалість життя мишей, але ступінь і направленість дії КЕП відрізняються в залежності від статі та віку. Логічно припустити, що комбінація БАР, які синтезуються плацентою, впливаючи на механізми адаптації через відповідні сигнальні системи на молекулярному рівні, дає різні варіанти регулювання функцій організму від процесів метаболізму в клітині до системного впливу на організм тварин різного віку і статі.

За матеріалами розділу 4 опубліковані роботи [238-241].

РОЗДІЛ 5
ВПЛИВ ІМПЛАНТАЦІЇ КРІОКОНСЕРВОВАНИХ ЕКСПЛАНТІВ ПЛАЦЕНТИ НА ПОВЕДІНКОВІ РЕАКЦІЇ, ФІЗИЧНИЙ СТАН ТА СТРУКТУРУ МОТОРНОЇ КОРИ І ЗУБЧАСТОЇ ЗВИВИНИ АМОНОВА РОГУ ГІПОКАМПА МИШЕЙ

Плацента ссавців не тільки забезпечує розвиток плоду, але й виконує метаболічну, імунну, гормональну функції, в тому числі, підвищує стійкість тканин до гіпоксії та стимулює процеси репарації [242-244].

БАР плаценти, відіграючи захисну або нейротрофічну роль, здатні активувати синтез білків та антиоксидантні реакції, інгібіювати апоптоз, модулювати імунні реакції та ангіогенез [41-43,245]. Тому при імплантації КЕП в організм старіючих (12-місячних) піддослідних мишей ми очікували позитивних впливів на здатність ЦНС тварин до адаптації в умовах стресу, на поведінкові реакції та морфологічні характеристики структур головного мозку.

З огляду на можливу позитивну дію плацентарних чинників на адаптаційні можливості ЦНС, визначено мету даної частини експериментальної роботи: встановити вплив імплантації КЕП на поведінку, фізичний стан та структури ГМ мишей пізнього онтогенезу, оскільки досліджувана патологія – дисциркуляторна енцефалопатія в постменопаузі – відноситься до захворювань, що асоційовані з похилим віком.

При старінні виникають біохімічні зміни та функціональний дизбаланс в структурах ГМ, пригнічення активності нейрогенезу, які супроводжуються розладом когнітивної функції, зниженням пам'яті та дезадаптацією в умовах стресу. Біооб’єкти плацентарного походження є джерелом БАР і стовбурових клітин та можуть потенційно реактивувати нейрогенез, сприяючи відновленню адаптаційних можливостей ЦНС.

Причиною вікових порушень моторики і когнітивних функцій мозку є біохімічні і структурні зміни в нервовій тканині ГМ, головним чином, гіпокампу, сенсомоторної кори і стріатуму [246,247]. Процеси, що пов'язані зі старінням, призводять до зниження здібності до навчання, зміни адаптивних реакцій і структури поведінки [248]. З віком відбувається зменшення кортикального шару і інтеграційної білої речовини, знижується дофамінергічна активність і виникає функціональний дизбаланс в сенсомоторному регіоні, гіпокампі і потиличній зоні ГМ, а також компенсаторне збільшення активності структур переднього мозку [249]. Вважається, що "згасаюча" пластичність нейронів, яка обумовлена епігенетичними факторами, спричиняє розвиток нейродегенеративної патології [250]. Уповільнення нейрогенезу переважно у субвентрикулярній зоні мозку і зубчастій звивині, виражається в обмеженні проліферації і подовженні клітинного циклу та супроводжується розладом когнітивної функції і зниженням пам'яті [251-254].

Проте нейрогенез в зрілому мозку може бути реактивований застосуванням фармакологічних препаратів та стовбурових клітин. Описано позитивний вплив антидепресантів та простратина на нейрогенез в зрілому гіпокампі [255,255], а також - внутрішньовенної ін'єкції культури нейрональних прогеніторних клітин на пам'ять і когнітивні функції щурів, які піддавалися ішемії мозку [256]. Встановлено, що новоутворені нейрони залучаються до функціонування нейронної мережі гіпокампу, в першу чергу, в зубчастій звивині, та впливають на процеси навчання, пам'яті і емоційної поведінки [257]. Виявлено, що нейрогенез пов’язаний з експресією нейротрофічних чинників BDNF та GDNF [82], а також що недостатній рівень ростових і нейротрофічних чинників є суттєвим обмеженням для нейрогенезу [256,258]. Згідно сучасним уявленням, нейротрофіни грають важливу роль в функціонуванні нейронних зв’язків в ГМ, сприяючи посиленню репаративного білкового синтезу і утворенню нейронів, а також збереженню життєздатності клітин ГМ на високому метаболічному рівні при впливі пошкоджуючих факторів [259,260].

Зважаючи на можливу позитивну дію плацентарних факторів на адаптаційні можливості та відновлення ЦНС, було важливим встановити вплив імплантації КЕП на нейрофізіологічні, морфологічні та загальні фізичні показники старіючих тварин, від яких залежить якість життя: загальний фізичний стан організму, поведінка та морфологічна збереженість структур ГМ мишей**.**

5.1 Вплив імплантації кріоконсервованих експлантів плаценти на орієнтаційно-дослідницьку, анксиолітичну, зоосоціальну поведінку та фізичні показники старіючих мишей

Відомо, що стійкість ЦНС до несприятливих впливів пов’язана з вихідною емоційністю, а також ступенем вираженості рухової та пошукової активності тварин [261-263], тому оцінювали рухово-пошукову активність тварин в тесті «відкрите поле», здійснюючи облік представленості різних форм орієнтаційно-дослідницької поведінки, які ініціює стрес новизни.

Анксиолітичну дію імплантації КЕП оцінювали по поведінці тварин в підведеному хрестоподібному лабіринті, при цьому реєстрували сумарний час перебування піддослідної тварини в закритому рукаві лабіринту. Визначали також зоосоціальну активність в трьохкамерному тесті за часом, проведеним піддослідною твариною з одно- і різностатевою особиною.

Загальні фізичні показники оцінювали за зовнішнім виглядом в балах, вагою, зростом, фізичною силою за результатами динамометрії.

Результати досліджень форм орієнтаційно - дослідницької поведінки мишей, а саме: горизонтальної і вертикальної локомоторної активності, представлені на рис. 5.1 (а, б – самці, в, г – самиці).

Згідно отриманим результатам, у старіючих мишей обох статей в порівнянні з однорідними групами молодих тварин вірогідно не змінювалася кількість відвіданих квадратів камери в тесті «відкрите поле» (горизонтальна локомоторна активність, рис.5.1, а, в, 1).

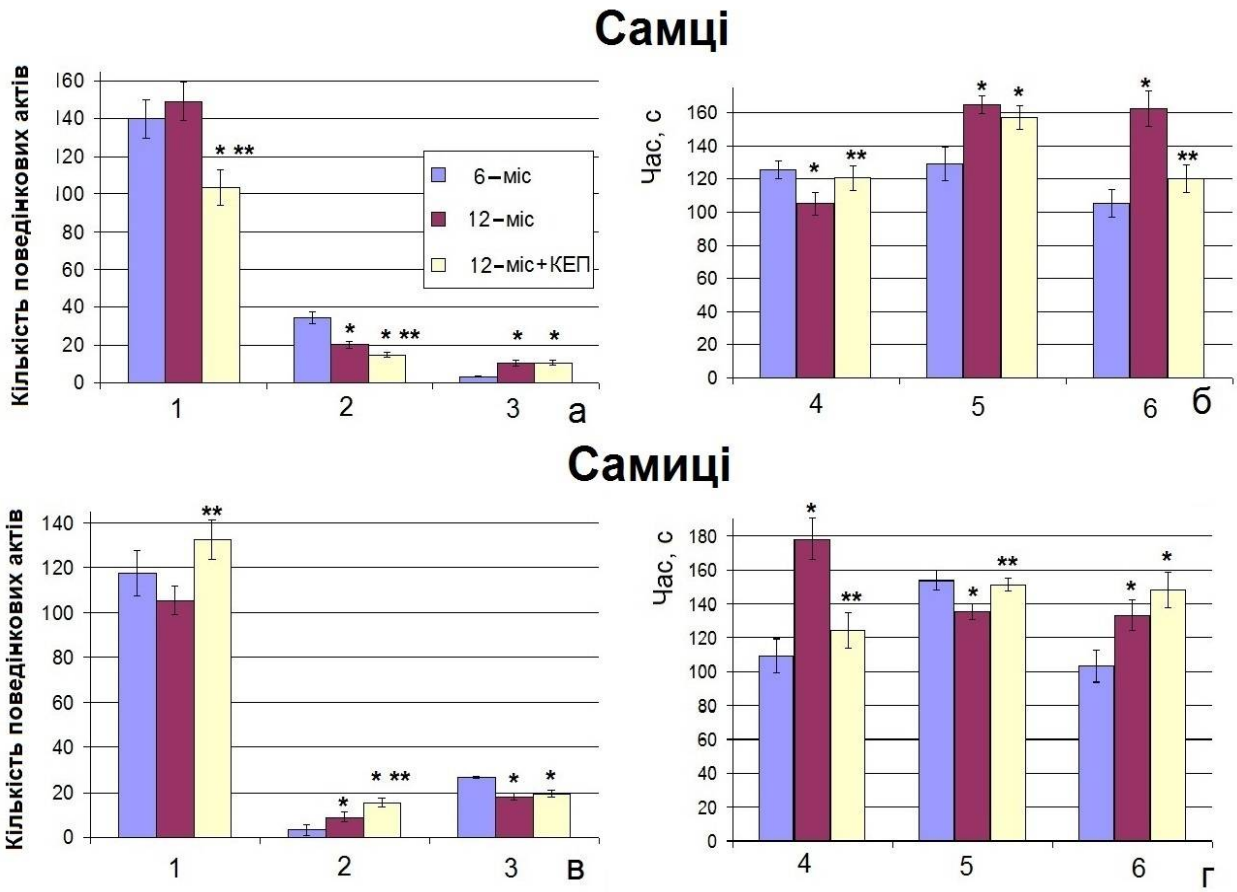


Рис. 5.1. Структура поведінки мишей на тлі імплантації КЕП:

1 – кількість відвіданих квадратів в тесті «відкрите поле»,

2 – кількість стійок в тесті «відкрите поле»,

3 – кількість актів грумінгу в тесті «відкрите поле»,

4 – час знаходження в закритому рукаві підведеного хрестоподібного лабіринту,

5 – час, проведений з одностатевою твариною в трикамерному тесті,

6 – час, проведений з різностатевою твариною в трикамерному тесті;

*– статистично значущі відмінності від групи 6-ти місячних тварин ($p < 0,05$),

** – статистично значущі відмінності від групи 12-ти місячних тварин ($p < 0,05$).

Вірогідні відмінності спостерігались в вертикальній локомоторній активності і грумінгу: кількість «стійок» у передстарих самців в порівнянні з групою молодих самців знижувалася (рис.5.1, а, 2), кількість актів грумінгу зростала (рис.5.1, а, 3).

Умивання, або грумінг, як форма орієнтаційно-дослідницької активності, часто спостерігається при новизні подразників і може бути не пов'язаним із забрудненням хутра тварин [263]. Збільшення частки грумінгу в структурі орієнтаційно - дослідницької поведінки з одночасним зниженням вертикальної форми локомоції у старіючих самців мишей може свідчити про зміщення поведінкової активності в результаті конфлікту мотивацій страху і дослідження.

У старіючих самиць, навпаки, вертикальна локомоторна активність в порівнянні з молодими самицями зростала (рис.5.1, в, 2), але кількість актів грумінгу зменшувалася (рис.5.1, в, 3), що відображає перевагу дослідницької поведінки перед страхом в умовах стресу новизни.

Підведений хрестоподібний лабіринт зазвичай використовується для оцінки дії анксиолітиків на поведінку тварин [169], а також відображає ступінь тривожності та здатності тварини адаптуватися до стресу. Результати досліджень показали, що старіючі самці мишей, на відміну від молодих, вірогідно менше часу проводять в закритому рукаві хрестоподібного лабіринту (рис.5.1, б, 4). Гальмування механізмів тривоги підвищує ефективність дослідницької поведінки, що виражається у збільшенні часу перебування у відкритих зонах лабіринту [263]. Самиці у віці 12 місяців проводять вірогідно більше часу в закритому відрізку хрестоподібного лабіринту, ніж у 6-тимісячному віці (рис.5.1, г, 4), що є свідоцтвом чутливості ЦНС старіючих самиць до стресорних чинників та призводить до значного підвищення тривожності.

Дослідження зоосоціальної активності мишей в трикамерному тесті виявило збільшення часу, проведеного старіючими самцями з одно- і різностатевою тваринами в порівнянні з молодими самцями (рис.5.1, б, 5, 6). У старіючих самиць мишей зоосоціальна активність в тесті з одностатевою твариною знижується, а з різностатевою твариною зростає і є вірогідно вищою середнього показника у молодих самиць (рис.5.1, г, 5, 6). Отримані дані свідчать про високий рівень соціальної активності і збереженість статевої поведінки у старіючх мишей обох статей.

Таким чином були визначені зміни в структурі поведінки піддослідних мишей при старінні в нормі. Поведінка старіючих мишей в порівнянні з молодими мала також відмінності в залежності від статі. Загалом, серед змін в структурі орієнтаційно-дослідницької поведінки мишей при старінні слід відзначити зміщення вертикальної активності в бік грумінгу у старіючих самців, пов'язане з дезорієнтацією в незнайомих умовах (тест «відкрите поле») та значне вірогідне зростання тривожності у старіючих самиць.

Після імплантації КЕП у старіючих самиць мишей переважає дослідницька поведінка (вірогідно зростають як горизонтальна, так і вертикальна форми локомоторної активності) в порівнянні з групами старіючих і молодих тварин. Зростає також зоосоціальна активність в трьохкамерному тесті як з одностатевою, так і з різностатевою особиною. Суттєво зменшується час, проведений в закритому відрізку підведеного хрестоподібного лабіринту.

Імплантація КЕП старіючим самцям призводить до зниження вертикальної та горизонтальної локомоторної активності і зростання кількості актів грумінгу в порівнянні як з групою молодих, так і з групою старіючих самців. Скорочується також час, проведений з одно- та різностатевою тваринами, збільшується час в закритому відрізку підведеного хрестоподібного лабіринту в порівнянні з групою старіючих самців, що свідчить про зниження зоосоціальної активності і збільшення рівня тривожності. Відзначені зміни поведінки пояснюються дезадаптацією тварин цієї групи після імплантації КЕП, яка призводить до загального зниження рухливості і дослідницької активності, а також зростання тривожності.

Таким чином, отримані експериментальні дані показали, що після імплантації КЕП у старіючих самиць мишей переважала дослідницька поведінка (вірогідно зростала як горизонтальна, так і вертикальна форми локомоторної активності) в порівнянні з групами старіючих тварин, яким не імплантували КЕП. Зросла також зоосоціальна активність в тесті як з одностатевою, так і з різностатевою особиною. Суттєво зменшився час, проведений в закритому відрізку підведеного хрестоподібного лабіринту.

Імплантація КЕП старіючим самцям приводила до зниження вертикальної та горизонтальної локомоторної активності і зростання кількості актів грумінгу в порівнянні з групою старіючих самців. Скоротився також час, проведений з одно- та різностатевими тваринами, збільшився час в закритому відрізку підведеного хрестоподібного лабіринту, що свідчить про зниження зоосоціальної активності і збільшення рівня тривожності. При цьому усі досліджувані фізичні показники груп тварин з імплантованими КЕП покращувалися (табл. 5.1).

Таблиця 5.1

Фізичні показники мишей (M±m, n=10 в кожній групі)

Показник / Група	Загальний оцінювальний бал (від 1 до 5)	Зріст, мм	Вага, г	Динамометрія, г
Самиці 6-міс. (1 група)	3,8±0,23	88,2±8,2	25,5±2,6	83,5±8,3
Самиці 12-міс. (2 група)	4,2±0,38*	97,8±9,1	34,4±2,1*	138,9±4,0*
Самиці 12-міс. з імплантованим КЕП (3 група)	4,7±0,41*,**	97,0±9,5	39,3±2,2*,**	150,0±5,3*,**
Самці 6-міс. (4 група)	4,1±0,33	92,0±8,41	30,9±2,49	99,0±8,71
Самці 12-міс. (5 група)	3,6±0,3	98,6±9,2	38,6±9,1	120,7±5,3*
Самці 12-міс. з імплантованим КЕП (6 група)	4,5±0,4	101,3±9,3	40,2±5,3*	143,8±5,9*,**

Примітки: * – статистично значущі відмінності від групи 6-місячних тварин (p <0,05);

** – статистично значущі відмінності від групи 12-місячних тварин (p <0,05).

В результаті експериментального дослідження встановлено, що у самиць мишей пізнього онтогенезу вікові зміни поведінки і зовнішніх фізичних показників піддаються корекції шляхом імплантації КЕП. Забезпечуючи

надходження в організм плацентарних сполук, КЕП спричинювали значну геропротекторну дію. На відміну від старіючих самиць, у самців однорідної групи після імплантації КЕП відбулась дезадаптація.

Отримані результати підтверджують припущення про суттєву дію жіночих статевих гормонів в складі КЕП на організм самців, що виражається в анаболічному ефекті і дезадаптації ЦНС. Крім того, на реалізацію поведінкового акту можуть також впливати різноманітні регуляторні чинники, цитокіни, сигнальні молекули, що присутні в КЕП і які здатні включатися в нейромедіаторні системи, по-різному модулюючи нейрохімічні процеси у самців і самиць.

Отже, визначено, що імплантація КЕП впливає на вікові зміни поведінки піддослідних мишей, що старіють, причому напрямок впливу залежить від їх статі. Встановлено також, що КЕП, імплантація яких застосована для попередження вікових змін у старіючих тварин, забезпечуючи надходження в організм плацентарних сполук, чинить суттєву геропротекторну дію.

5.2 Вплив імплантації кріоконсервованих експлантів плаценти на структуру зовнішньої пластинки моторної кори півкуль головного мозку та зубчастої звивини Амонова рогу гіпокампа старіючих мишей

Оскільки вікові порушення когнітивних процесів асоційовані з морфологічними змінами в гіпокампі – структурі ГМ, пов'язаної з пам'яттю, мотивацією і стратегією поведінки, в ГМ експериментальних тварин досліджували область зубчастої звивини Амонова рогу гіпокампа та зовнішньої пластинки моторної кори півкуль ГМ, яка відповідає за рухові функції. Під час гістологічного дослідження ГМ 6-місячних мишей (молоді тварини) були виявлені ознаки, що свідчать про морфологічну збереженість тіл пірамідних нейронів гіпокампа та зовнішньої пластинки моторної кори півкуль ГМ (рис.5.2.1).

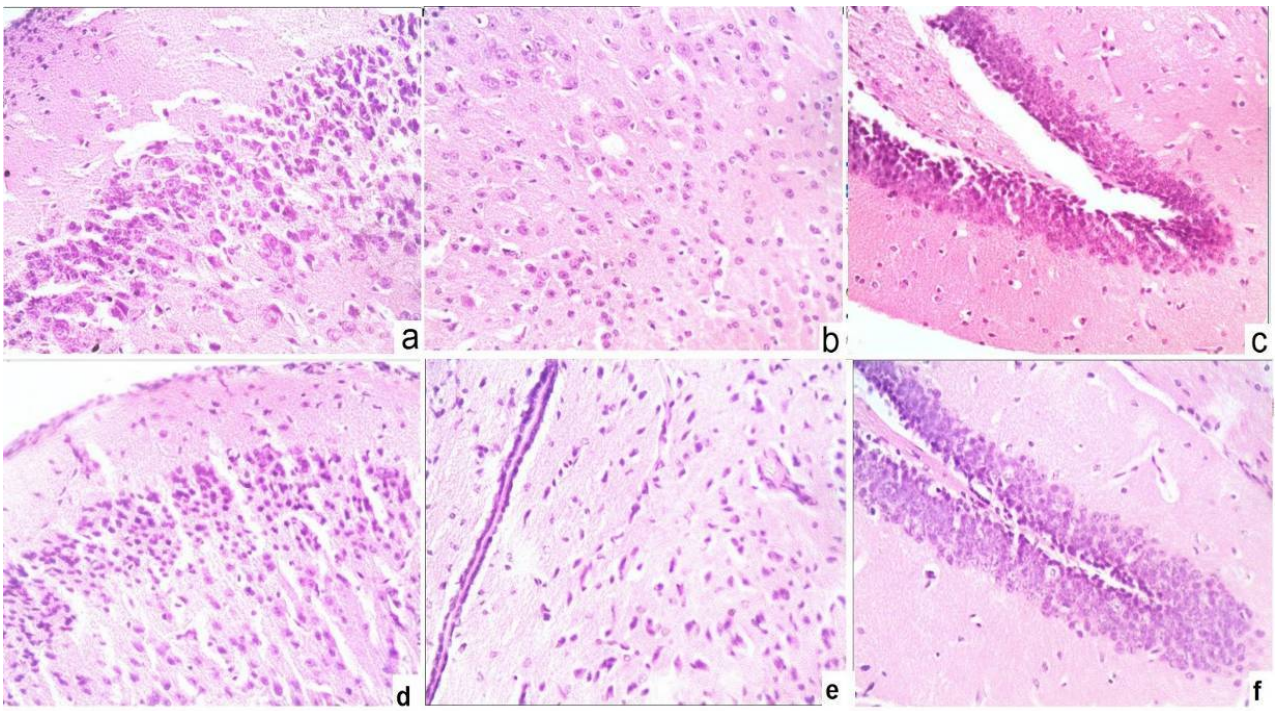


Рис. 5.2.1. Головний мозок молодих мишей: самців (a-c) та самиць (d-f); a, d – зовнішня пластинка моторної кори; b, e – гліальна тканина; c, f – зубчаста звивина Амонова рогу гіпокампа. Забарвлення гематоксиліном та еозином, × 400.

При проведенні гістологічного дослідження гіпокампа і зовнішньої пластинки моторної кори ГМ старіючих (12-місячних) мишей відзначалися дегенеративні зміни нейронів різного ступеня вираженості – від незначного помутніння цитоплазми до втрати ядерець, зменшення гомогенності хроматину і оптичної щільності цитоплазми, істотного візуального зменшення розмірів, а також появи в ядрах морфологічно змінених нейронів двох ядерець (рис. 5.2.2).

Слід зазначити також збільшення кількості пошкоджених нейронів, які замінялися клітинами глії, що є одним із проявів енцефалопатії. Спостерігалася також редукція чисельної щільності нейронів і збільшення кількості гіпохромних нейронів. Таким чином, у старіючих мишей на тлі зменшення щільності розподілу нейронів відбувалася їх гіпертрофія.

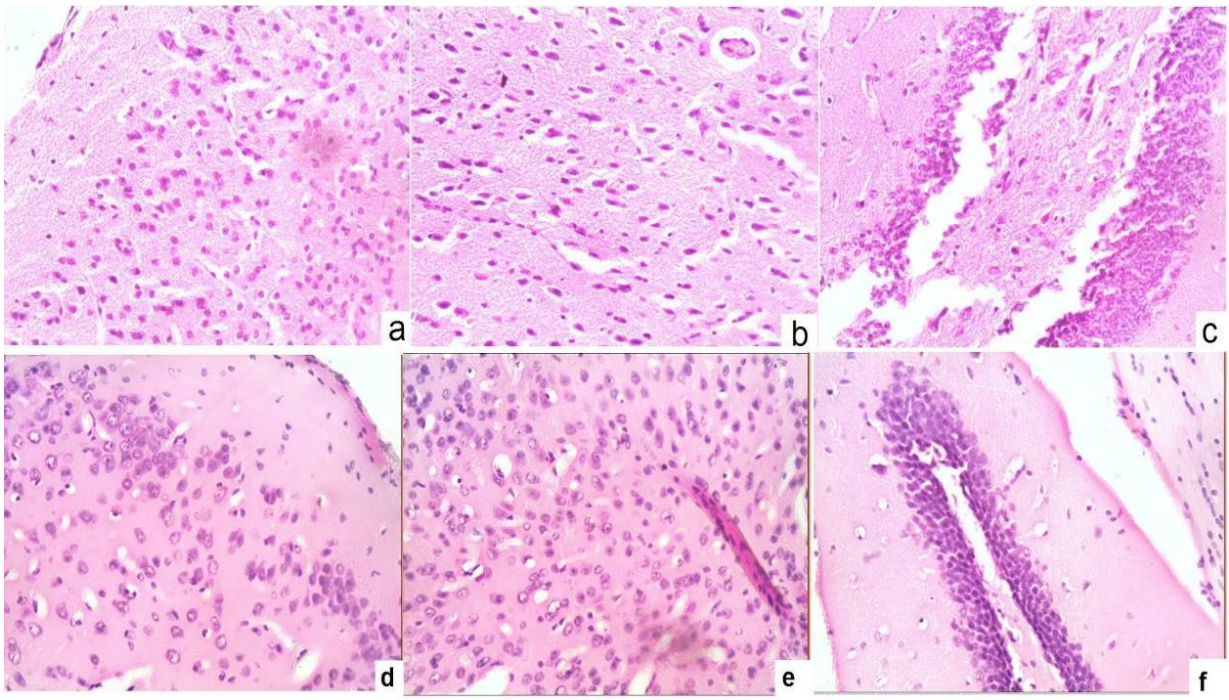


Рис. 5.2.2. Головний мозок старіючих мишей: самців (a-c) та самиць (d-f); a, d –зовнішня пластинка моторної кори; b, e – гліальна тканина; c, f – зубчаста звивина Амонова рогу гіпокампа. Забарвлення гематоксиліном та еозином, × 400.

Під час гістологічного дослідження ГМ старіючих мишей, яким були імплантовані КЕП, спостерігались позитивні зміни: відновлення чисельності та щільності пірамідних нейронів зовнішньої пластинки моторної кори, зменшення кількості гіпохромних нейронів, відсутність гліозу, а також зменшення проявів енцефалопатії (рис. 5.2.3, d, e).

При проведенні морфологічного дослідження гіпокампа виявлено значно меншу кількість нейронів з дегенеративними змінами і вираженим зменшенням розмірів тіл нейронів. Спостерігали також проліферацію пірамідних нейронів гіпокампа (рис. 5.2.3, f), що є ознакою реактивації нейрогенезу.

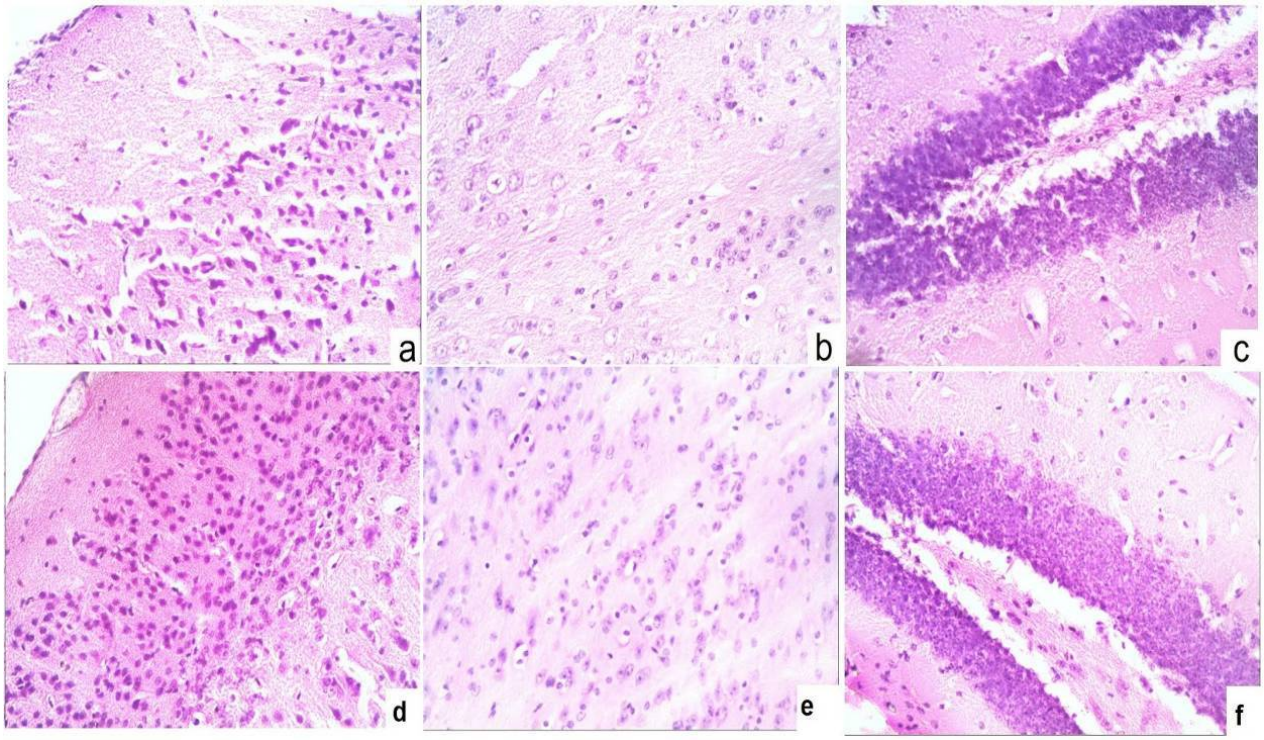


Рис. 5.2.3. Головний мозок старіючих мишей після імплантації кріоконсервованих експлантів плаценти: самців (a-c) та самиць (d-f); a, d – зовнішня пластинка моторної кори; b, e – гліальна тканина; c, f – зубчаста звивина Амонова рогу гіпокампа. Забарвлення гематоксиліном та еозином, × 400.

Згідно з отриманими результатами, імплантація КЕП старіючим мишам позитивно впливає на морфологію гіпокампа і моторної кори. Ймовірно, БАР в складі КЕП, діючи комплексно, природним чином стимулюють нейрогенез. Такими речовинами, наприклад, можуть бути нейротрофічні чинники росту нервів та судин та нейротрофоподібні молекули, які посилюють репаративний білковий синтез [40,41,245].

Методологія цього дослідження дозволяє інтерпретувати отримані результати, як прояв стимулюючої дії біологічно активних складових імплантованих КЕП на гіпокамп і моторну кору піддослідних тварин, оскільки зміни морфологічних ознак у ГМ тварин, що старіють, після імплантації КЕП

набувають позитивної направленості та свідчать про нівелювання негативної вікової внутрішньоклітинної альтерації.

По матеріалам розділу 5 опубліковано роботи [264-268].

РОЗДІЛ 6
ОЦІНКА ЕФЕКТИВНОСТІ ЗАСТОСУВАННЯ ІМПЛАНТАЦІЇ КРІОКОНСЕРВОВАНИХ ЕКСПЛАНТІВ ПЛАЦЕНТИ ДЛЯ КОРЕКЦІЇ ПОРУШЕНЬ ЦНС У САМИЦЬ МИШЕЙ В МОДЕЛІ ДИСЦИРКУЛЯТОРНОЇ ЕНЦЕФАЛОПАТІЇ В ПОСТМЕНОПАУЗІ

6.1 Поведінкові реакції оваріоектомованих самиць мишей в моделі дисциркуляторної енцефалопатії та після імплантації кріоконсервованих експлантів плаценти

Зміна поведінки на перших етапах адаптації до впливу різних екстремальних чинників є навіть більш інтегральним показником характеру відповіді на дію, ніж біохімічні і фізіологічні зрушення [166, 269]. Тому для оцінки впливу ішемічного пошкодження на функції ГМ в моделі ДЕ, оваріоектомії, а також можливого нейропротекторного ефекту КЕП, вивчали поведінкові реакції мишей.

Дослідження показало, що в тесті «відкрите поле» після операцій оваріоектомії (група II ПМП), ОСА (група III ДЕ), а також в моделі ДЕ в ПМП (група IV) кількість актів орієнтаційно-дослідницької поведінки (вертикальної, горизонтальної активності і грумінгу) значно (майже на 50 %) знизилося в порівнянні з групою хибнооперованих тварин (крім кількості актів грумінгу в групі з модельованою ДЕ). Введення КЕП позитивно впливало на зміни орієнтаційно-дослідницької поведінки мишей у порівнянні з мишами інших експериментальних груп, наближаючи показники вертикальної і горизонтальної локомоторної активності, а також грумінгу, до норми (таблиця 6.1). Слід зазначити достовірне збільшення кількості стійок в групі мишей з моделлю ДЕ в ПМП з імплантованим КЕП в порівнянні з групою тварин з модельованою ДЕ

в ПМП без застосування КЕП, що відображає істотну коригуючу дію КЕП на дослідницьку поведінку мишей.

Таблиця 6.1

Поведінка самиць мишей в модельних експериментах

(M±m, n=10 в кожній групі)

Групи / Показники	I К	II ПМП	III ДЕ	IV ДЕ в ПМП	V ДЕ в ПМП+КЕП
Кількість відвіданих квадратів в тесті «Відкрите поле»	158,2±21,3	84,7±8,3*	71,6±7,2*	80,2±11,1*	112,2±10,4
Кількість актів грумінгу	2,9±0,6	1,0±0,1	3,2±0,3	1,1±0,1*	1,6±0,3
Кількість стійок в тесті «Відкрите поле»	47,9±7,3	29,3±2,3*	25,9±1,8*	7,3±4,2*	35,5±5,8**
Час, проведений в закритому рукаві підведеного хрестоподібного лабіринту, с	145,9±13,4	198,7±17,2	243,7±20,3*	211,1±15,8*	202,9±23,2
Час, проведений з іншою твариною, с	146,8±14,2	106,7±9,5	127,3±12,3	154,9±14,2	112,5±11,2

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

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

Анксиолітичний тест виявив збільшення часу, проведеного мишами експериментальних груп з модельованою патологією в закритому рукаві хрестоподібного підведеного лабіринту, в порівнянні з хибнооперованими тваринами. Така поведінка характерна для тварин в стані стресу або при патологічних станах і є ознакою збільшення тривожності та порушення здатності організму тварин до адаптації. При цьому, після введення КЕП спостерігалося зниження часу, проведеного мишами в закритому рукаві лабіринту, що можна розцінювати, як результат анксиолітичної дії есенціальних плацентарних речовин.

При дослідженні зоосоціальної поведінки мишей, а саме: часу, проведеного мишею з іншою твариною, достовірних відмінностей зазначеного показника між групами мишей не виявлено.

Таким чином, всі досліджені показники поведінки, за винятком зоосоціальної, виявляють тенденцію до погіршення в усіх досліджених моделях патологічних станів, а також поліпшуються після застосування імплантації КЕП. Введення КЕП позитивно впливає на зміни орієнтаційно-дослідницької поведінки оваріоектомованих мишей в моделі ДЕ, наближаючи досліджувані показники до норми.

6.2 Вплив імплантації кріоконсервованих експлантів плаценти на функціональну міжпівкульну асиметрію та когнітивно-мнестичні функції самиць мишей в моделі дисциркуляторної енцефалопатії в постменопаузі

Особливості міжпівкульної взаємодії в моторній сфері пов'язані зі специфікою виконання різних когнітивних завдань і особливостями емоційного реагування [270]. Тому особливості поведінкових реакцій і когнітивної функції у тварин тісно пов'язані з міжпівкульною взаємодією і повинні досліджуватися в комплексі.

Індивідуально-типологічні властивості нервової системи є однією з найбільш чутливих систем до впливу чинників різної природи та інтенсивності, знаходячи своє відображення в міжпівкульній асиметрії (МА) і в індивідуальному профілі функціональної асиметрії [270-272]. Функціональна асиметрія діяльності півкуль залежить, в основному, від трьох чинників: асиметрії зовнішнього середовища, характеру міжпівкульних взаємодій і специфічних особливостей роботи кожної півкулі. Безпосередню участь в діяльності асиметрично розташованих нервових центрів беруть енергетичні процеси, тому показники церебрального енергетичного метаболізму добре корелюють з різними видами сенсорних, моторних і пізнавальних асиметрій [273,274].

Відомо, що права півкуля у вищих ссавців пов'язана переважно з реалізацією вроджених і набутих автоматизмів, тоді як ліва залучається до діяльності кожного разу, коли виникає потреба в аналізі нової ситуації і пошуку оптимальних рішень. Про певну «спеціалізацію» лівої півкулі в когнітивно-комунікативній організації поведінки, а правої – в мотиваційній сфері, свідчить і характер розподілу медіаторних систем. «Когнітивні» медіатори – дофамін, гамма-аміномасляна кислота і ацетилхолін – «тяжіють» до лівої півкулі, а «мотиваційно-емоційний» серотонін і норадреналін – до правої. Виявлена правобічна біохімічна асиметрія при вивченні продуктів окислення ліпідів і співвідношення холестерину до фосфоліпідів після стресу у щурів [271,275-277].

Функціональна міжпівкульна асиметрія відображає нерівнозначність функцій правої і лівої півкуль ГМ в моторній, сенсорній та психічній діяльності людини і тварин. Функціональні асиметрії не є стабільними і залежать від впливу зовнішнього середовища і патогенних факторів. Організація міжпівкульних, особливо психічних, процесів і роль кожної півкулі може змінюватися в залежності від завдань діяльності, тобто носить динамічний характер [274,279,280].

Ступінь домінування і характер розподілу функцій між півкулями індивідуальні. У зв'язку з цим використовують термін латеральний профіль (профіль функціональної сенсомоторної асиметрії, профіль латеральної організації мозку, індивідуальний профіль функціональної МА) [272,276,280]. З латеральним профілем функціональної МА корелюють такі ознаки і властивості, як стійкість організму до стомлення, статеві відмінності функціональної асиметрії мозку, особливості вегетативної регуляції, адаптаційні властивості і особливості нервової діяльності, характер перебігу захворювань, пов'язаних з порушенням регуляторних функцій мозку [273,281].

Профіль латеральної асиметрії мозку залежить від міжпівкульних взаємодй в аналізаторних системах в цілому. Тому показники сенсомоторних реакцій, що відображають функціональну рухливість нервових процесів, є

прогностичним параметром функціонального стану ЦНС. При цьому функціональна моторна асиметрія включає різні рухові прояви, як, наприклад, просторова асиметрія (перевага правого або лівого боку при локомоції), асиметрія пози в нормі і після унілатерального ушкодження мозку, переважне використання правих чи лівих кінцівок в маніпуляційних рухах і т.д. [270,272,279].

Функціональна МА має ієрархічну структуру, представлену на різних рівнях організації біологічних систем (поведінковому, нейрофізіологічному, енергетичному, біохімічному, елементоорганічному). Проблема функціональної моторної асиметрії у тварин становить частину загальної проблеми асиметрії організації і функцій мозку, куди входить також морфологічна асиметрія різних структур мозку, хімічна асиметрія вмісту медіаторів, метаболітів та інших речовин, асиметрія міжпівкульних взаємин і електричної активності мозкових структур [273,276-279].

При дослідженні МА виявлено, що найбільше зниження коефіцієнту МА (КМА) відбулося в групі тварин з ДЕ і ДЕ в ПМП. У тварин з ДЕ КМА змінив знак на протилежний (таблиця 6.2).

У ряді досліджень показано, що при дії екстремальних факторів та напружених адаптивних процесах можливе зниження асиметрії аж до інверсії півкульного домінування у відношенні як моторних, так і вищих психічних функцій. В умовах гострого і хронічного стресу, а також при різних захворюваннях, пов'язаних з порушенням регуляторних функцій мозку, активність правої гемісфери часто посилюється, а лівої – знижується, таким чином МА згладжується. У більшості випадків це супроводжується активацією вегетативних реакцій і впливає на моторну асиметрію [258,261,265].

В модельних експериментах спостерігалося зниження КМА в моделі ПМП і ДЕ в ПМП, а також інверсія КМА в моделі ДЕ, що відповідає літературним даним [260,263] і є підтвердженням адекватності обраних нами експериментальних моделей ПМП, ДЕ і ДЕ в ПМП, як патологій, пов'язаних з порушенням регуляторних функцій організму.

Найбільше зниження – до інверсії КМА – відбувалося у мишей з моделлю ДЕ (зі зміною домінуючої півкулі) і у мишей з ДЕ в ПМП (зниження КМА без зміни домінуючої півкулі).

Таблиця 6.2

Когнітивні функції та коефіцієнт міжпівкульної асиметрії самиць мишей в модельних експериментах (M±m, n=10 в кожній групі)

Групи / Показники	I К	II ОЕ	III ДЕ	IV ОЕДЕ	V ОЕДЕ+КЕП
Час дослідження об'єктів, с	2,1±0,2	1,5±0,12	2,4±0,21	1,6±0,14	1,4±0,11*
Час дослідження нового об'єкта, с	5,1±0,5	1,7±0,15*	2,9±0,21*	3,0±0,4*	4,7±0,5
Коефіцієнт міжпівкульної асиметрії	8,0±0,6	4,7±0,2	-1,6±0,8	1,3±0,3	3,8±0,5
Домінуюча півкуля	Ліва	Ліва	Права	Ліва	Ліва

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

Перебудова міжпівкульних відносин відіграє важливу роль в процесах адаптації. При помірному стресі активність частіше переміщається в субдомінантну півкулю, що супроводжується зміною центральної регуляції гомеостазу. Однак при деяких видах патології і при старінні подібне перемикання ускладнено, що супроводжується порушенням адаптаційних процесів [270,273]. Вважається, що зменшення асиметрії у літніх людей може бути пов'язане зі зниженням спеціалізації півкуль і/або пластичними перебудовами, спрямованими на компенсацію дисфункції мозку, пов'язаної з енергетичним дефіцитом і втратою нейронів. Згладжування МА пов'язане також зі змінами мозкового кровотоку, який при старінні погіршується більш значно в лівій півкулі [273,274].

Таким чином, інверсію МА в 3-й групі піддослідних тварин можна розцінювати, як максимальне включення адаптаційних процесів в моделі ДЕ у мишей із збереженою естрогенпродукуючою функцією. У мишей з ДЕ в ПМП з 4-ої групи, ймовірно, відбувалася дезадаптація, при якій ми спостерігали максимально знижений КМА (згладжування міжпівкульної асиметрії) без переміщення активності в субдомінантну півкулю. Після введення КЕП оваріоектомованим мишам з ДЕ (5 група) спостерігалося збільшення КМА до 50 % від його значення у мишей з контрольної групи. Збільшення КМА після застосування КЕП в моделі ДЕ в ПМП доводить позитивний вплив есенціальних речовин в складі КЕП – гормонів, а також речовин з нейротрофічними і нейропротекторними властивостями – на адаптаційні функції організму тварин.

Когнітивні порушення (зниження інтелектуально-мнестичних функцій) є ключовим проявом судинної недостатності або дисциркуляторної енцефалопатії, які багато у чому визначають тяжкість хвороби.

Аналіз експериментальних даних дослідження когнітивно-мнестичних функцій мишей показав зниження часу дослідження нового об'єкта в тесті запам'ятовування його положення у всіх експериментальних групах тварин, за винятком 5-ої групи. При цьому миші з груп з моделями ПМП і ДЕ мали достовірно не відмінні в кожній з груп показники часу дослідження нового і звичного об'єктів, що є ознакою неадекватної реакції для даного нейрофізіологічного тесту. Як правило, при дослідженні нового об'єкта гризуни більше часу приділяють саме йому, а час, приділений звичним об'єктам, скорочується. Крім того, що показники часу дослідження нового і звичного об'єктів мишами в кожній з груп 2 і 3 достовірно не відрізнялися, час дослідження нового об'єкта в кожній з груп 2 - 4 був меншим, ніж у контрольній групі. Таким чином, максимальне зниження когнітивно-мнестичних функцій спостерігалося у мишей в моделях ПМП і ДЕ (тварини відрізняли новий об'єкт від звичного). Когнітивно-мнестичні функції самиць мишей з моделлю ДЕ в ПМП були більш збережені в порівнянні з такими у

тварин з груп II і III (таблиця 6.3). Після введення КЕП мишам з моделлю ДЕ в ПМП спостерігалося істотне (на 56 %) збільшення часу дослідження нового об'єкта, яке наближалося до такого в контрольній групі тварин.

Одночасне зниження МА і скоротчення часу дослідження нового об'єкта в тесті запам'ятовування положення об'єкта є підтвердженням патологічного впливу дефіциту естрогенів і хронічної ішемії мозку в моделях ПМП, ДЕ і ДЕ в ПМП як на адаптаційні, так і на когнітивно-мнестичні функції тварин.

Моторна перевага має хімічну природу і може бути пов'язана з хімічною асиметрією мозкових структур. Показано асиметричний розподіл ацетилхолінових, дофамінових, ГАМК-рецепторів в гіпокампі та корі гризунів [276-278]. Відома хімічна асиметрія нігро-стріарної системи [274]. Висловлюється припущення про можливу роль вазопресину і інших асиметрично діючих пептидів в організації моторної переваги [276]. Виявлено також відмінності в швидкості кровотоку між однойменними судинними системами та енергетичному метаболізмі в лівій і правій півкулях [273,280].

Таким чином, введення КЕП в організм тварини, завдяки комплексу БАР, що містяться в плаценті, впливає на міжпівкульну і моторну асиметрію. Такими БАР можуть бути нейротрофічні і нейропротекторні речовини такі, як чинники росту нервів і судин і т.ін.

У мишей всіх досліджених груп, за винятком групи 3 (модель ДЕ), домінуючою півкулею була ліва. При цьому, як в 3-й групі (модель ДЕ), так і в 2-й (ПМП), тривалість часу дослідження звичних об'єктів і нового об'єкта достовірно не відрізнялися. Таким чином, як відсутність естрогенів при домінуванні лівої півкулі, так і ДЕ при збереженій функції яєчників, але при домінуванні правої півкулі, призводять до істотного зниження здатності тварин відрізняти новий об'єкт від звичного, що може свідчити про зниження когнітивних здібностей тварин в моделях ДЕ і ПМП .

Спостерігалося також збільшення часу дослідження нового об'єкта тваринами V групи (в моделі ДЕ в ПМП після імплантації КЕП) до значення, що достовірно не відрізнялося від значення для групи хибнооперованих мишей.

Цей факт інтерпретується, як поліпшення когнітивно-мнестичних функцій піддослідних тварин.

Виявлене достовірне збільшення КМА після застосування КЕП в моделі ДЕ в ПМП доводить коригуючу дії есенціальних сполук у складі КЕП на адаптаційні функції мозку, а також на стійкість тварин до стресу і здатність до аналізу і пошуку оптимального рішення і таким чином позитивно впливає на перебіг модельованноїдисциркуляторної енцефалопатії в постменопаузі.

6.3 Вплив імплантації кріоконсервованих експлантів плаценти на структури головного мозку самиць мишей в моделі дисциркуляторної енцефалопатії в постменопаузі

На експериментальних моделях ПМП, ДЕ, ДЕ в ПМП, а також при визначенні впливу КЕП на ГМ оваріоектомованих тварин на моделі ДЕ досліджували структури ГМ, які пов'язані з когнітивно-мнестичними функціями, що в першу чергу змінюються при ДЕ і дефіциті естрогенів, – гіпокамп і моторну кору півкуль головного мозку.

6.3.1 Морфологічні характеристики гіпокампа і моторної кори півкуль головного мозку хибнооперованих самиць мишей

Під час гістологічного дослідження ГМ 6-місячних хибнооперованих самиць мишей (група 1 – контроль, рис .6.3.1.1) були отримані результати, що свідчать про морфологічну збереженість тіл пірамідних нейронів гіпокампу і зовнішньої пластинки моторної кори півкуль без ознак дегенерації, перицелюлярного набряку та інших проявів енцефалопатії. При цьому серед морфологічно незмінених клітин гіперхромні клітини не виявлялися, але відзначалась наявність 2 ядерець в ядрах, що свідчило про активність білок-синтетичних процесів.

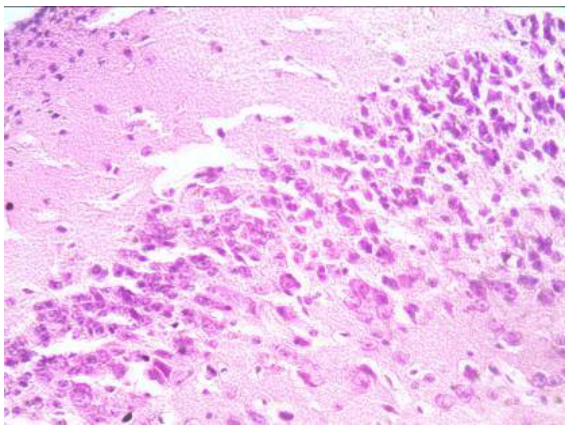


Рис. 6.3.1.1. Мікропрепарат головного мозку хибнооперованої самиці миші (група 1). Пірамідні нейрони зовнішньої пластинки моторної кори. Забарвлення гематоксиліном та еозином, × 400

Патологічних змін в структурі гіпокампу та гіперхромних клітин не виявлялося. Зубчаста звивина або зубчаста фасція візуалізувалася в препаратах у вигляді компактної смужки дрібних гранулярних нейронів та складалася з трьох шарів: молекулярного, гранулярного (зернистого) та поліморфного (мультиформного).

В гліальній тканині не спостерігалося збільшення кількості гліальних клітин (рис. 6.3.1.2). В цілому гістологічна картина відповідала активному фізіологічному морфофункціонального стану нервової тканини ГМ.

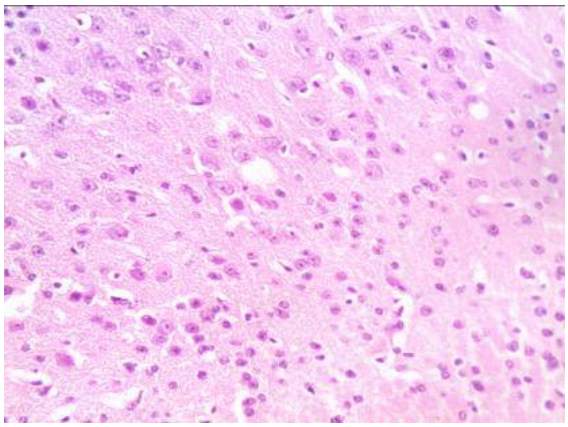


Рис. 6.3.1.2. Мікропрепарат головного мозку хибнооперованої самиці миші (група 1). Клітини гліальної тканини. Забарвлення гематоксиліном та еозином, ×400

Змін в морфологічній будові зубчастої звивини Амонова рогу гіпокампа не виявлялося: нейрони мали правильну форму і тісно прилягали один до одного, виявлені лише поодинокі загиблі нейрони, цитоархітектоніка практично не була змінена (рис. 6.3.1.3). Аналізуючи отримані данні гістологічного дослідження ГМ хибнооперованих самиць мишей, можно зробити висновок, що проведене цим тваринам хірургічне втручання не вплинуло на структури їх ГМ і дана експериментальна група може слугувати позитивним контролем в дослідженні.

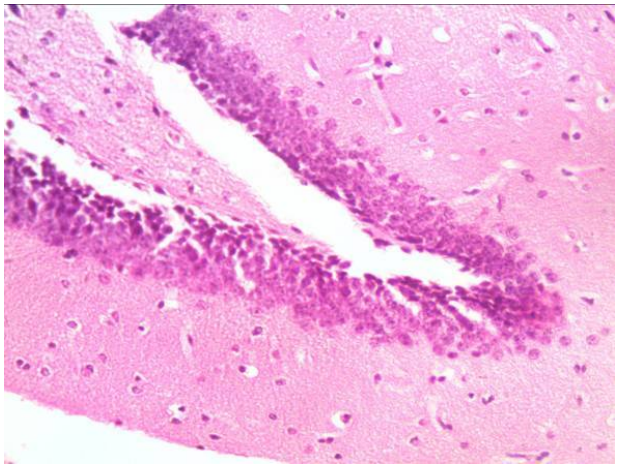


Рис. 6.3.1.3. Мікропрепарат зубчастої звивини Амонова рогу гіпокампа головного мозку хибнооперованої самиці миші (група 1). Забарвлення гематоксиліном та еозином, ×400

6.3.2 Морфологічні характеристики головного мозку самиць мишей в моделі дисциркуляторної енцефалопатії

Під час гістологічного дослідження ГМ самиць мишей з моделлю ДЕ (група 2) було виявлено, що пірамідні нейрони зовнішньої пластинки моторної кори півкуль були розташовані купчасто, вузькою смугою, в деяких нейронах виявлялися дрібні пікнотичні ядра, в інших – великі гіперхромні ядра, що знаходяться протягом клітинного циклу в конденсованому (компактному) стані. Спостерігався слабкий перицелюлярний набряк, кровоносні капіляри і дрібні судини були розширені і заповнені форменими елементами крові (рис. 6.3.2.1).

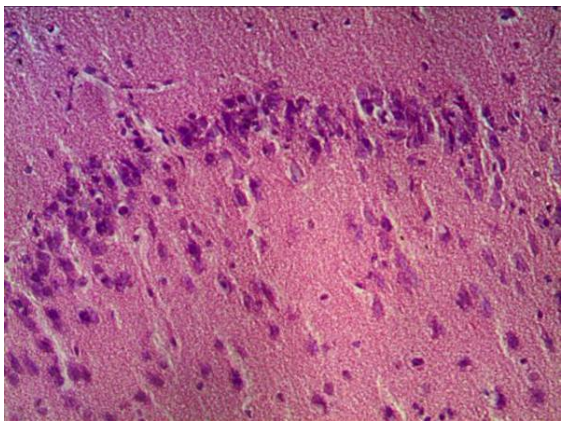


Рис. 6.3.2.1. Головний мозок самиці миші з моделлю ДЕ (група 2). Пірамідні нейрони зовнішньої пластинки моторної кори півкуль з дрібними пікнотичними і великими гіперхромними ядрами. Перицелюлярний і перикапілярний набряк. Розширені капіляри заповнені кров'ю. Забарвлення гематоксиліном та еозином, × 400

В гліальній тканині спостерігалися ядра всіх типів гліоцитів, загальна кількість клітин була збільшеною. Реакцію глії на пошкодження структур ГМ, спрямовану на їх відновлення і яка характеризується збільшенням числа гліоцитів (гліоз), можна класифікувати, як виражену.

Спостерігалися слабкий перицелюлярний набряк, а також порушення мікроциркуляторного русла у вигляді стазів (компресії судин) і некробіотичних трансформацій судинних стінок, з ознаками порушення їх проникності і виходу в перикапілярний простір формених елементів крові, що підтверджувалося знаходженням гемосидерину – темно-коричневого пігменту, що утворюється при розпаді гемоглобіну (рис. 6.3.2.2, а, б), і є одним із симптомів кисневого голодування. Крім того, спостерігалися кістозно-гліозні зміни ГМ: ознаки патологічного розростання гліальної тканини (рис. 6.3.2.2, в).

Виявлялася значна реструктуризація нейро-гліальних взаємовідносин і капілярної мережі. Пошкоджені ділянки гліальної тканини були інфільтровані численними макрофагами і окремими гранулоцитами, головним чином, нейтрофілами.

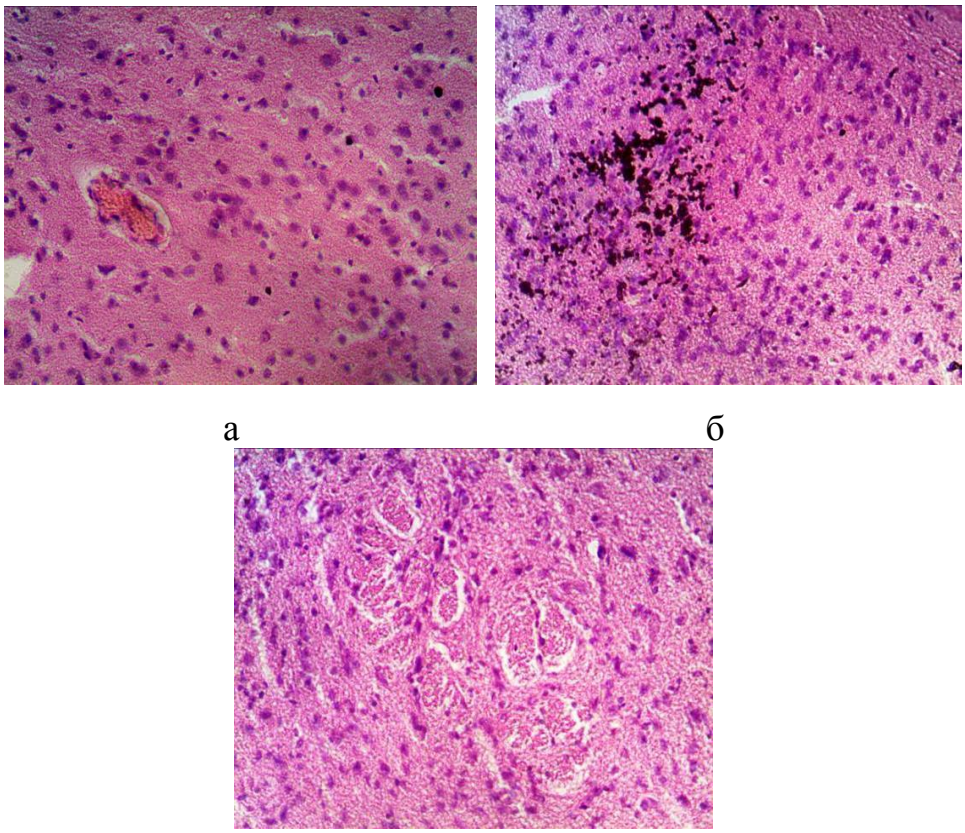


Рис. 6.3.2.2. Головний мозок самиці миші з моделлю ДЕ (група 2). Гліальна тканина. а – тромб в кровоносній судині; б – крововиливи і утворення гемосидерину; в – кістозно-гліозні утворення. Забарвлення гематоксиліном та еозином, × 400

Спостерігалась велика кількість тонкостінних судин (рис. 6.3.2.3).

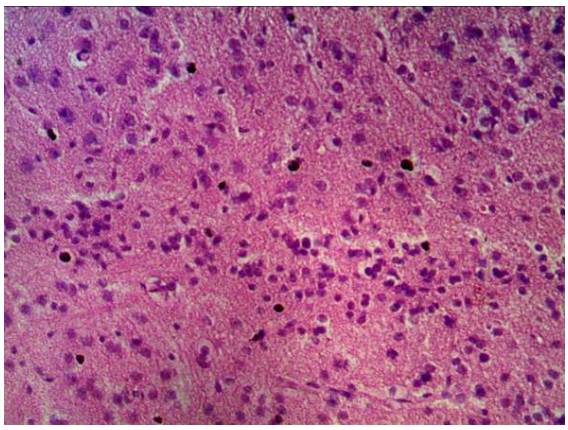


Рис. 6.3.2.3. Головний мозок самиці миші з моделлю ДЕ (група 2). Гліальна тканина. Виражений гліоз. Пошкоджені ділянки гліальної тканини інфільтровані численними макрофагами. Забарвлення гематоксиліном та еозином. × 400

В нейронах зубчастої звивини Амонова рогу гіпокампа виявлялися великі гіперхромні ядра (рис. 6.3.2.4). Цитоархітектоніка була незначно порушена (виявлялися ділянки без нейронів). У зубчастій звивині спостерігався виражений набряк. Тіла нейронів мали округлу форму, в них виявлялася збільшена інтенсивність базофілії і гіперхроматоз, який часто зустрічається при бурхливому розмноженні клітин. Таким чином, встановлено, що пошкодження ГМ при моделюванні ДЕ індукує формування нових клітин в зубчастій звивині Амонова рогу гіпокампа.

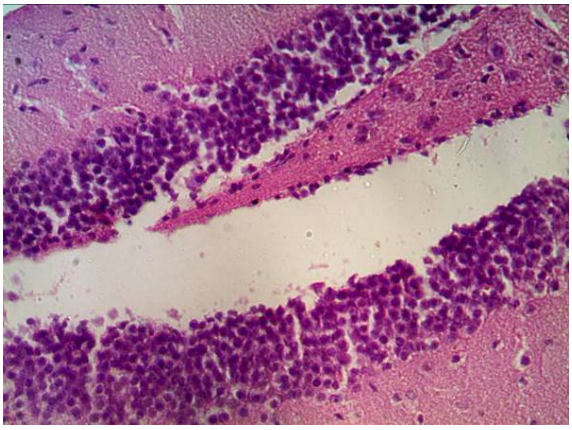


Рис. 6.3.2.4. Головний мозок самиці миші з моделлю ДЕ (група 2). Зубчаста звивина Амонова рогу гіпокампа. Цитоархітектоніка порушена. Тіла нейронів округлої форми зі збільшеною інтенсивністю базофілії – гіперхроматоз. Виражений набряк. Забарвлення гематоксиліном та еозином, × 400

Отримані результати вказують на наявність морфологічних змін в структурах ГМ при моделюванні ДЕ, які виражаються в ознаках дегенерації, перицелюлярному набряку і проявах енцефалопатії у вигляді порушення цитоархітектоніки, компресії кровоносних судин, скороченні кількості та пікнозі ядер нейронів зовнішньої пластинки моторної кори, патологічному розростанні гліальної тканини і інфільтрації її численними макрофагами, а також в гіперхроматозі ядер нейронів гіпокампа.

6.3.3 Морфологічні характеристики головного мозку оваріоектомованих самиць мишей.

Гістологічне дослідження ГМ самиць мишей після оваріоектомії (група 3) показало, що пірамідні нейрони зовнішньої пластинки моторної кори розташовувалися рідко, широкою смугою, ядра в них частково були дрібними і пікнотичними, а частково – збільшеними і гіперхромними. Спостерігався перицелюлярний і перикапілярний набряк, кровоносні капіляри і дрібні судини були дилатовані (рис. 6.3.3.1).

В гліальній тканині, яка забезпечує транспортування поживних речовин до нейронів і виконує захисну і структурну функції, виявлялися пікнотичні і гіперхромні ядра гліоцитів, загальна кількість яких була зменшеною. Гліальну реакцію можна визначити, як гліоцитопенію, причому цей процес мав дифузний характер. Реакцію глії на пошкодження структур головного мозку, що відбулися внаслідок змодельованної постменопаузи у самиць мишей. можна класифікувати, як виражену.

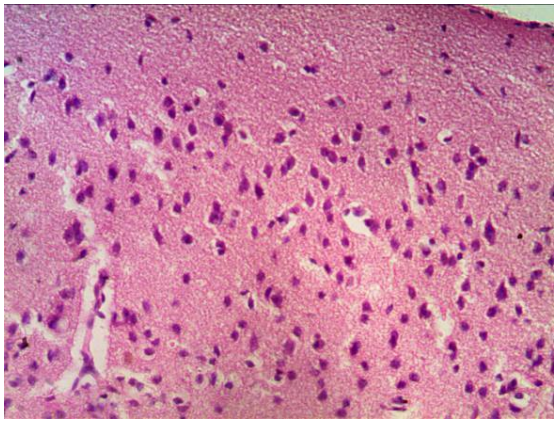


Рис. 6.3.3.1. Головний мозок самиці миші з оваріоектомією (група 3). Рідко розташовані пірамідні нейрони зовнішньої пластинки моторної кори півкуль з пікнотичними і збільшеними гіперхромними ядрами. Перицелюлярний і перикапілярний набряк. Кровоносні капіляри дилатовані. Забарвлення гематоксиліном та еозином, × 400.

При цьому спостерігалися значний перицелюлярний набряк і порушення мікроциркуляторного русла у вигляді стазів капілярів і дрібних кровоносних судин (рис. 6.3.3.2).

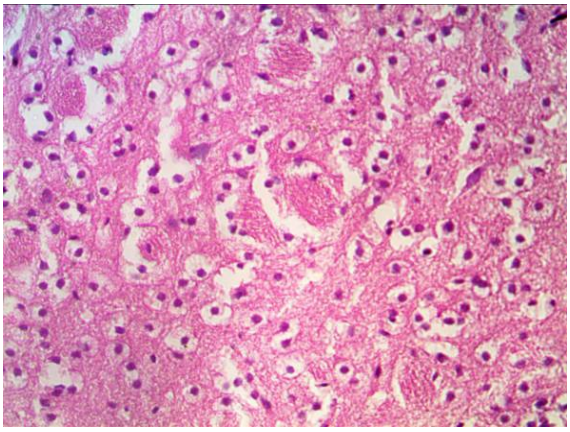


Рис. 6.3.3.2. Головний мозок самиці миші з оваріоектомією (група 3). Гліальна тканина. Гліоцитопенія. Значний перицелюлярний набряк. Забарвлення гематоксиліном та еозином, × 400.

В нейронах зубчастої звивини Амонова рогу гіпокампа спостерігалися, поряд з великою кількістю пікнотичних, більш рідкіо, - гіперхромні ядра (рис. 6.3.3.3).

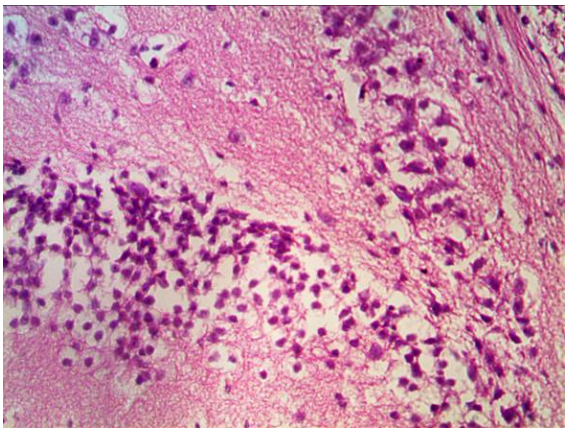


Рис. 6.3.3.3. Головний мозок самиці миші з оваріоектомією (група 3). Зубчаста звивина Амонова рогу гіпокампа. Цитоархітектоніка значно порушена. Тіла нейронів округлої форми зі збільшеною інтенсивністю базофілії. Виражений перицелюлярний набряк. Забарвлення гематоксиліном та еозином, × 400.

Цитоархітектоніка була значно порушена, спостерігалися ділянки, позбавлені нейронів. У зубчастій звивині спостерігався перицелюлярний набряк. Ядра хаотично розташованих нейронів мали округлу форму зі збільшеною інтенсивністю базофілії.

Таким чином, проведені гістологічні дослідження ГМ самиць мишей з оваріоектомією показали наявність морфологічних змін в структурах ГМ, які виражалися в порушенні цитоархітектоніки у вигляді зменшення кількості нейронів зовнішньої пластинки моторної кори з часто пікнотичними ядрами; в реакції гліальної тканини у вигляді гліоцитопенії і значного перицелюлярного набряку з порушенням мікроциркуляторного русла у вигляді стазів капілярів та дрібних кровоносних судин; високого ступеня обмеження цитоархітектоніки в зубчастій звивині Амонова рогу гіпокампа зі збільшеною інтенсивністю базофілії тіл нейронів і вираженим перицелюлярний набряком.

6.3.4 Морфологічні характеристики головного мозку самиць мишей при моделюванні дисциркуляторної енцефалопатії в постменопаузі

При гістологічному аналізі препаратів ГМ самиць мишей з моделлю дисциркуляторної енцефалопатії на тлі постменопаузи (група 4) було виявлено, що пірамідні нейрони зовнішньої пластинки моторної кори розташовувалися широкою смугою, рідко, ядра в них частково були дрібними пікнотичними, а частково – збільшеними, з конденсованими хроматином. Спостерігався слабкий периваскулярний і перицелюлярний набряк, кровоносні капіляри і дрібні судини знаходилися в стані стазу (рис. 6.3.4.1).

Реакцію глії на пошкодження структур ГМ можна класифікувати, як виражену. При цьому спостерігалися пікнотичні і гіперхромні ядра гліоцитів, загальна кількість яких була збільшеною. Цю гліальну реакцію можна визначити, як гліоз, причому цей процес мав осередковий характер.

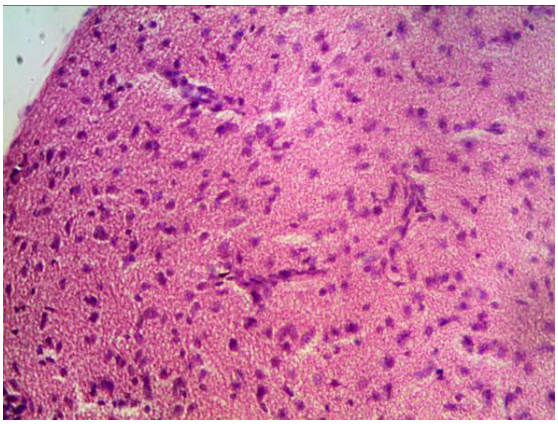
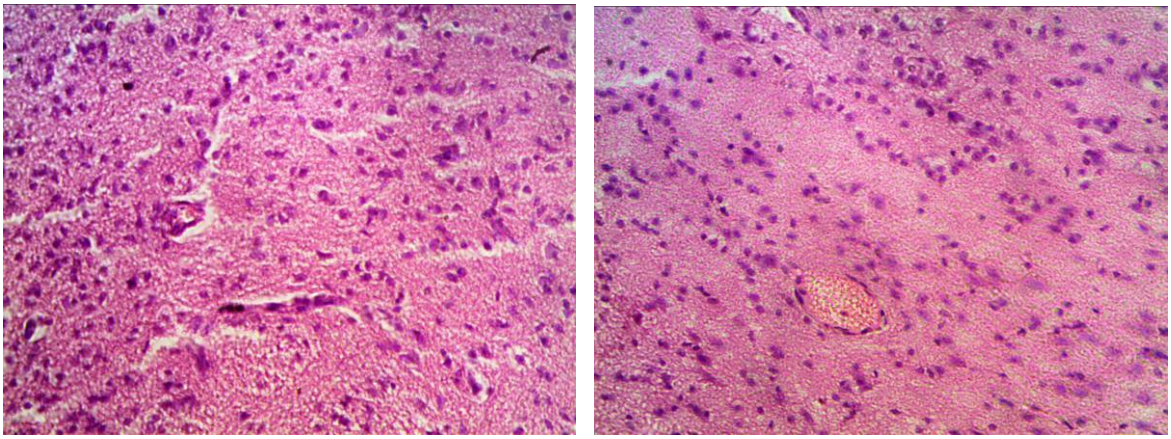


Рис. 6.3.4.1. Головний мозок самиці миші в моделі ДЕ в ПМП (група 4). Рідко розташовані пірамідні нейрони зовнішньої пластинки моторної кори з пікнотичними і великими гіперхромними ядрами. Слабкий периваскулярний та перицелюлярний набряк. Кровоносні судини і капіляри в стані стазу. Забарвлення гематоксиліном та еозином, ×400

Ділянки гліальної тканини були інфільтровані окремими макрофагами і гранулоцитами, головним чином, нейтрофілами, в них також спостерігалася велика кількість тонкостінних судин (рис. 6.3.4.2, а). Деякі кровоносні судини були розширені і заповнені кров'ю (рис. 6.3.4.2, б).



а б

Рис. 6.3.4.2. Головний мозок самиці миші в моделі ДЕ в ПМП (група 4). Гліальна тканина. а – вогнищевий гліоз, периваскулярний набряк, інфільтрація окремими макрофагами і гранулоцитами; б – кровоносні судини розширені і заповнені кров'ю. Забарвлення гематоксиліном та еозином, × 400

У зубчастій звивині Амонова рогу гіпокампа виявлялося порушення цитоархітектоніки, яке виражалося в безсистемному розташуванні тіл нейронів і перицелюлярном набряку. При цьому в більшості нейронів ядра були дрібні і пікнотичні, і тільки в деяких - великі і гіперхромні. У зубчастій звивині також спостерігався виражений набряк (рис. 6.3.4.3).

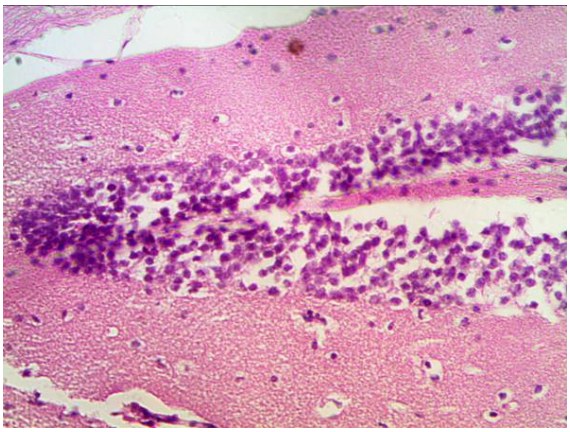


Рис. 6.3.4.3. Головний мозок оваріоектомованої самиці миші в моделі ДЕ на тлі ПМП (група 4). Зубчаста звивина Амонова рогу гіпокампа. Виражений перицелюлярний набряк. Ядра нейронів дрібні і пікнотичні, рідко – великі і гіперхромні. Забарвлення гематоксиліном та еозином., × 400

Таким чином, отримані результати вказують на наявність значних морфологічних змін в структурах ГМ при моделюванні ДЕ у тварин з оваріоектомією. Ці зміни виражаються в порушенні цитоархітектоніки, що характеризується хаотичним розташуванням і скороченням кількості нейронів зовнішньої пластинки моторної кори і зубчастої звивини Амонова рогу гіпокампа, станом стазу кровоносних судин і капілярів, патологічному розростанні і інфільтрації гліальної тканини макрофагами і гранулоцитами, а також – в гіперхроматозі ядер нейронів гіпокампу і вираженому набряку.

6.3.5 Морфологічні зміни в головному мозку самиць мишей при моделюванні дисциркуляторної енцефалопатії в постменопаузі після імплантації кріоконсервованих експлантів плаценти

Під час гістологічного дослідження ГМ самиць мишей з моделлю ДЕ в ПМП після імплантації КЕП (група 5) було виявлено, що пірамідні нейрони зовнішньої пластинки моторної кори розташовувалися широкою смугою, купчасто (рис. 6.3.5.1).

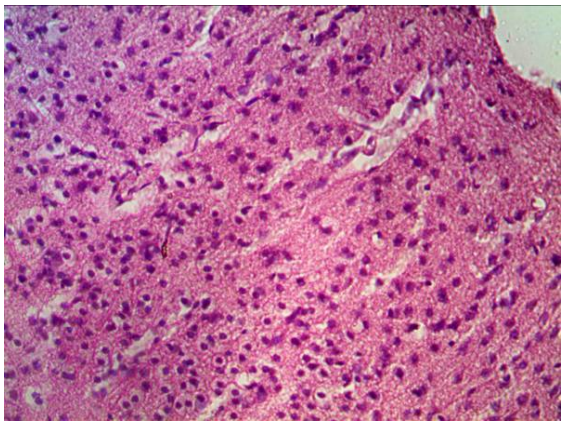
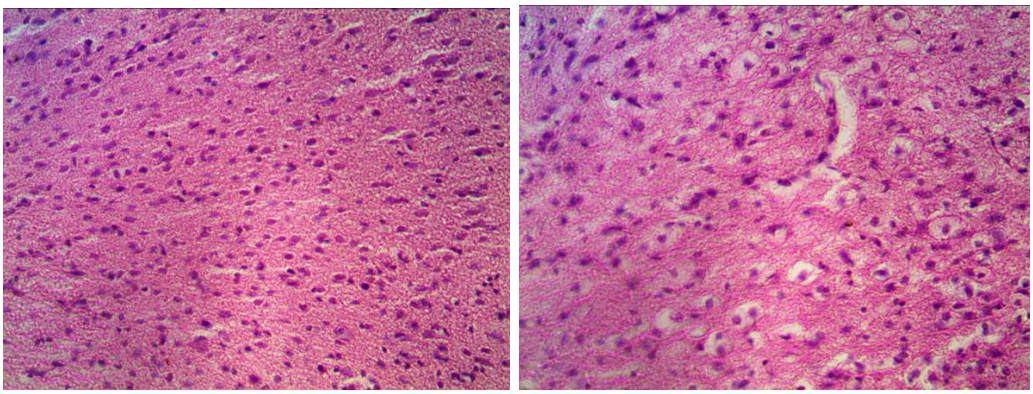


Рис. 6.3.5.1. Головний мозок самиці миші з моделлю ДЕ в ПМП та імплантацією КЕП (група 5). Купчасто розташовані пірамідні нейрони зовнішньої пластинки моторної кори. Інтенсивна проліферація нейронів. Безліч дрібних кровоносних судин і капілярів. Периваскулярний набряк. Забарвлення гематоксиліном та еозином, × 400

Тіла нейронів мали округлу форму і збільшену інтенсивність базофілії, тому що ядра в них містили конденсований хроматин. У глибоких шарах пластинки моторної кори виявлено інтенсивна проліферація нейронів. Виявлялося безліч дрібних кровоносних судин і капілярів, а також незначний периваскулярний набряк.

В гліальній тканині спостерігалися ядра всіх типів гліоцитів, загальна кількість клітин була збільшена. Реакція глії на пошкодження була помірною.



а б

Рис. 6.3.5.2. Головний мозок самиці миші з моделлю ДЕ в ПМП та імплантацією КЕП (група 5). Гліальна тканина. а – помірно виражений гліоз, капіляри, заповнені еритроцитами, × 200; б – слабкий периваскулярний і перицелюлярний набряк. Забарвлення гематоксиліном та еозином, × 400

Спостерігалися капіляри, заповнені еритроцитами (рис. 6.3.5.2, а), слабкий периваскулярний і перицелюлярний набряк (рис. 6.3.5.2, б). В нейронах зубчастої звивини Амонова рогу гіпокампа спостерігалися великі гіперхромні ядра. Цитоархітектоніка була незначно порушена (спостерігалися лише невеликі ділянки без нейронів). Виявлявся помірний набряк. Тіла нейронів мали округлу форму з гіперхроматозом ядер, в зубчастій звивині Амонова рогу гіпокампа відзначалась проліферація клітин (рис. 6.3.5.3).

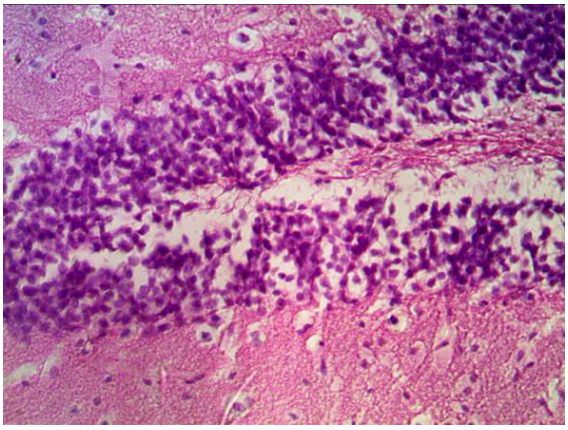


Рис. 6.3.5.3. Головний мозок самиці миші з моделлю ДЕ в ПМП та імплантацією КЕП (група 5). Зубчаста звивина Амонова рогу гіпокампа. Незначно порушена цитоархітектоніка. Проліферація клітин гіпокампа. Помірний набряк. Забарвлення гематоксиліном та еозином, × 400

Таким чином, імплантація КЕП тваринам з моделлю ДЕ в ПМП позитивно впливала на структури ГМ, що виражалося в нормалізації цитоархітектоніки, відновленні мікроциркуляторного русла, помірному гліозі гліальної тканини і проліферації нейронів зовнішньої пластинки моторної кори і зубчастої звивини Амонова рогу гіпокампа.

6.3.6 Морфологічні зміни ендотелію судин кори головного мозку мишей в модельних експериментах та після імплантації кріоконсервованих експлантів плаценти

У звичайному стані клітини ендотелію – ендотеліоцити – створюють умови для адекватного місцевого кровотоку, синтезуючи потужні антикоагулянти, що є і вазодилататорами [282]. Активність ендотелію в нормі забезпечує трофіку органів і виконує захисну функцію завдяки наявності в ендотелії високоорганізованих механізмів ауторегуляції.

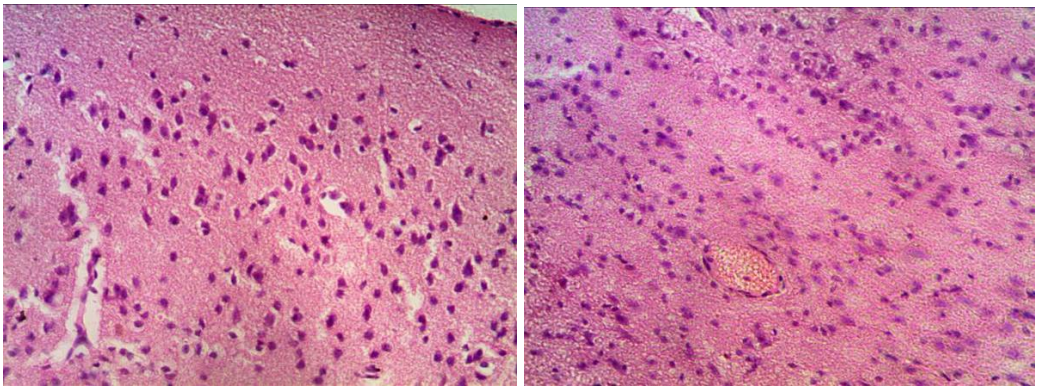
При несприятливих умовах ендотелій стає ініціатором (або модулятором) багатьох патологічних процесів в організмі (атеросклероз, гіпертонія, інсульти, інфаркти та ін.) [283]. Це пояснюється участю ендотелію в активізації ренінангіотензинової та симпатичної систем, перемиканням активності ендотелію на синтез оксидантів, вазоконстрикторів, агрегантів і тромбогенних факторів, а також зменшенням ендотеліальних БАР через пошкодження ендотелію деяких судинних областей [284,285].

Вважається, що дизбаланс між ступенем метаболічної активності і рівнем кровопостачання в тканинах (в тому числі і нервової) супроводжується модифікацією морфологічної організації мікроциркуляторного русла [284,286]. Однією з особливостей мікросудин мозку є їх безперервне структурно-функціональне перетворення, і в умовах порушеного мозкового кровообігу мікросудинне русло, реагуючи на ішемію, стимулює процеси ділення ендотеліальних клітин і формування ними нових мікросудин. Особливо явно це помітно на прикордонних до осередкової ішемії ділянках. Капіляри також

відрізняються різноманітністю реактивності ендотеліальної вистилки [287]. При несприятливих умовах (гіпоксія, ДЕ, порушення метаболізму і т.ін.) ендотелій стає ініціатором (або модулятором) багатьох патологічних процесів в ЦНС.

Моделювання ДЕ у оваріоектомованих самиць мишей призводило до формування ендотеліальної дисфункції капілярної мережі кори ГМ, що виражалося в значному зниженні щільності ядер ендотеліоцитів і ознак пригніченні проліферативної активності ендотеліоцитів.

При цьому було виявлено виражене набухання ендотеліоцитів на тлі зменшення щільності з'єднань між клітинами. Визначалася низька щільність ендотеліоцитів, що вистилають капіляри кори ГМ, що знаходяться в стані вазоконстрикції. Зустрічалися дилатовані судини кори ГМ з агрегацією еритроцитів, що передує утворенню тромбів (рис. 6.3.6.1).



а б

Рис. 6.3.6.1. Стан ендотеліоцитів в судинах ГМ миші з моделлю ДЕ в ПМП: а – низька щільність ендотеліоцитів, що вистеляють капіляри кори ГМ в стані вазоконстрикції; б – дилатовані судини кори ГМ з агрегацією еритроцитів. Забарвлення гематоксиліном та еозином, × 400

Після імплантації КЕП оваріоектомованим тваринам з експериментальною ДЕ спостерігалося підвищення щільності ендотеліоцитів капілярної мережі кори ГМ, а також щільності їх ядер. Визначалося також збільшення щільності проліферуючих ендотеліоцитів в судинах ГМ, заповнених еритроцитами без ознак агрегації (рис. 6.3.6.2).

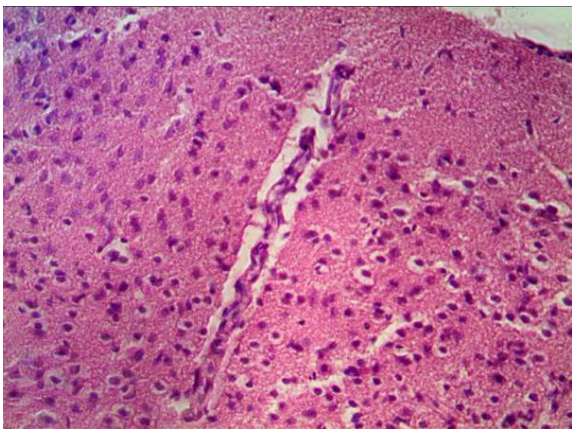


Рис. 6.3.6.2. Головний мозок миші з моделлю ДЕ в ПМП після імплантації КЕП. Регенерація ендотеліоцитів. Забарвлення гематоксиліном та еозином., × 400

Патогенетичними механізмами, що формують ДЕ в постменопаузі, є не тільки артеріальна судинна мозкова недостатність та порушення венозного відтоку, ангіоспазм, спровоковані дефіцитом статевих гормонів, але й повторні мікротромбози, мікроемболії, мікрогеморрагії, що формують німі інсульти. Оскільки ендотелій – це одношаровий пласт спеціалізованих клітин, що вистилають зсередини кровоносні і лімфатичні судини ГМ і є не просто напівпроникною мембраною, а й активним ендокринним органом, то позитивна дія плацентарних з'єднань може бути пов'язана з відновленням його функції за допомогою впливу на механізми згортання крові, регуляції тонусу і артеріального тиску, а також метаболічного забезпечення мозку.

Таким чином, за допомогою імплантації КЕП можливо вирішити одну з найбільш актуальних завдань терапії ДЕ в постменопаузі, – корекції та підтримки адекватного функціонування ендотелію судин ГМ.

Результати гістологічного дослідження морфологічних змін в ГМ мишей в модельних експериментах представлені у зведеній таблиці 6.3.6.

Таблиця 6.3.6

Структура головного мозку мишей в модельних експериментах з даними морфометрії в 10 полях зору

Експери-ментальна модель	Структури головного мозку		
	Зовнішня пластинка моторної кори півкуль	Гліальна тканина	Гіпокамп (зубчаста звивина Амонова рогу)
Хибно-оперовані тварини (контроль)	Пірамідні нейрони без ознак дегенерації, перицелюлярного набряку і проявів енцефалопатії. Ширина пластинки – 0,253 ± 0,063 мм	Кількість гліальних клітин не збільшилася, виявлялися дрібні кровоносні судини і капіляри з вільним просвітом.	Пірамідні нейрони, тісно прилягають один до одного. Зубчаста звивина у вигляді компактної смужки дрібних гранулярних нейронів. Ширина зубчастої звивини – 0,127 ± 0,039 мм
Оваріо-ектомія	Пірамідні нейрони розташовувалися рідко, широкою смугою, ядра в них були або дрібними пікнотичних, або більшими гіперхромними. Перицелюлярний і перікапілярний набряки, кровоносні капіляри і дрібні судини ділатовані. Ширина пластинки – 0,091 ± 0,020 мм	Зменшення загальної кількості гліальних клітин з пікнотичними і гіперхромними ядрами (гліоцітопенія). Значний перицелюлярний набряк, порушення мікроциркуляторного русла у вигляді стазів капілярів і дрібних кровоносних судин.	Цитоархітектоніка значно порушена, виявлялися ділянки, позбавлені нейронів. В хаотично розташованих нейронах поряд з великою кількістю пікнотичних, спостерігалися більш рідкісні гіперхромні ядра. Спостерігався перицелюлярний набряк. Ширина зубчастої звивини – 0,055 ± 0,010 мм
Дисцирку-ляторна енцефало-патія	Ознаки дегенерації, перицелюлярний набряк і прояви енцефалопатії у вигляді порушення цитоархітектоніки, компресії кровоносних судин, скорочення кількості та пікнозу ядер пірамідних нейронів, які розташовувалися купчасто, вузькою смугою. Ширина пластинки – 0,072 ± 0,023 мм	Збільшення числа всіх типів гліоцитів – виражений гліоз. Патологічне розростання гліальної тканини і інфільтрація її численними макрофагами. Крововиливи і утворення гемосидерину при розпаді гемоглобіну. Кістозно-гліозні утворення.	Цитоархітектоніка порушена (виявлялися ділянки без нейронів). Виражений набряк. Тіла нейронів округлої форми зі збільшеною інтенсивністю базофілії – гіперхроматоз, який характеризує бурхливим розмноженням клітин. Ширина зубчастої звивини – 0,044 ± 0,009 мм
Дисцирку-ляторна енцефало-патія в пост-менопаузі	Пірамідні нейрони зовнішньої пластинки моторної кори розташовувалися широкою смугою, рідко, ядра в них частково були дрібними	Виражена реакція глії у вигляді збільшення загальної кількості гліоцитів з пікнотичними і гіперхромними ядрами. Вогнищевий характер	Порушена цитоархітектоніка з хаотичним розташуванням і скороченням кількості нейронів, а також

	пікнотичними, а частково, - більшими з конденсованим хроматином. Спостерігався слабкий периваскулярний і перицелюлярний набряк, капіляри і дрібні кровоносні судини знаходилися в стані стаза. Ширина пластинки – 0,062 ± 0,025	гліозу. У ділянках гліальної тканини, інфільтрованих макрофагами і гранулоцитами, спостерігалася велика кількість тонкостінних судин. Деякі з них були розширені і заповнені кров'ю.	вираженим перицелюлярним набряком. Ядра нейронів дрібні і пікнотичні, рідко – великі і гіперхромні. Ширина зубчастої звивини – 0,043 ± 0,009
Дисциркуляторна енцефалопатія в постменопаузі після імплантації КЕП	Нормалізація цітоархітектоніки. Пірамідні нейрони розташовувалися широкою смугою, купчасто. У глибоких шарах виявлялася інтенсивна проліферація нейронів. Виявлялося безліч дрібних кровоносних судин і капілярів, що свідчило про відновлення мікроциркуляторного русла. Ширина пластинки – 0,098 ± 0,017 мм	В гліальній тканині виявлялися ядра всіх типів гліоцитів, загальна кількість клітин збільшена. Спостерігалися слабкий периваскулярний і перицелюлярний набряки. Реакція глії виражена помірно. Капіляри заповнені еритроцитами.	Цитоархітектоніка порушена незначно (виявлялися лише невеликі ділянки без нейронів). В зубчастій звивині гіпокампу спостерігався помірний набряк. Тіла нейронів мали округлу форму, в них виявлявся гіперхроматоз ядер, при цьому відзначена проліферація клітин. Ширина зубчастої звивини – 0,189 ± 0,032 мм

6.3.7 Морфометричне дослідження структур головного мозку самиць мишей після імплантації кріоконсервованих експлантів плаценти в моделі дисциркуляторної енцефалопатії в постменопаузі

Морфометричні дослідження показали істотне достовірне збільшення ширини шару нейронів моторної кори в 1,5 рази від значення показника в моделі ДЕ в ПМП (рис. 6.3.6.3.) і смуги нейронів в зубчастому шарі звивини Амонова рогу гіпокампу (рис. 6.3.6.4.) в 3,5 рази від значення показника в моделі ДЕ в ПМП, що доводить відновлюючу дію імплантації КЕП на клітини гіпокампу в моделі ДЕ в постменопаузі.

Таким чином, показано, що застосування КЕП дозволяє структурно відновити області моторної кори і гіпокампу, завдяки чому коригувати

порушення когнітивно-мнестичних функцій і поведінкових реакцій, що виникають при ДЕ в постменопаузі.

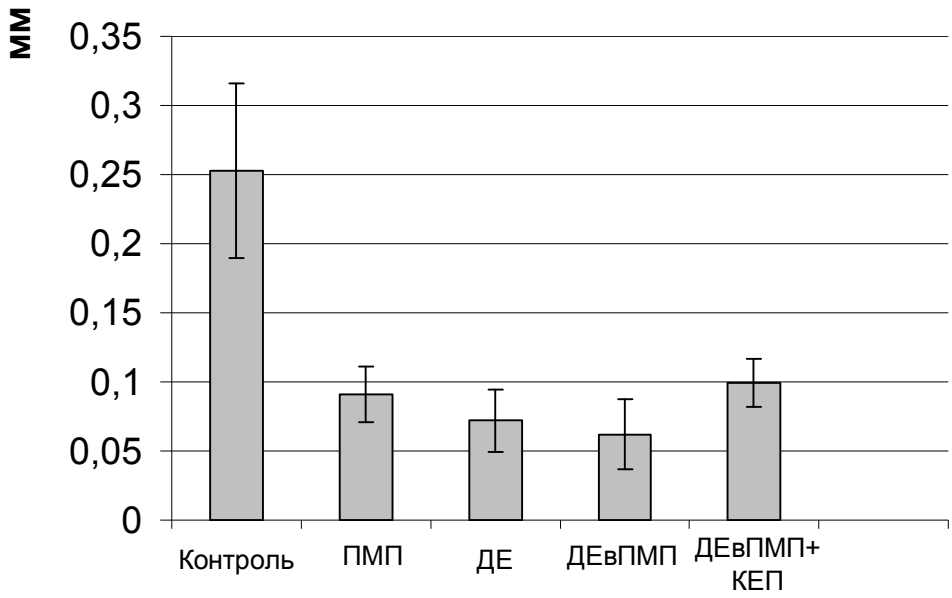


Рисунок 6.3.6.3. Ширина шару нейронів моторної кори ГМ самиць мишей в модельних експериментах. *– статистично значущі відмінності від показників контролю (p <0,05)

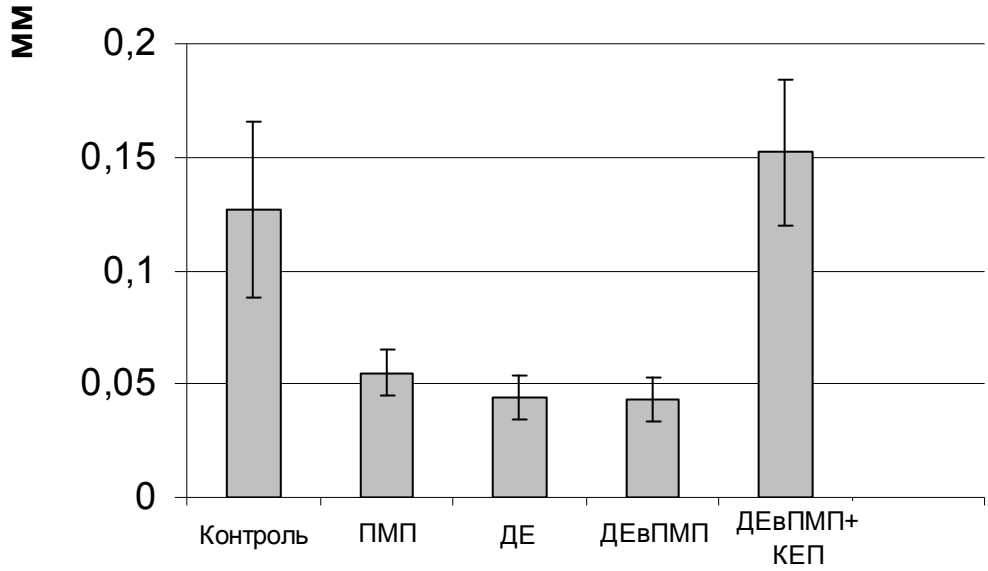


Рис. 6.3.6.4. Ширина смуги нейронів в зубчастій звивині Амонова рогу гіпокампа ГМ самиць мишей в модельних експериментах. *– статистично

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

Позитивний терапевтичний ефект імплантації КЕП логічно пов'язати з наявністю в складі есенціальних сполук КЕП комплексу речовин, що впливають не тільки на нейрогенез та функції ендотелію, а й на процеси адаптації, а також пов'язані з ними зміни фізичного стану тварин, їх поведінкових реакцій та когнітивних функцій.

До таких речовин відносять альфафетопротеїн, ростові чинники плаценти: росту фібробластів, трансформуючий, епідермальний, які виконують функції стимуляції росту та диференціювання клітин та чинять пряму чи опосередковану стимулюючу дію на швидкість проліферації клітин [288,289]. Такими сполуками є також цитокіни – регуляторні пептиди, які, проникаючи у ядро клітин та взаємодіючи з відповідними локусами хроматину, регулюють найважливіший етап реалізації генетичної програми, – процес поділу клітин [290]. Показано критичну роль хемокіну CCL2 та його рецептора CCR2 в спрямованому поверненні стовбурових нейтральних клітин в ішемічно уражені ділянки ГМ після внутрішньосудинного введення [291].

Доведена нейропротекторна дія естрогенів [292,293], мітохондріального роз'єднуючого білка UCP2 [294], участь білкових нейротрансмітерів, таких, як NPY [295-298], AMPA- та TrkB-рецепторів BDNF [299,300] в регуляторних процесах забезпечення виживання нейроклітин через різноманітні механізми, в тому числі через механізми епігеномної регуляції. Естроген підсилює збудливість ГМ, швидко впливаючи на процес генерації електричного імпульсу в нейронах певних ділянок мозку, а також чинить множинний вплив на взаємодію між собою нейротрансмітера та рецептора в серотоніновій, ацетилхоліновій, норадреналіновій, дофаміновій, ГАМК-ергічній та опіоїдній нейротрансмітерних системах [292,293]. Велика кількість дослідників показали, що білкові нейротрансмітери (NPY), рецептори ростового чинника BDNF, транспортний білок UCP2 здатні модулювати сигнальні шляхи, забезпечуючи

нейропротекцію, нейропластичність і здатність клітин ГМ до відновлення при різноманітних патологічних процесах, в тому числі пов'язаних зі старінням [294-300].

Таким чином, отримані нами результати дають підстави вважати, що імплантація КЕП, забезпечуючи надходження в організм комплексу плацентарних сполук, забезпечує певні геропротекторні ефекти, попереджаючи вікові зміни у тварин, що знаходяться в періоді пізнього онтогенезу. Зокрема, такі ефекти проявляються в змінах поведінки та когнітивно-мнестичних функцій старіючих мишей. Стимулююча дія біологічно активних складових імплантованих КЕП проявляється і в змінах морфологічних характеристик ключових структур ГМ, найтісніше пов'язаних із регуляцією моторної поведінки та формуванням пам'яті, – гіпокампу та моторної кори. Негативні альтерації клітин цих структур, пов'язані зі старінням, певною мірою нівелюються. Отже, імплантація КЕП, котрі є джерелом природних сполук, необхідних для активації нейрогенезу та проліферації нейронів, може бути застосована для корекції вікових порушень функцій ЦНС.

За матеріалами розділу 6 опубліковано роботи [264, 265, 266, 267, 301].

УЗАГАЛЬНЕННЯ ТА ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Актуальною проблемою сучасної кріомедицини є проведення досліджень, результати яких дозволяли б створювати безпечні, ефективні, біологічно активні препарати, визначати їх біологічну дію для розробки методів лікування з їх застосуванням.

Плацента ссавців має генетично і еволюційно зумовлений потенціал розвитку і відновлення органів і систем, БАР плаценти підвищують стійкість тканин до гіпоксії, стимулюють процеси репарації. Ефективність застосування плацентарних біопрепаратів у лікуванні різноманітних захворювань зумовила широкий спектр їх клінічного застосування, що привело до формування відповідного напрямку клітинної терапії [5,7,8].

Успіхи клітинної терапії багато в чому завдячують розробці технологій низькотемпературного консервування безклітинних, клітинних і тканинних біоматеріалів. Це дозволило створити запас стандартизованих препаратів, у тому числі отриманих з плаценти людини [302]. В Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України розроблено методики кріоконсервування, котрі дозволяють тривалий час зберігати похідні плаценти людини і тварин. Кріобіологічні технології не тільки дозволяють зберігати на високому рівні початковий склад та морфофункціональний стан біопрепаратів з плаценти, а й забезпечувати їх біобезпеку для пацієнта [35]. У зв'язку з цим актуальними є дослідження, спрямовані на визначення біологічні дії кріоконсервованих біопрепаратів, отриманих з тканини плаценти, в яких зберігається комплекс БАВ, здатний коригувати основні ланки патогенезу конкретного захворювання. Кріоконсервовані експланти тканини плаценти, завдяки тканинноспецифічним сполукам, – статевим гормонам, амінокислотам, пептидам, речовинам з нейротрофічною і нейропротекторною дією, а також речовинам, що сприяють репарації і васкуляризації тканин, можуть бути

ефективними в лікуванні ДЕ в постменопаузі. Однак, незважаючи на велику кількість наукової літератури про склад і терапевтичні властивості плацентарних препаратів, до сьогодні немає чіткого уявлення про механізми їх дії на нервові клітини і ЦНС в цілому. Зокрема, необхідні дослідження біологічної дії КЕП на культуру нервових клітин *in vitro* та імплантації КЕП на ЦНС експериментальних тварин в моделі ДЕ в ПМП. Крім того, необхідно з'ясувати природу сполук в складі КЕП, що мають нейротрофічні та/або нейропротекторні властивості та які можна застосувати для корекції порушень ЦНС при ДЕ в постменопаузі.

ДЕ істотно знижує якість життя і працездатність, супроводжується порушеннями психоемоційної сфери, є чинником ризику мозкового інсульту – однієї з головних причин інвалідизації та смертності. Медична і соціальна значимість проблеми ДЕ в постменопаузі надзвичайно висока в зв'язку зі стійкою тенденцією до старіння населення і підвищення в популяції питомої ваги жінок похилого віку [133].

У патогенезі ДЕ мають значення як системні, так і локальні фактори, що призводять до порушень церебральної гемодинаміки. Порушення системної гемодинаміки в постменопаузі викликане в першу чергу дефіцитом естрогенів, що призводить до гормонального дизбалансу, порушення роботи системи нейромедіаторів, ауторегуляції мозкового кровотоку, коагуляційних і реологічних властивостей крові. При цьому знижується активність метаболічних процесів, трофіка ЦНС, розвивається хронічна ішемія ГМ [95-97]. Перебудова системного кровотоку відбувається за допомогою зміни активності гормональних систем, зокрема, – гіпоталамо-гіпофізарно-надниркової осі, гормони якої – АКТГ, кортизол, альдостерон, катехоламіни, – мають виражені вазопресорні ефекти і є універсальними чинниками адаптації до стресу [303]. Дисгемія мозку, що виникає при змінах мікросудин і порушенні загальної гемодинаміки, призводить до розвитку ішемічного каскаду метаболічних реакцій. Нестача кисню стимулює перехід енергетичного метаболізму клітин мозку на анаеробний гліколіз, в результаті знижується

синтез АТФ [102]. У клітинах накопичується високотоксичний продукт – молочна кислота, знижується pH, змінюючи активність ферментів клітинних мембран. В процесі розвитку ішемії порушуються механізми синаптичної передачі, накопичується позаклітинна фракція ГАМК і глутамат в токсичній концентрації, знижується синтез дофаміну при одночасному збільшенні продукції серотоніну. Ці процеси призводять до порушення ауторегуляції мозкового кровотоку, розвитку вазоспазму і внутрішньосудинного стазу, які посилюють ішемію. В процесі розвитку ішемії мозкової тканини важливе значення мають токсичний вплив на клітину надлишкового накопичення збуджуючих амінокислот (ексайтотоксичність), лавиноподібне надходження в клітини іонів кальцію, розпад клітинних мембран, накопичення вільних радикалів і продуктів перекисного окислення ліпідів [102]. Локальними факторами розладів мозкового кровотоку в постменопаузі є атеросклеротичне стенозування і оклюзія внутрішньомозкових і екстракраніальних судин, що виконують транспортну (магістральні артерії голови) і розподільну функції (артерії, розташовані на поверхні мозку). Зниження припливу крові при атеросклерозі магістральних артерій призводить до облітерації і фіброзу мікросудинного русла, розвитку гіпоксії і каскаду патобіохімічних розладів, опосередкованих ішемією [303].

Вищевикладені факти стали базою для вибору моделі ДЕ в постменопаузі, відтвореної на лабораторних мишах. При цьому дефіцит естрогенів і гормональний дизбаланс, досягнутий за допомогою операції двосторонньої оваріоектомії, як системний фактор, а також ішемія мозку, яка моделювалася шляхом двосторонньої оклюзії сонних артерій, будучи локальним фактором, сумісно створили експериментальну модель ДЕ в постменопаузі.

При аналізі літературних даних було відзначено, що в сучасній неврології лікування ДЕ направлено на корекцію основного судинного захворювання, профілактику повторних церебральних дисгемій, відновлення кількісних і якісних показників мозкового кровотоку і нормалізацію порушених функцій

ГМ. У патогенезі дизбалансу медіаторів у жінок в постменопаузі головну роль грає зниження вироблення яєчникових гормонів – естрогену і прогестерону, а також компенсаторне збільшення вироблення ФСГ і ЛГ, що супроводжується порушенням нейромедіаторної функції гіпоталамуса з посиленням активності норадренергічного тонусу, зниженням активності β-ендорфінів і серотонінової системи [95]. Суттєве значення в розвитку ДЕ в ПМП грає взаємозв'язок гормонального дизбалансу з порушенням роботи системи нейромедіаторів, що призводить до дезадаптації в нейроендокринній системі організму жінки, значно погіршуючи перебіг ДЕ і супроводжуючись порушенням психоемоційної сфери і поведінкових реакцій [98,111]. Тобто, терапія ДЕ у жінок у віці постменопаузи без корекції естрогенного дефіциту ефективна не в повній мірі. Однак замісна гормональна терапія має обмеження і побічні дії [114,115]. Крім того, лікування ДЕ в постменопаузальному періоді включає комплекс фармпрепаратів, які діють на різні ланки патологічного процесу і є фармагрессивним. Найчастіше весь комплекс лікувальних засобів застосувати неможливо через ускладнення, що виникають. Тому актуальність пошуку нових, ефективних, безпечних ліків і методів терапії ДЕ в постменопаузі не викликає сумнівів.

У зв'язку з цим метою роботи було визначення впливу кріоконсервованих експлантів плаценти на перебіг дисциркуляторної енцефалопатії в постменопаузі на експериментальних моделях. У роботі використовували кріобіологічні підходи в створенні програми кріоконсервування експлантів плаценти, а також кріомедичні методи імплантації кріоконсервованого біоматеріалу. Для визначення біологічної дії плацентарних БАР використовували культивування нервових клітин ГМ експериментальних тварин в присутності есенціальних сполук КЕП, моделювання ексайтотоксичності на культурі нервових клітин новонароджених щурів, а також моделювання ДЕ в постменопаузі на лабораторних мишах. При морфологічних дослідженнях тканин ГМ (моторної кори півкуль і гіпокампу) експериментальних тварин використовували забарвлення гематоксиліном та

еозином. Для дослідження загальних фізичних характеристик експериментальних тварин використовували фізіологічні методи (оцінка зовнішнього вигляду, вимір ваги, зросту, фізичної сили). Поведінкові реакції, міжпівкульну асиметрію, когнітивно-мнестичні функції експериментальних тварин досліджували нейрофізіологічними методами з використанням відповідних тестів. Для обробки отриманих даних користувалися методом статистичного аналізу.

Тканину плаценти отримували з інформованої згоди жінок після операції кесарів розтин з дотриманням норм біомедичної етики. Методом двоетапного кріоконсервування під захистом кріоконсерванта, що містив 10% ДМСО, заготовили КЕП для подальшого використання в експериментах.

У першій частині експериментальної роботи досліджували вплив КЕП на метаболічну активність клітин мозку в моделі ексайтотоксічності, яка має місце в патогенезі ДЕ. Визначали вплив середовищ, кондиційованих з КЕП, на метаболічну активність НК ГМ новонароджених щурів за допомогою МТТ-тесту. На наступному етапі виявляли нейропротекторну дію плацентарних чинників, що містяться в КЕП, для чого їх додавали в середовище культивування НК на 1 добу, після цього піддавали токсичній дії глутамату. Далі досліджували вплив плацентарних чинників на НК після впливу глутамату. В результаті було отримано нові наукові дані.

Встановлено, що культивування нейроклітин в середовищі DMEM, кондиційованому з КЕП, збільшує їх метаболічну активність в порівнянні з показником в контролі більш, ніж на 30 %. Виявлено, що середовище, кондиційоване з КЕП, чинить нейропротекторну і нейротрофічну дії. Використання КЕП для нейропротекції в моделі ексайтотоксічності виявилося більш ефективним. Плацентарні чинники в середовищах, які піддавалися нагріванню до 95^0С, не демонстрували захисної або відновлюючої дії на нервові клітини, що свідчить про їх термолабільність, може вказувати на білкову або білок-асоційовану природу біологічно активних речовин з КЕП, що реалізували позитивні нейротропні ефекти. Виявлена закономірність

обґрунтовує пріоритет кріобіологічних методів створення плацентарних препаратів для корекції неврологічних захворювань.

Отримані нами дані про позитивний вплив чинників плацентарного походження в середовищі культивування відносно НК, що піддавалися обробці глутаматом, узгоджуються з даними інших авторів [157,199], що вказують на нейропротекторну дію як стовбурових клітин, виділених з тканин плаценти, так і експлантів плаценти. Дослідники пов'язують механізм позитивної дії біооб'єктів плацентарного походження на нервові клітини з продукцією стовбуровими клітинами в їх складі регуляторних та ростових чинників [203,204], а також з впливом паракринних медіаторів [205,206] і з цитокіновими ефектами [207-209].

Доведено, що клітини плацентарного походження, а також епітеліальні клітини амніону людини здатні синтезувати і виділяти нейротрофічні чинники та нейротрансмітери [210,211]. Терапія з використанням МСК з плаценти сприяє збільшенню інтенсивності проліферації і зменшенню апоптотичної загибелі клітин [212-214]. Описано нейропротекторні і нейрорегенеративні властивості середовищ, кондиційованих з епітеліальними клітинами амніону людини [210,211,213]. Значний внесок в механізм позитивної дії похідних плаценти на НК пов'язаний з їх участю в протидії окислювальному стресу. Виявлено, що похідні плаценти сприяють пригніченню утворення вільних радикалів і забезпечують антиоксидантний захист мембран органел і клітин [216,217].

Безумовно, вплив КЕП на НК пов'язаний також з присутністю в складі плаценти великої кількості біологічно активних молекул, таких як білки, пептиди, глікозаміноглікани, амінокислоти, гормони, ферменти, чинники росту і цитокіни, які активують процеси регенерації [41]. Значний вміст естрогенів в плаценті, в свою чергу, обумовлює нейромодулюючу дію [219,220], що здійснюється в тому числі за допомогою ряду нейротрофінів [221]. Так, нейротрофічний чинник мозку потенцює виживання нейроклітин, їх диференціювання і синаптичну пластичність [221,222].

Виявлені в даному дослідженні нейротрофічна і виражена нейропротекторна дії КЕП на нервові клітини в моделі ексайтотоксичності *in vitro*, передумовили дослідження впливу КЕП на рівні організму.

Враховуючи те, що ДЕ в ПМП є патологією, на яку страждають пацієнтки похилого віку, коли організм є високочутливим до будь-якого впливу і, тим більш, такого потужного, як плацентарна терапія, з ціллю попередження непередбачуваних парадоксальних реакцій, в другій частині роботи досліджували вплив імплантації КЕП на такі інтегральні показники, як виживання, тривалість і якість життя мишей. Отримані за раніше розробленою методикою КЕП вводили мишам обох статей внутрішньом'язово в дозі 10 мг кожні 3 місяці, починаючи з 6-місячного віку. Досліджували середню і максимальну тривалість життя, показники 50 % -го та 90% -го виживання. Якість життя оцінювали за показниками зовнішнього вигляду, фізичної сили, в тестах «відкрите поле» (орієнтаційно-дослідницька поведінка), трикамерному тесті (зоосоціальна і статева поведінка) і анксиолітичному тесті (оцінка тривожності). При порівнянні кривих виживання самиць мишей після імплантації КЕП достовірних відмінностей не отримано, проте, у віці від 8 до 15 місяців криві мають тенденцію до різниці. Тобто, в репродуктивний період застосування плаценти позитивно впливає на виживання, але після виснаження фолікулярного резерву яєчників (у віці 20-25 місяців) вплив імплантації КЕП на виживання не виявлявся.

Виживання самців після введення КЕП значуще відрізнялося від виживання інтактних самців на всьому протязі життя тварин: середня і максимальна тривалість життя зросла в середньому на 18 %, 50 % -е та 90 % -е виживання – на 17 % та 21 %, відповідно. Отримані дані значно перевищують наведені в літературі щодо застосування естрогенів для подовження життя, що свідчить про сумарний геропротекторний вплив БАР плаценти. Таким чином вперше виявлено, що імплантація КЕП значуще збільшує тривалість життя самців, покращує значення показників ваги, зовнішнього вигляду і фізичної сили, проте погіршує показники орієнтаційно-

дослідницької, зоосоціальної та анксиолітичної поведінки. Також вперше доведено, що імплантація КЕП не змінює тривалість життя самиць, однак значуще збільшує їх виживання в репродуктивному віці, покращує показники зовнішнього вигляду і фізичної сили, позитивно впливає на зоосоціальну, орієнтаційно-дослідницьку поведінку і значуще зменшує тривожність. Отримані результати підтверджують припущення про дію жіночих статевих гормонів та інших плацентарних БАР в складі КЕП на організм самців, яка виражалася в анаболічному ефекті і дезадаптації ЦНС.

Для підтвердження гіпотези про комплексний нейропротекторний і нейротрофічний вплив есенціальних речовин в складі КЕП наступна частина роботи була присвячена дослідженню впливу імплантації КЕП на ЦНС мишей різних вікових груп. Вікові порушення когнітивних процесів асоційовані з морфологічними змінами в гіпокампі – структурі ГМ, пов'язаній з пам'яттю, мотивацією і стратегією поведінки. Тому, крім дослідження поведінки експериментальних тварин нейрофізіологічними методами, досліджували морфологію області зубчастої звивини Амонова рогу гіпокампа та моторної кори півкуль ГМ, яка відповідає за рухові функції. Під час гістологічного дослідження ГМ старіючих мишей, яким були імплантовані КЕП, спостерігалися позитивні зміни: відновлення чисельності та щільності пірамідних нейронів зовнішньої пластинки моторної кори, зменшення кількості гіпохромних нейронів, відсутність гліозу, а також зменшення проявів енцефалопатії. У гіпокампі виявлено значно меншу кількість нейронів з дегенеративними змінами і вираженим зменшенням розмірів тіл нейронів. Спостерігали також проліферацію пірамідних нейронів гіпокампу, що можна вважати ознакою реактивації нейрогенезу.

Дослідження поведінкових реакції інтактних мишей різних вікових груп (молодих – 6-місячних та старіючих – 12-місячних) та після імплантації КЕП виявило, що у старіючих самиць мишей у порівнянні з молодими тваринами достовірно не змінюються показники горизонтальної локомоторної активності. У старіючих самиць вертикальна локомоторна активність в порівнянні з

молодими самицями зростає, але кількість актів грумінгу зменшується, що відображає переважання дослідницької поведінки перед страхом в умовах стресу новизни. Отримані дані тестів з використанням трикамерного тесту з одностатевою або різностатевою тваринами свідчили про збережений рівень зоосоціальної активності та статевої поведінки у старіючих самиць. Серед негативних змін в структурі орієнтаційно-дослідницької поведінки самиць мишей при старінні слід зазначити суттєве зростання тривожності в анксиолітичному тесті.

Імплантація КЕП старіючим самцям призвела до зниження вертикальної та горизонтальної локомоторної активності і зростання кількості актів грумінгу в порівнянні як з групою молодих, так і з групою старіючих самців, що інтерпретується, як погіршення орієнтаційно-дослідницької поведінки. Достовірно знижується рівень зоосоціальної активності, практично зберігається статева поведінка, проте збільшується рівень тривожності самців за тестом визначення часу перебування в хрестоподібному лабіринті.

Встановлено, що імплантація КЕП, забезпечуючи надходження в організм плацентарних сполук, чинить істотну геропротекторну дію, позитивно впливаючи на вікові зміни морфології гіпокампу, моторної кори і судин ГМ мишей пізнього онтогенезу. Позитивний вплив на морфологію гіпокампу, моторної кори, ендотелію судин ГМ і вікові зміни поведінки мишей,на нашу думку, обумовлений комплексом жіночих статевих гормонів та інших БАР, які присутні в КЕП і здатні посилювати репаративний білковий синтез, а також включатися в нейромедіаторні системи, модулюючи нейрохімічні процеси в ГМ піддослідних тварин.

Отримані результати попередніх етапів роботи стали науковим підґрунттям дослідження в наступій частині роботи ефективності застосування КЕП для корекції ДЕ в постменопаузі у самиць мишей в модельному експерименті.

Відомо, що патоморфологічна основа ДЕ – облітерація або атеросклеротичне ураження малих внутрішньомозкових артерій, порушення

кровотоку в басейні цих судин і розвиток типових глибинних інфарктів ГМ. У патогенезі церебральних ішемій важливу роль відіграють також порушення метаболізму нейромедіаторів і нейротрансмітерів. У жінок в постменопаузі ці порушення посилюються ефектами дефіциту естрогенів, оскільки статеві гормони здійснюють складний і багатоплановий вплив на ЦНС, як опосередкований рецепторними структурами гіпоталамуса, так і безпосередній, шляхом зміни обміну нейромедіаторів. Аналіз літературних даних показав, що оптимальною моделлю хронічної церебральної ішемії і циркуляторної гіпоксії є білатеральна оклюзія каротид у гризунів [172,304], що і було відтворено в модельному експерименті [172]. Хибнооперованим тваринам контрольної групи було виконано препарування артерій без накладання лігатур. Моделювання функціональних постменопаузальних порушень проводили шляхом двосторонньої оваріоектомії. Нейрофізіологічні дослідження проводили через 3 тижні після проведення операцій білатеральної оклюзії каротид і оваріоектомії, оскільки відомо, що саме в цих інтервалах часу відбуваються найбільш виражені зміни в ЦНС тварин [173]. Дослідження проводилися на білих лабораторних мишах-самицях лінії BALB/c середньою вагою 22 г. Самиці мишей були розділені на 5 експериментальних груп: 1 – хибнооперовані тварини; 2 – оваріоектомовані тварини (модель ПМП); 3 – тварини з двосторонньою оклюзією сонних артерій (модель ДЕ); 4 – тварини з моделлю коморбідної патології (ДЕ на тлі ПМП); 5 – тварини з моделлю коморбідної патології (ДЕ на тлі ПМП) та імплантацією КЕП.

У зв'язку з впливом ДЕ на когнітивно-мнестичні функції досліджено вплив КЕП на їх відновлення, міжпівкульну асиметрію, орієнтаційно-дослідницьку, анксиолітичну та зоосоціальну поведінку експериментальних тварин. Функціональна міжпівкульна асиметрія характеризує стійкість тварин до стресу і здатність до аналізу і пошуку оптимального рішення. Визначали моторну міжпівкульну асиметрію, виявляли домінуючу півкулю і ступінь впливу ішемії на функцію правої і лівої півкуль. Латеральний профіль тварин

визначали, використовуючи Т-подібний лабіринт і вираховували коефіцієнт міжпівкульної асиметрії.

За допомогою нейрофізіологічних методів дослідження визначено, що в наслідок моделювання ДЕ, ПМП і ДЕ в ПМП у піддослідних тварин суттєво порушуються їх поведінкові реакції, знижуються орієнтаційно- дослідницька активність і стресостійкість, погіршуються зоосоціальна поведінка і адаптаційна спроможність. При цьому, виявлені порушення були максимальними в групі тварин з моделлю ДЕ в ПМП. В цілому отримані дані свідчать про те, що обрані і відтворені експериментальні моделі є адекватними для патології, що досліджується, та можуть слугувати контролем для порівніння.

В результаті аналізу отриманих даних впершее встановлено, що введення КЕП тваринам з моделлю ДЕ в ПМП позитивно впливає на орієнтаційно-дослідницьку поведінку мишей, наближаючи показники вертикальної і горизонтальної локомоторної активності до норми. Виявлено також збільшення часу дослідження нового об'єкта тваринами цієї групи, що інтерпретується, як поліпшення когнітивних функцій. На тлі введення КЕП спостерігається покращення зоосоціальної поведінки та підвищення стресостійкості самиць мишей основної експериментальної групи.

При дослідженні міжпівкульної асиметрії виявлено, що найбільше патологічне зниження коефіцієнта МА відбулося в групах тварин з оваріоектомією і в поєднанні ПМП та ДЕ. Однак, виявлено, що після введення їм КЕП КМА мав тенденцію до підвищення, що свідчить про позитивний вплив плацентарних сполук на адаптаційні функції ЦНС.

Таким чином, за допомогою нейрофізіологічних методів дослідження поведінкових реакцій, когнітивних функцій і МА самиць мишей верифікована модель ДЕ в постменопаузі. Показано, що введення КЕП позитивно впливає на зміни орієнтаційно-дослідницької поведінки оваріоектомованих мишей в моделі ДЕ, наближаючи досліджувані показники до норми, значуще покращує когнітивні функції, підвищує КМА, що є ознакою поліпшення адаптаційних

можливостей ЦНС і, в цілому, за рахунок корекції облігатних симптомів, покращує перебіг експериментальної ДЕ в ПМП.

Ефекти, отримані в результаті застосування КЕП, можуть реалізуватися за допомогою декількох механізмів: шляхом відновлення порушеного балансу нейромедіаторів, нейротрофінів та інших БАР в ГМ піддослідних тварин, безпосереднім нейротропним і нейропротекторним впливом жіночих статевих гормонів, пептидів, білків, цитокінів, ростових чинників у складі КЕП, а також через включення їх в регуляторні нейромедіаторні системи та механізми моделювання нейрохімічних процесів. Стимулювати нейрогенез, що було виявлено в роботі, природним чином можуть плацентарні чинники росту, пептиди, нейротрофічні та інші тканинноспецифічні речовини, які посилюють репаративний білковий синтез.

Підтвердженням правильності патогенетичного підходу стала відповідність даних, отриманих нейрофізіологічними методами, результатам морфологічних досліджень. Оскільки порушення когнітивних процесів асоційовані з морфологічними змінами в гіпокампі – структурі ГМ, пов'язаній з пам'яттю, мотивацією і стратегією поведінки, в ГМ експериментальних тварин досліджували область зубчастої звивини Амонова рогу гіпокампа та моторної кори півкуль ГМ, яка відповідає за моторні функції. Під час гістологічного дослідження ГМ хибнооперованих самиць мишей патологічних змін в структурі гіпокампа та моторної кори півкуль не виявлялося, тобто, проведене цим тваринам хірургічне втручання не вплинуло на структури ГМ і дана експериментальна група може слугувати позитивним контролем в дослідженні.

При моделюванні ДЕ, ПМП і ДЕ в ПМП виявлено морфологічні змін в структурах ГМ, які виражалися в ознаках дегенерації, перицелюлярному набряку і проявах енцефалопатії у вигляді порушення цитоархітектоніки, компресії кровоносних судин, скороченні кількості та пікнозі ядер нейронів зовнішньої пластинки моторної кори ГМ, патологічному розростанні гліальної тканини та інфільтрації її численними макрофагами, а також в гіперхроматозі ядер нейронів гіпокампа. Такі зміни характерні для хронічної ішемії ГМ на тлі

дефіциту естрогенів і відповідають патоморфологічній картині ГМ при ДЕ в ПМП. Порушення мікроциркуляції призводить до зниження перфузії в стратегічно важливих для забезпечення когнітивних функцій структурах ГМ, таких як моторна кора і гіпокамп. В процесі виконання нейропсихологічних тестів морфологічні зміни в ГМ корелювали з погіршенням результатів когнітивного тестування, що було виявлено раніше, в попередній серії експериментів.

Гістологічним дослідженням структур ГМ самиць мишей основної експериментальної групи з моделлю ДЕ в ПМП виявлено коригуючий вплив імплантаціїї КЕП на дистрофічно-дегенеративні зміни, притаманні досліджуваній патології. Встановлено ознаки відновлення структури і мікроциркуляції ГМ: пірамідні нейрони зовнішньої пластинки моторної кори були розташовані широкою смугою, купчасто; тіла нейронів мали округлу форму і збільшену інтенсивність базофілії; ядра мали хроматин в конденсованому стані. В моторній корі півкуль ГМ виявлено ознаки інтенсивної проліферації клітин. Спостерігалась значна кількість дрібних кровоносних судин, периваскулярний набряк був незначним. Судини кори півкуль ГМ були заповнені еритроцитами без ознак агрегації. В нейронах зубчастої звивини Амонова рогу гіпокампа виявлялися великі гіперхромні ядра, тіла нейронів мали округлу форму, спостерігались ознаки проліферації клітин. Також виявлено відновлення щільності ендотеліоцитів капілярної мережі ГМ і щільності їх ядер.

Морфометричними дослідженнями отримано нові наукові данні, щодо достовірного збільшення ширини шару нейронів моторної кори (в 1,5 рази від значення показника в моделі ДЕ в ПМП) і збільшення ширини смуги нейронів зубчастого шару звивини Амонова рогу гіпокампа в 3,5 рази від значення показника в моделі ДЕ в ПМП, що доводить відновлюючу дію імплантації КЕП на мікроциркуляцію, проліферацію нервових клітин та ендотеліоцитів моторної кори і, більшою мірою, – гіпокампу в досліджуваній моделі.

Таким чином, визначено коригуючий вплив на наслідки дефіциту кровопостачання і гіпоперфузі ГМ при ДЕ на структурно-функціональні зміни "нейроваскулярних одиниць", які утворюють функціонально пов'язані між собою нейрони, астроцити і судинні клітини (ендотеліоцити, гладенькі м'язи, перицити) [305]. Виявлене відновлення структури гліальної тканини є принциповим, оскільки взаємодія церебральних мікросудин з нейронами опосередкована гліальними клітинами, перш за все, астроцитами. Відомо, що порушення діяльності нейроваскулярних одиниць при ДЕ спостерігається, коли ендотеліальна дисфункція на рівні дрібних судин викликає зниження їх реактивності, викликаючи дефіцит перфузії активних ділянок мозку [306,307]. Зменшення перфузії і гіпоксія тканини ГМ призводять до пригнічення синтезу нейротрофічних ростових чинників (церебральний, гліальний нейротрофічний чинник, чинник росту нервів та ін.). Їх дефіцит сприяє зниженню нейропластичності – здатності нервової системи до оптимальної структурно-функціональної перебудови у відповідь на ендогенні і екзогенні стимули чи ушкодження [308]. Дефіцит нейротрофінів призводить до розвитку апоптозу нейрональних структур, який є основним механізмом загибелі нервових клітин при ДЕ. В останні роки велика увага приділяється ролі церебрального нейротрофічного чинника BDNF, який відповідає за проліферацію, диференціювання, структурно-функціональну стабільність і підтримку життєздатності нейронів, що обумовлює достатній рівень когнітивного потенціалу [309]. На експериментальних моделях показано значення ендогенного BDNF для навчання і пам'яті експериментальних тварин [310].

Відновлення когнітивно-мнестичних функцій та підвищення адаптаційної спроможності і стресостійкості на тлі імплантації КЕП є важливим, тому що ці порушення є ключовим проявом судинної недостатності або ДЕ, яка багато в чому визначає тяжкість стану хворої людини, значно знижуючи тривалість і погіршуючи якість життя. Для зменшення проявів когнітивних порушень у пацієнтів із ДЕ в клініці застосовують препарати, що мають нейротрофічну, нейропротекторну вазоактивну дії, які поліпшують пам’ять і розумову

діяльність, підвищують стійкість головного мозку до ушкоджуючи впливів [311]. В постменопаузальному віці дефіцит нейротрофічних чинників є наслідком естрогенного дефіциту. Оскільки естрогени активують відповідні рецептори та посилюють транскрипцію генів-регуляторів нейропротекції, а також взаємодіють з судинним ендотеліальним чинником росту – VEGF та ендотеліном [312], введення плацентарних гормонів – регуляторів та аналогів естрогенів пояснює один з механізмів ноотропної дії імплантації КЕП.

Таким чином, застосовуючи КЕП, як джерело нейропротекторних та нейротрофічних речовин, ростових чинників нервів і судин, цитокінів, регуляторних білків і гормонів, можна коригувати основні патогенетичні ланки розвитку ДЕ в ПМП через механізми відновлення структурно-функціонального стану ЦНС. Використовуючи патогенетичний підхід, верифіковано модель ДЕ в ПМП на лабораторних тваринах, розроблено ефективний метод корекції порушення когнітивних функцій, відновлення мікроциркуляції, цитоархитіктоніки Амонова рогу гіпокампа та моторної кори півкуль ГМ. Завдяки кріобіологічним дослідженням і створеним на їх основі кріотехнологіям препарат з плацентарної тканини – КЕП – зберіг нейротрофічні та нейропротекторні БАР, які мають коригуючу, трофічну і регуляторну дію на ЦНС тварин. Проведене експериментальне дослідження дозволяє визначити імплантацію КЕП пацієнткам в постменопаузі, як перспективний, патогенетично обгрунтований лікувально-профілактичний метод боротьби з ДЕ та її наслідками.

ВИСНОВКИ

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

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

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

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

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

Експериментальне моделювання дисциркуляторної енцефалопатії в постменопаузі у мишей лінії BALB/c рекомендується шляхом проведення їм операцій двохсторонньої оваріоектомії та двохсторонньої оклюзії соних артерій. Модель ДЕ в ПМП верифікується наявністю через 3 тижні після хірургічного втручання комплексу порушень поведінки, когнітивно-мнестичних функцій та морфологічних ознак ДЕ в гіпокампі та моторній корі ГМ лабораторних тварин.

Кріоконсервовані експланти плаценти, що виготовлені та використані в експериментальному дослідженні, є біологічними об’єктами зі зберіженими есенціальними сполуками, які мають нейропротекторні та нейротрофічні властивості. Встановлений позитивний вплив імплантації КЕП на фізичні показники, тривалість життя, поведінку, стресостійкість і когнітивно-мнестичні функції мишей в моделі ДЕ в ПМП з відновленням мікроциркуляції та цитоархітектоніки в гіпокампі та моторній корі доводить перспективність використання КЕП для корекції цереброваскулярних геріатричних змін та вдосконалення методів терапії ДЕ в ПМП. Таким чином, рекомендується застосування КЕП в розробці лікувально-профілактичних программ терапії ДЕ в постменопаузі, а також для експериментальних досліджень в медицині та біології.

Отримані нові наукові дані про закономірності позитивної дії КЕП на нервові клітини *in vitro* та на експериментальних тварин з модельованою ДЕ в

ПМП, рекомендується використовувати в освітніх програмах з кріобіології, кроімедицини, геронтології, гінекології та неврології.

В результаті проведеного дослідження розроблено і отримано Патент України № 124910 «Спосіб лікування когнітивних порушень при дисциркуляторній енцефалопатії в постменопаузі». Запропонований патогенетично обґрунтований метод терапії ДЕ в постменопаузальному періоді, що включає застосування імплантації КЕП, дозволить при його впровадженні в перспективі суттєво знизити рівень неврологічних ускладнень та покращити якість життя і працездатність жінок у старшому віці.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Гольцев АН, Юрченко ТН редакторы. Плацента: криоконсервирование, клиническое применение. Харьков: СПД ФЛ Бровин А.В.; 2012. 318 с.
2. Грищенко ВИ, Лазуренко ВВ, Прокопюк ОС, Аралов ОН. Использование криоконсервированной плацентарной ткани в лечении невынашивания беременности. Пробл. криобиологии. 2003;1:6-80.
3. Грищенко ВИ, Прокопюк ОС, Прибылова ОВ, Строна ВИ. Терапия криоконсервированной плацентарной тканью и медикаментами раннего и патологического климакса. Международ мед журнал. 2000;6(1):54-7.
4. Грищенко ВИ, Геродес АГ, Никитченко ЮВ Грищенко НГ, Луцкая ЛИ, Прокопюк ОС. Использование криоконсервированной плацентарной ткани при нарушениях сперматогенеза у мужчин. Здоровье мужчины. 2007;2(21):168-71.
5. Астрелина ТА, Гомзяков АЕ, Кобзева ИВ, Карпова ЕЭ, Круглова ЯА, Скоробогатова ЕВ и др. Оценка качества и безопасности применения криоконсервированных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток плаценты в клинической практике. Клеточная трансплантация и тканевая инженерия. 2013;VIII(4):82-7.
6. Рассоха ИВ, Гольцев АН, Гурина ТМ. Влияние разных режимов криоконсервирования на способность суспензии плаценты проявлять иммунокорригирующую активность при лечении адъювантного артрита у мышей. Пробл криобиологии. 2004;1:2-–9.
7. Луценко НС, Прокопюк ОС, Бондаренко ИА, Гераскина ЛР, Евтерева ИА. Применение криоконсервированной плацентарной ткани при изоиммунизации беременных женщин. Пробл криобиологии. 2008;8(3):316-8.
8. Попович ЯО, Шевчук АГ, Василюк МД. Препарати кріоплацентарного комплексу в корекції оксидантного стрессу при лікуванні хворих на синдром діабетичної стопи. Трансплантологія. 2007;9(1):224–7.
9. Chakraborty PD, Bhattacharyya D. Regulation of trypsin activity by peptide fractionof an aqueous extract of human placenta used as wound healer. J Cell Physiol.

2011;226(8):2033-40.

10. Broxmeyer HE, Douglas GW, Hangoc G, Cooper S, Bard J, English D, et al. Human umbilical cord blood as a potential sourse of transplantable hematopoietic stem / progenitor cells. Proc Natl Acad Sci USA. 1989;86:3828-32.
11. Yu G, Borlongan CV, Stahl CE, Yu SJ, Bae E, Yang T et al. Transplantation of human umbilical cord blood cells for the repair of myocardial infarction. Med Sci Monit. 2008;14(10):163-72.
12. Сметник ВП, Тумилович ЛГ. Неоперативная гинекология: руководство для врачей. 3-е изд., перераб. и доп. Москва: Медицинское информационное агентство; 2006. 629 с.
13. Benedusi V, Meda C, Della Torre S, Monteleone G, Vegeto E, Maggi A. A lack of ovarian function increases neuroinflammation in aged mice. Endocrinology. 2012 June;153(6):2777-88.
14. Dubal DB, Zhu H, Yu J, Rau SW, Shughrue PJ, Merchenthaler I, et al. Estrogen receptor alpha, not beta, is a critical link in estradiol-mediated protection against brain injury. Proc Natl Acad Sci USA. 2001 Feb 13;98(4):1952-7.
15. Мищенко ТС. Дисциркуляторная энцефалопатия: устаревший термин или клиническая реальность? Міжнародний неврологічний журнал. 2013;2(56): 134-8.
16. Михаелян ТХ. Сравнительная характеристика сосудистых когнитивных нарушений при дисциркуляторной энцефалопатии. Межд мед журн. 2012;3:21-3.
17. Скороходов АП, Кобанцев ЮА. Метаболическая терапия ишемического инсульта кортексином и ноотропилом. Неврологический вестник. 2001;33(3-4):59-60.
18. Гомазков ОА Кортексин: молекулярные механизмы и мишени нейропротективной активности Журнал неврологии и психиатрии. 2015;8:99-104.
19. Евзельман МА, Александрова НА. Когнитивные нарушения у больных с ишемическим инсультом и их коррекция. Журнал неврологии и психиатрии.

2013;10:36-9.

20. Alvarez-Sabin Jose, Roman Gustavo C. Цитиколин при когнитивных нарушениях сосудистого генеза и сосудистой деменции после инсульта Международный неврологический журнал. 2011; 42(4):91-6.
21. Авдей ГМ Комплексное лечение дисциркуляторной энцефалопатии. Медицинские новости. 2005;1:8-15.
22. Левицкая НГ, Глазова НЮ, Себенцова ЕА, Манченко ДМ, Виленский ДА, Андреева ЛА и др. Исследование спектра физиологической активности аналога АКТГ4-10 гептапептида Семакс. Нейрохимия. 2008;25(1):111-8.
23. Григорьева ТИ, Кульчиков АЕ, Макаренко АН. Пептидергический ноотроп церебролизин – нейроиммунокорректор, индуцирующий выработку γ-интерферона. Журнал Академії медичних наук України. 2007;13(2):393-7.
24. Muresanu DF, Alvarez XA, Moessler H, Novak PH, Stan A, Buzoianu A et al. Persistence of the effects of Cerebrolysin on cognition and qEEG slowing in vascular dementia patients: results of a 3-month extension study. J Neurol Sci. 2010 Dec 15;299(1-2):179-83.
25. Головач ІЮ Дисциркуляторна енцефалопатія: деякі патогенетичні, клінічні та лікувальні аспекти. Ліки України. 2011;4(140):60-7.
26. Дубенко АЕ, Коростий ВИ, Литовченко ТА. Диагностика и лечение когнитивных нарушений. Реалии и перспективы. Здоровье Украины (ч. 1), тематический номер «Неврология. Психиатрия». 2011;3(18):16-8.
27. Дубенко АЕ, Коростий ВИ, Литовченко ТА. Диагностика и лечение когнитивных нарушений. Реалии и перспективы. Здоровье Украины (ч. 2), тематический номер «Неврология. Психиатрия». 2011;4(19):24-6.
28. Вербицкая СВ, Парфенов ВА. Клинический опыт применения мемантина при постинсультной деменции. Неврологический журнал. 2008;13(4):45-7.
29. Бескровный СВ, Цвелев ЮВ, Ткаченко НН, Рудь СА. Гормональный профиль женщин в перименопаузальном периоде. Вестник российской ассоциации акушеров-гинекологов. 1998;2:32-6.
30. Gambacciani M, Ciaponi M, Cappagli B, Genazzani AR. Effects of low-dose

continuous-combined conjugated estrogens and medroxyprogesterone acetate on menopausal symptoms, body weight, bone density, and metabolism in postme nopausal women. Am J Obstet Gynecol. 2001;185:1180-5.

31. Castelo-Branco C, Ferrer J, Palacios S. Spanish post-menopausal women's viewpoints on hormone therapy. Maturitas. 2007 May;56(4):420-8.

32. Castelo-Branco C, Palacios S, Calaf J et al. Available medical choices for the management of menopause. Maturitas. 2005;52:61-70.

33. Шевченко ЛА, Грищенко ВИ, Петренко АЮ, Прокопюк ОС. Об эффективности сочетанного применения антиоксидантной и клеточной терапии в реабилитации постинсультных больных с синдромом «motor-neglect». Нейроnews (психоневрология и нейропсихиатрия). 2009;7 (18):57-62.

34. Moriyama Y, Takagi N, Hashimura K, Itokawa C, Tanonaka K. Intravenous injection of neural progenitor cells facilitates angiogenesis after cerebral ischemia. Brain Behav. 2013 Mar;3(2):43-53.

35. Грищенко ВИ, Юрченко ТН, Прокопюк ОС. Новые криобиологические технологии получения клеточных и тканевых фетоплацентарных трансплантатов и их использование в медицине. Трансплантология. 2004;7(3):123-129.

36. Мусатова ИБ, Прокопюк ОС, Волина ВВ, Прокопюк ВЮ. Создание криозащитных сред для сохранения эксплантов ткани плаценты. Biotechnol Acta. 2013;6(6):132-8.

37. Прокопюк ВЮ, Прокопюк ОС, Чижевский ВВ. Вплив імплантації кріоконсервованої хоріальної тканини на морфофункціональний стан міокарда старих щурів. Медицина сьогодні і завтра. 2011;50-51(1-2):242-5.

38. Prokopyuk VYu, Prokopyuk OS, Musatova IB, Shevchenko NA, Roenko AA, Terehova EA et al. Safety of placental, umbilical cord and fetal membrane explants after cryopreservation. Cell organ transplantol. 2015;3(1):34-8.

39. Філімонов ВІ, редактор. Нормальна фізіологія. Київ: Здоров´я; 1994. 608 с.

40. Кветной ИМ, Айламазян ЭК, Лапина ЕА, Колобов АВ. Сигнальные молекулы – маркеры зрелости плаценты. Москва: МЕДпресс-информ; 2005. 96 с.

41. Tonello G, Daglio M, Zaccarelli N, Sottofattori E, Mazzei M, Balbi A. Characterization and quantitation of the active polynucleotide fraction (PDRN) from human placenta, a tissue repair stimulating agent. J Pharm Biomed Anal. 1996;14:1555-60.

42. Prokopyuk OS, Prokopyuk VYu, Pasieshvili NM et al. Implantation of cryopreserved human placental fragments restores prooxidant-antioxidant balance in experimental animals of late ontogeny. Cryobiol Cryomed. 2017;27(1):61-70.

43. Громова ОА, Торшин ИЮ, Диброва ЕА, Каримова ИМ, Гилельс АВ, Кустова ЕВ. Мировой опыт применения препаратов из плаценты человека: результаты клинических и экспериментальных исследований. Обзор. Пласт хирургия и косметология. 2011;3:1-12.

44. Прокопюк ОС. Коррекция сенильно-инволютивных процессов с использованием криоконсервированных фрагментов плаценты. В: Материалы междунар науч-практ конф Практико-ориентированные биотехнологические исследования в растениеводстве, животноводстве, медицине, 2013, Брест. Брест, 2013, с.123-6.

45. Перчик ОА, Волина ВВ. Влияние препаратов плаценты на морфофункциональное состояние органов и тканей старых крыс. Проблемы криобиологии. 2006;16(3):341-7.

46. Трифонов ВЮ, Прокопюк ВЮ, Зайченко АВ. Криоконсервированная сыворотка кордовой крови в восстановлении репродуктивной функции при антифосфолипидном синдроме. Проблемы криобиологии. 2011;21(1):75–84.

47. Грищенко ВИ, Нардид ЭО, Прокопюк ВЮ. Исследование эффективности применения нативной и криоконсервированной сыворотки кордовой крови в экспериментальной модели постгистерэктомического синдрома. Вісник проблем біології і медицини. 2010;2:68-73.

48. Kovalev GA, Vysekantsev IP, Ischenko IO, Abrafikova LG, Olefirenko AA, Sandomirskiy BP. Effect of Cryopreserved Cord Blood Serum and Placental Extract on Cold-Wound Healing. Probl Cryobiol Cryomed. 2015;25(1):57-66.

49. Vvedensky BP, Tynynyka LN, Kovalev GA, Sandomirsky BP. Content of Nitric

Oxide Final Product in Cartilage and Blood Serum of Rats at Low Temperature Modeling of Destructive and Dystrophic Process in Knee Joint. Probl Cryobiol Cryomed. 2011;21(4):421-429.

50. Falko OV. Application of Human Placental Blood Serum as Perspective Method to Correct Atherosclerotic Changes (Experimental Study). Probl Cryobiol Cryomed. 2012;22(2):133-143.

51. Кондаков ИИ, Юрченко ТН, Жуликова ЕП. Экспериментальная гиперхолестеринемия и липидкорригирующие эффекты при введении криоконсервированной плаценты. Світ медицини та біології. 2007;1:46-50.

52. Svidko EN., Demin YA. Compensation of Corneal Limbal Deficiency with Cord Blood Nucleated Cells. Probl Cryobiol Cryomed. 2015;25(2):181.

53. Демин ЮА, Белецкая ПВ. Патогенетические аспекты неоваскулярной патологии сетчатки. Архив украинской офтальмологии. 2013;1(1):39-45.

54. Пурышева ВЮ, Ломакин ИИ, Кудокоцева ОВ и др. Применение препаратов кордовой крови и общей экстремальной аэрокриотерапии для восстановления нарушений дермы, вызванных хроническим гипотиреозом. Трансплантологія. 2008;10(1):100-3.

55. Babijchuk LV, Koval SN, Babijchuk GA. Structure of Myocardium of Young Hypertensive Rats after Injection of Cryopreserved Human Cord Blood Nucleated Cells Structure of Myocardium of Young Hypertensive Rats after Injection of Cryopreserved Human Cord Blood Nucleated Cells. Probl Cryobiol Cryomed. 2016;6(3): 271-87.

56. Cheremskoy AK, Sleta IV, Lutsenko DG, Prokopyuk OS, Chizhevsky VV, Grischenko NG. Microhemocirculation in acute general cooling at the background of cryopreserved placenta extract administration Probl Cryobiol Cryomed. 2005;15(3):479-81.

57. Chuykova VI. Effect of Fetal Tissue on Metabolism of Lipids at Experimental Hypothyrosis. Probl Cryobiol Cryomed. 2008;18(4): 448-52.

58. Goltsev AN, Ostankova LV, Rassokha IV. Contribution of Apoptosis to Rheumatosis Arthritis Pathogenesis. Probable Ways for the Process Control.

Проблемы криобиологии. 2002;3:52-8.

59. Шепитько ВИ, Шепитько КВ. Реакция тонкого кишечника на введение криоконсервированной плаценты при остром экспериментальном воспалении брюшины у крыс. Вісник проблем біології і медицини 2017;2(140):168-72.

60. Xiao J, Iman Z, Motooka Y, Low WC. Transplantation of a novel cell line population of umbilical cord blood stem cells ameliorates neurological deficits associated with ischemic brain injury. Stem Cells Dev. 2005;14(6):722-33.

61. Лебединец ВВ, Овсянников СЕ, Останков МВ, Бондарович НА, Останкова ЛВ, Гольцев АН. Коррекция нарушений метаболизма введением криоконсервированной кордовой крови в экспериментальной модели ишемического инсульта. Науч. ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация. 2015;31(16):156-62.

62. Chen R, Ende N. The potential for the use of mononuclear cells from human umbilical cord blood in the treatment of amyotrophic lateral sclerosis in SOD1 mice. J Med. 2000;31:21-30.

63. Garbuzova-Davis S, Willing AE, Zigova T, Saporta S, Justen EB, Lane J et al. Intravenous administration of human umbilical cord blood cells in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis: distribution, migration, and differentiation. J Hematother Stem Cell Res 2003;12(3):255-70.

64. Sun T, Ma Q-H. Repairing neural injuries using human umbilical cord blood. Mol Neurobiol. 2013;47(3): 938-45.

65. Филатов ВП. Оптическая пересадка роговицы и тканевая терапия Москва: Медгиз; 1945. 231 с.

66. Прибылова ОВ. Коррекция вазомоторных и эмоционально-психических нарушений у женщин с патологическим климаксом при помощи ГТКПТ. Медицина сегодня и завтра. 1997;2:109-10.

67. Грищенко НГ, Грищенко ВИ, Смольянинова ЕИ, Чернышенко ЛГ, Волкова НА. Влияние криоэкстракта плаценты на индукцию суперовуляции у лабораторных мышей с хроническим воспалением яичников. Проблемы криобиологии. 2010;20(3):327-37.

68. Кузьмина ИЮ, Чадаев ВЕ, Прокопюк ОС, Карпенко ВГ. Опыт применения криоконсервированной плаценты в лечении фетоплацентарной недостаточности и гипоксии плода. Проблемы криобиологии. 2006;16(2):222-9..

69. Морозова РП, Козуленко ЕП, Николаенко ИА и др. Плацента – источник биологически активных веществ. Украинский биохимический журнал. 1999;1(4):26-9.

70. Веропотвелян ПН, Веропотвелян НП, Гужевская ИВ. Цитокины в системе мать-плацента-плод при физиологическом и патологическом течении беременности. Здоровье женщины. 2013;1(77):126-9.

71. Камкин А, Каменский А, редакторы. Фундаментальная и клиническая физиология. Учебное пособие. Москва: Академия; 2004. 1073 с.

72. Petraglia F, de Micheroux AA, Florio P, Salvatori M, Gallinelli A, Cela V et al. Steroid-protein interaction in human placenta. J Steroid Biochem Mol Biol. 1995;53 (1-6):227-31

73. Родинський ОГ, Ткаченко СС. Біоелектрична активність інтернейронів спинного мозку самиць білих щурів за умов експериментальної менопаузи. Фізіол журн. 2015;61(5):28-34.

74. Gatson JW, Liu MM, Abdelfattah K, Wigginton JG, Smith S, Wolf S et al. Estrone is neuroprotective in rats after traumatic brain injury. J Neurotrauma. 2012 Aug 29;12:2209-19.

75. Глебов РН, Крыжановский ГН. Функциональная биохимия синапсов. Москва: Медицина; 1978. 328 с.

76. Banerjee KK, Bishayee A, Chatterjee M. Effects of human placental extract on brain monoamines and monoamine oxidase activity in rats. Tohoku J Exp Med. 1995;176(1):17-24.

77. Zhang CL, Cheng LR, Wang H, Zhuang LZ, Huang WQ. Neuropeptides and neurotransmitters in human placental villi. Neuroendocrinology. 1991;53(1):77-83.

78. Mattson MP. Glutamate and neurotrophic factors in neuronal plasticity and disease. Ann N Y Acad. 2008;1144:97-112. doi: 10.1196/annals.1418.005.

79. Toti P, Ciarmela P, Florio P, Volpi N, Occhini R, Petraglia F. Human placenta

and fetal membranes express nerve growth factor mRNA and protein. J Endocrinol Invest. 2006 Apr;29(4):337-41.

80. Zhu Y, Wang CC, Chen L, Qian LB, Ma LL, Yu J et al. Both PI3K/Akt and ERK1/2 pathways participate in the protection by dexmedetomidine against transient focal cerebral ischemia/reperfusion injury in rats. Brain Research, 2013;1494:1–8.

81. Попова НК, Ильчибаева ТВ, Науменко ВС. Нейротрофические факторы (BDNF, GDNF) и серотонинергическая система мозга. Обзор. Биохимия. 2017;82(3):449-59.

82. Ma S, Peng C, Wu S, Wu D, Gao C. Sciatic nerve regeneration using a nerve growth factor-containing fibrin glue membrane. Neural Regen Res. 2013 Dec 25;8(36):3416-22. doi: 10.3969/j.issn.1673-5374.2013.36.007.

83. Ведунова ВВ, Сахарнова ТА, Митрошина ЕВ, Шишкина ТВ, Астраханова ТА, Мухина ИВ. Антигипоксические и нейропротективные свойства нейротрофических факторов BDNF и GDNF при гипоксии *in vitro* и *in vivo*. Соврем технологии в медицине. 2014;6(4):1-10.

84. Peng, L, Yu AC, Fung KY, Prevot V, Hertz L. Alpha-adrenergic stimulation of ERK phosphorylation in astrocytes is alpha(2)-specific and may be mediated by transactivation. Brain Research. 2003;978:65-71.

85. Glerup S, Bolcho U, Moelgaard S, Boeggild S, Vaegter CB, Smith AH et al. SorCS2 is required for BDNF-dependent plasticity in the hippocampus. Mol Psychiatry. 2016;21:1740-51.

86. Гомазков О.А. Трансформация нейральных стволовых клеток и репаративные процессы в мозге. Журнал неврологии и психиатрии. 2014;8:4-12.

87. Takuma K, Mizoguchi H, Funatsu Y, Kitahara Y, Ibi D, Kamei H et al. Placental extract improves hippocampal neuronal loss and fear memory impairment resulting from chronic restraint stress in ovariectomized mice. J Pharmacol Sci. 2012; 120: 89-97.

88. Шмидт ЕВ, Максудов ГА. Классификация сосудистых поражений головного и спинного мозга. Журнал невропатологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 1971;71(1):3-11. Шмидт ЕВ, Лунев ДК, Верещагин НВ. Сосудистые

заболевания головного и спинного мозга. Москва: Медицина; 1976. 284 с.

89. Евтушенко СК. Дисциркуляторная энцефалопатия как анахронизм отечественной неврологии. Международный неврологический журнал. 2010;6(36):181-7.

90. ICD-10-CM Official Guidelines for Coding and Reporting FY 2019 (October 1, 2018 - September 30, 2019) [Internet, cited 2019 Feb 19]. Available from: https://www.cdc.gov/nchs/icd/icd10cm.htm.

91. Мурашко НК, Сулік РВ. Хронічне порушення мозкового кровообігу: акцент на діагностику та лікування. Ліки України. 2011;9(155):58-63.

92. Шмырев ВИ, Васильев АС, Рудас МС. Дисциркуляторная энцефалопатия – вопросы патогенеза, диагностики, дифференциальной диагностики и лечения на современном этапе. Ліки України. 2010;9(145):62-9.

93. Кириченко А.А, Панчук ЛН, Новичкова ЮН, Виноградова ИВ, Зубкова ЛВ. Комплексная оценка вазодвигательной функции эндотелия и ристомицин-индуцированной агрегации тромбоцитов у женщин с болевым синдромом в груди, страдающих артериальной гипертензией, в постменопаузе. Регионарное кровообращение и микроциркуляция. 2003;3(7):44-9.

94. Сметник ВП, редактор. Медицина климактерия. Ярославль: Издательство Литера; 2006. 848 с.

95. Вихляева ЕМ, редактор. Руководство по эндокринной гинекологии. 3-е изд., доп. Москва: ООО Медицинское информационное агентство; 2006. 784 с.

96. Сметник ВП, Кулаков ВИ, редакторы. Руководство по климактерию: Руководство для врачей. Москва: МИА; 2008. 685 с.

97. Левитская ЗИ. Артериальная гипертония у женщин в постменопаузе. Лечащий врач. 2006;4:83-5.

98. Змановский ЮФ. Возрастные нейрофизиологические особенности и климактерические расстройства у женщин. Москва: Медицина; 1975. 191 с.

99. Ощепкова ЕВ. Гипертоническая энцефалопатия: терапевтическая или неврологическая проблема? Терапевтический архив. 2009;81(1):79-84.

100. Яхно НН, редактор. Болезни нервной системы. Руководство для врачей.

Москва: Медицина; 2005. Том 1, Дамулин ИВ, Парфенов ВА, Скоромец АА, Яхно НН. Нарушения кровообращения в головном и спинном мозге; с.275-85.

101. Мачерет ЄЛ, Ханенко НВ. Гіпертонічна дисциркуляторна енцефалопатія (етіопатогенез, клініка, діагностика, лікування) [Інтернет, цитовано 2018 Січ 20]; Доступно: http://uarma.com/expert/g-perton-chna-distsirkulyatorna-entsefalopat-ya-et-opatogenez-kl-n-ka-d-agnostika-l-kuvannya.

102. Верещагин НВ, Моргунов ВА, Гулевская ТС. Патология головного мозга при атеросклерозе и артериальной гипертензии. Москва: Медицина; 1997. 287 с.

103. Бурцев ЕМ. Основы неврологии. Часть 3: Неотложные состояния: руководство в 3 частях. Нижний Новгород: Издательство НГУ; 1998. 560 с.

104. Левин ОС. Современные подходы к диагностике и лечению дисциркуляторной энцефалопатии. Международный неврологический журнал. 2012;1(47):117-24.

105. Григорова ИА, Сало ВИ, Товажнянская ЕЛ, Тихонова ЛВ, Кудрявцева АА. Нарушения биоэнергетического гомеостаза и общей чувствительности при атеросклеротической дисциркуляторной энцефалопатии. Международный медицинский журнал. 2010;16(3):25-30.

106. De Haan EH, Nys GM, Van Zandvoort MJV. Cognitive function following stroke and vascular cognitive impairment. Curr Opin Neurol. 2006;19:559-64.

107. Яворская В., Фломин ЮВ, Гребенюк АВ. Подходы к исследованию когнитивных функций при цереброваскулярных заболеваниях и других органических поражениях головного мозга: обзор иностранной литературы. Международный неврологический журнал. 2008;2(18):131-7.

108. Шварц ГЯ. Сосудистые эффекты эстрогенов и заместительная гормональная терапия климактерических расстройств. Экспериментальная и клиническая фармакология. 1996;6:62-9.

109. Cobo E, Secades JJ, Miras F, González JA, Saver JL, Corchero C et al. Boosting the chances to improve stroke treatment. Stroke. 2010 Mar 1;41:143-50. https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.109.567404.

110. Saver JL. Citicoline: update on a promising and widely available agent for neuroprotection and neurorepair. Rev Neurol Dis. 2008;5:167-77.

111. Камчатнов ПР. Когнитивный резерв, когнитивные нарушения и возможность их медикаментозной коррекции. Журн неврол и психиат. 2014;114(3):87-91.

112. Henderson VW. Gonadal Hormones and Cognitive Aging: A Midlife Perspective. Women's Health. 2011;7(1):81-93. https://doi.org/10.2217/WHE.10.87.

113. Andreano JM, Cahill L. Sex influences on the neurobiology of learning and memory. Learn Mem. 2009 Mar 24;16(4):248-66. doi: 10.1101/lm.918309.

114. Castelo-Branco C, Ferrer J, Palacios S. Spanish post-menopausal women's viewpoints on hormone therapy. 2007 May. Maturitas;56(4):420-8.

115. Gambacciani M, Ciaponi M, Cappagli B, Genazzani AR: Effects of low-dose continuous-combined conjugated estrogens and medroxyprogesterone acetate on menopausal symptoms, body weight, bone density, and metabolism in postmenopausal women. Am J Obstet Gynecol. 2001;185:1180-5.

116. Мищенко ТС, Здесенко ИВ, Линская АВ, Мищенко ВН. Новые мишени терапевтического воздействия у пациентов с хронической ишемией головного мозга. Международный неврологический журнал. 2011;2(40):7-17.

117. Яворская ВА, Бондарь ОБ, Скорый АЮ, Краснорудская ТВ, Володарская НМ, Афанасьев ДГ. Нейрофизиологический аспект метаболической терапии хронической церебральной ишемии. Міжнародний медичний журнал. 2016;22(4):67-72.

118. Сметник ВП, Ильина ЛМ, редакторы. Ведение женщин в пери- и постменопаузе: практические рекомендации. Москва – Ярославль: ООО ИПК Литера; 2010. 221 с.

119. Татарчук ТФ, Регеда СІ, Сольський ВС. До питання про судинну патологію в жінок на тлі естрогенного дефіциту в постменопаузі. Нова медицина. 2004;3:37-43.

120. Чекман ИС, Беленичев ИФ, Демченко АВ, Боброва ВИ, Горчакова НА, Кучеренко ЛИ, Бухтиярова НВ. Ноотропы в комплексной терапии хронической

ишемии мозга. Наука та інновації. 2014;10(4):61-75.

121. Кузнецова СМ, Егорова МС. Нейрометаболическая коррекция кардиоцеребральных нарушений при дисциркуляторной энцефалопатии. Міжнародний неврологічний журнал. 2016;6(84):41-8.

122. Ишманова АР, Карамова ИМ, Николаева ИЕ, Янбаева СМ, Закирова АН. Особенности эндотелиальной дисфункции у женщин с артериальной гипертензией и метаболическим синдромом в период менопаузы. Вестник РУДН, серия Медицина. 2009;4:496-8.

123. Hak EA, Pols AP, Visser TJ, Drexhage HA, Hofman A, Witteman JC. Hypothyroidism is an Independent Risk Factor for Atherosclerosis and Myocardial Infarction in Elderly Women: The Rotterdam Study. Ann Intern Med. 2000 Feb 15;132(4):270-8.

124. Толстов СН, Мычка ВБ. Метаболическая (цитопротективная) терапия менопаузальных расстройств Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2011;10(3):72-5.

125. Шевчук ВГ, редактор. Фізіологія. 2-ге видання: Підручник для ВМНЗ IV р.а. Вінниця: Нова Книга; 2015. 448 с.

126. Кримська МЛ. Клімактеричний період. Москва: Медицина; 1989. 271 с.

127. Алипова ОЄ, Васильєва-Лінецька ЛЯ. Стан ендотеліальної функції у хворих похилого віку з дисциркуляторною енцефалопатією та ізольованою систолічною і систоло-діастолічною артеріальною гіпертензією. Міжнародний неврологічний журнал. 2018;4 (98):55-62.

128. Mosca L, Appel LJ, Benjamin EJ, Berra K, Chandra-Strobos N, Fabunmi RP et al. Evidence-based guidelines for cardiovascular disease prevention in women. American Heart Association scientific statement. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2004 Mar;24(3):29-50.

129. Коркушко ОВ, Хавинсон ВХ, Бутенко ГМ, Шатило ВБ. Пептидные препараты тимуса и эпифиза в профилактике ускоренного старения. Санкт-Петербург: Наука; 2002. 202 с.

130. Винник МИ, Баранова НП, Оськина ВН. Некоторые особенности

окислительного гомеостаза при психических расстройствах инволюционного генеза у женщин. Журнал психиатрии и медицинской психологии. 1999;1(5):37-42.

131. Винник МІ. До питання про патогенетичні особливості інволюційних психічних розладів у жінок. Львівський медичний часопис. 1999;5(3):109-14.

132. Sherwin BB. Estrogen and cognitive functioning in women. Endocrine Rev 2003;24:133-51.

133. Іпатов АВ, Лисунець ОМ, Ханюкова ІЯ. Первинна інвалідність внаслідок провідних хвороб системи кровообігу в Україні (2015-2016 рр.). Буковинський медичний вісник. 2017;21(2), ч. 1:197-202.

134. Королев АА, Суслова ГА. Нейротрансмиттеры в регуляции движений и развитии спастических двигательных нарушений. Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика. 2012;1:92-6.

135. Смирнов ВМ, редактор. Физиология человека: Учебник. Москва: Медицина; 2001. 608 с.

136. Шпрах ВВ, Карташова ОН. Распространенность и варианты клинического течения коморбидной цереброваскулярной патологии у больных с относительно поздним манифестом монополярной депрессии. Сибирский медицинский журнал (Иркутск). 2003;37(2):26-30.

137. Оськіна ВМ, Баранова НП, Голова ІД. Окремі аспекти обміну біогенних амінів при психічних розладах інволюційного генезу у жінок. Вісник проблем біології і медицини. 1999;10:118-20.

138. Розен ВБ, Смирнов АН. Рецепторы и стероидные гормоны. Москва: МГУ; 1981. 276 с.

139. Beyer C, Pawlak J, Karolczak M. Membrane receptors for oestrogen in the brain. J Neurochem. 2003;87:545-50.

140. Carroll JC, Rosario ER, Chang L, Stanczyk FZ, Oddo S, La Ferla FM, Pike CJ. Progesterone and Estrogen Regulate Alzheimer-Like Neuropathology in Female 3xTg-AD Mice. J Neurosci. 2007 Nov 28;27(48):13357-65.

141. Selvaraj UM, Zuurbier KR,Whoolery CW, Plautz EJ, Chambliss KL, Kong X, et

al. Selective Nonnuclear Estrogen Receptor Activation Decreases Stroke Severity and Promotes Functional Recovery in Female Mice. Endocrinology. 2018 Nov 1;159(11):3848-59. doi: 10.1210/en.2018-00600.

142. Lembach A, Stahr A, Ali AAH, Ingenwerth M, von Gall C. Sex-Dependent Effects of Bmal1-Deficiency on Mouse Cerebral Cortex Infarction in Response to Photothrombotic Stroke. Int J Mol Sci. 2018 Oct 11;19(10):3124. doi: 10.3390/ijms19103124.

143. Bertrand PP, Paranavitane UT,Chavez C, Gogos A, Jones M, van den Buuse M. The effect of low estrogen state on serotonin transporter function in mouse hippocampus: a behavioral and electrochemical study. Brain Res. 2005 Dec 7;1064(1-2):10-20.

144. Richardson TA, Robinson RD. Menopause and depression: a review of psychologic function and sex steroid neurobiology during the menopause (1). Prim Care Update Ob Gyns. 2000 Nov 1;7(6):215-23.

145. Antkiewicz-Michaluk L, Romańska I, Wąsik A, Michaluk J. Antidepressant-Like Effect of the Endogenous Neuroprotective Amine, 1MeTIQ in Clonidine-Induced Depression: Behavioral and Neurochemical Studies in Rats. Neurotox Res. 2017 Jul;32(1):94-106.

146. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes. [Internet, cited 2018 Feb 20]. Available from: https://www.coe.int/en/web/conventions/full-list/-/conventions/treaty/123.

147. Закон України Про захист тварин від жорстокого поводження. Відомості Верховної Ради України 3447-IV ред. 04.08.2017. [Інтернет, цитовано 2018 Лют 20]. Доступно: https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/3447-15.

148. Коржевский ДЭ, Гиляров АВ. Основы гистологической техники. Санкт-Петербург: СпецЛит; 2010. 96 с.

149. Niks M, Otto M. Towards an optimized MTT assay. J Immunol Methods. 1990;130(1):149-51.

150. Sukach AN, Shevchenko MV, Liashenko TD. Comparative study on influence of fetal bovine serum and serum of adult rat on cultivation of newborn rat neural

cells. Biopolymers and cell. 2014;30(5):394-9.

151. Suh H, Consiglio A, Ray J, Sawai T, D'Amour KA, Gage FH. In vivo fate analysis reveals the multipotent and self-renewal capacities of Sox2+ neural stem cells in the adult hippocampus. Cell Stem Cell. 2007 Nov;1(5):515-28. doi: 10.1016/j.stem.2007.09.002.

152. Tzu-Chia Hsu, Kuang-Kai Liu, Huan-Cheng Chang, Eric Hwang, Jui-I Chao. Labeling of neuronal differentiation and neuron cells with biocompatible fluorescent nanodiamonds. Scientific Reports. 2015;4(1):5004. https://doi.org/10.1038/srep05004

153. Zhang ZJ, Jiang BC, Gao YJ. Chemokines in neuron-glial cell interaction and pathogenesis of neuropathic pain. *Cell Mol Life Sci*. 2017;74(18):3275-91. doi:10.1007/s00018-017-2513-1.

154. Прокопюк ВЮ, Чуб ОВ, Шевченко МВ, Прокопюк ОС. Плацентарные стволовые клетки, органотипическая культура и экстракт плаценты человека обладают нейропротекторной активностью *in vitro*. Клеточная и органная трансплантология. 2017;5(1):34-8.

155. Boldyrev A, Bulygina E, Leinsoo T, Petrushanko I, Tsubone S, Abe H. Protection of neuronal cells against reactive oxygen species by carnosine and related compounds. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol. 2004;137:81-8. doi: 10.1016/j.cbpc.2003.10.008.

156. Медичний портал Інфомедія Здоров'я України. Українська неврологія сьогодні [Інтернет] 2015 Бер [цитовано 2018 Лют 20]. Доступно: http://health-ua.com/articles/1208.

157. Gervois P, Wolfs E, Ratajczak J, Dillen Y, Vangansewinkel T, Hilkens P. Stem cell-based therapies for ischemic stroke: preclinical results and the potential of imaging-assisted evaluation of donor cell fate and mechanisms of brain regeneration Med Res Rev. 2016 Nov;36(6):1080-126. doi: 10.1002/med.21400.

158. Wan Z, Mah D, Simtchouk S, Kluftinger A, Little JP. Human adipose tissue conditioned media from lean subjects is protective against H2O2 induced neurotoxicity in human SH-SY5Y neuronal cells Int J Mol Sci. 2015 Jan 6;16(1):1221-31. doi: 10.3390/ijms16011221.

159. Huang Z, Huang PL, Panahian N, Dalkara T, Fishman MC, Moskowitz MA. Effects of cerebral ischemia in mice deficient in neuronal nitric oxide synthase. Science. 1994;265:1883-5.

160. Гомазков ОА. Старение мозга и нейротрофическая терапия. Москва: Икар; 2011. 179 с.

161. Cheng L, Locke C, Davis GW. S6 kinase localizes to the presynaptic active zone and functions with PDK1 to control synapse development. J Cell Biol. 2011;194(6): 921-35.

162. Moustafa AA On and Off switches in the brain. Front Behav Neurosci. 2015;9:114. doi: 10.3389/fnbeh.2015.00114.

163. Стефанов ОВ, редактор. Доклінічні дослідження лікарських засобів: Методичні рекомендації. Київ: Авіцена; 2001. 528 с.

164. Norman GR, Streiner DL. Biostatistics: The Bare Essentials. PMPH USA; 2008. 393 p.

165. Донцов В.И. Экспериментальная геронтология: методы изучения старения. Москва: Альтекс; 2011. 432 с.

166. Buccafusco JJ, editor. Methods of Behavior Analysis in Neuroscience, second edition. Boca Raton: CRC Press, LLC; 2009. 343 p.

167. Faizi M, Bader PL, Saw N, Nguyen Thuy-Vi V, Beraki S, Wyss-Coray T et al. Thy1-hAPPLond/Swe+ mouse model of Alzheimer's disease displays broad behavioral deficits in sensorimotor, cognitive and social function. Brain Behav. 2012;2(2):
142-54.

168. Батуев АС, редактор. Буреш Я, Бурешова О, Хьюстон ДжП. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения. Москва: Высшая школа; 1991. 399 с.

169. Воронина ТА, Середенин СБ., Экспериментальное изучение препаратов с транквилизирующим (анксиолитическим) действием: методические рекомендации. Ведомости фармакол ком МЗ РФ. 1998;2:19-25.

170. Rusa R, Alkayed NJ, Crain BJ, Traystman RJ, Kimes AS, London ED et al. 17b-

Estradiol Reduces Stroke Injury in Estrogen-Deficient Female Animals. Stroke. 1999;30:1665-70.

171. Levine S, Sohn D Cerebral ischaemia in infant and adult gerbils. Arch Pathol. 1969;87:315-7.

172. Lee JC, Park JH, Park OK, Kim IH, Yan BC, Ahn JH. et al. Neuroprotective effects of tanshinone I from Danshen extract in a mouse model of hypoxia-ischemia. Anatomy & cell biology. 2013;46(3):183-90. doi:10.5115/acb.2013.46.3.183.

173. Hernandez TD, Schallert T. Seizures and recovery from experimental brain damage. Exp Neurol. 1988;102:318-24.

174. Боголепов НН, Фокин ВФ, редакторы. Функциональная межполушарная асимметрия: Хрестоматия. Москва: Научный мир; 2004. Орлов В., Черноситов АВ, Сагамонова КЮ, Боташева ТЛ. Межполушарная асимметрия мозга в системной организации процессов женской репродукции; с.444-80.

175. Object-Location Memory Task [Internet, cited 2013 Nov 20]. Available from: http://sbfnl.stanford.edu/cs/bm/lm/bml_objectlocation.html

176. Павлов ИП. Двадцатилетний опыт объективного изучения высшей деятельности (поведения) животных. Москва: Наука; 1973. 661 с.

177. Вартанян ГА, Петров ЕС. Эмоции и поведение. Ленинград: Наука; 1989. 144 с.

178. Юматов ЕА, Мещерякова ОЛ. Прогнозирование устойчивости к эмоциональному стрессу на основе индивидуального тестирования поведения. ЖВНД. 1990;40(3):575-9.

179. Маркова ЕВ, Повещенко АФ, Короткова НА, Якушенко ЕВ, Абрамов ВВ, Козлов ВА. Модуляция ориентировочно-исследовательского поведения у мышей в процессе развития гуморального иммунного ответа. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2002;133(5):534-6.

180. Martin-Arenas FJ, Pintado CO. Results of the Open Field Test at different light intensities in C57 mice. In: Spink AJ, van den Broek EL, Loijens LWS, Woloszynowska-Fraser M, Noldus LPJJ, editors. Proceedings of Measuring Behavior 2014: 9th International Conference on Methods and Techniques in Behavioral

Research; 2014 August 27-29; Wageningen, The Netherlands. Wageningen: Noldus Information Technology B.V.; 2014. 322-6.

181. Биологические ритмы. В 2-х т. Т. 1. Пер. с англ. Москва: Мир; 1984. 414 с.

182. Леутин ВП, Николаева ЕИ. Психо-физиологические механизмы адаптации и функциональная асимметрия мозга. Новосибирск: Наука; 1988. 192 с.

183. Бианки ВЛ. Механизмы парного мозга. Ленинград: Наука; 1989. 352 с.

184. Овчинников НД. Методика количественной оценки межполушарной функциональной асимметрии мозга. Физиология человека. 1997;23(6):131-2.

185. Удалова ГП, Михеев ВВ. Об участии полушарий в формировании пространственно-моторной асимметрии при зрительном распознавании у крыс. ЖВНД. 1988;38(3):467-74.

186. Deacon RMJ, Rawlins NP. T-Maze alternation in the rodent. Nature Protocols. 2006;1:7-12.

187. Чуян ЕН, Горная ОИ. Изменение двигательной активности животных с разным профилем моторной асимметрии в условиях гипокинезии. Физика живого. 2009;17(2):193-9.

188. Бачинська НЮ, Демченко ОВ, Полєтаєва КМ, Холін ВО. Особливості синдрому помірних когнітивних порушень у хворих на гіпертонічну дисциркуляторну енцефалопатію та можливості корекції когнітивних змін препаратом Прамістар. Міжнародний неврологічний журнал. 2012;2 (48):99-106.

189. Гончарова ЯА, Евтушенко СК, Симонян ВА, Евтушенко ИС, Филимонов ДА, Морозова АВ. Опыт применения мемантина в терапии когнитивных расстройств при различных органических заболеваниях нервной системы. Международный неврологический журнал. 2011;2(40):47-54.

190. Past 3.x - the Past of the Future [cited 2016 Feb 20]. Available from: https://folk.uio.no/ohammer/past/

191. Chen J, Shehadah A, Pal A, Zacharek A, Cui X, Cui Y et al. Neuroprotective effect of human placenta-derived cell treatment of stroke in rats. Cell Transplant. 2013;22(5):871-9.

192. Li Z, Zhao W, Liu W, Zhou Y, Jia J, Yang L. Transplantation of placenta-derived mesenchymal stem cell-induced neural stem cells to treat spinal cord injury. Neural Regen Res. 2014;9(24):2197-204.

193. Cizkova D, Devaux S, Le Marrec-Croq F, Franck J, Slovinska L, Blasko J et al. Modulation properties of factors released by bone marrow stromal cells on activated microglia: an in vitro study. Sci Rep. 2014 Dec 19;4:7514. doi: 10.1038/srep07514.

194. Benedusi V, Meda C, Della Torre S, Monteleone G, Vegeto E, Maggi A. A lack of ovarian function increases neuroinflammation in aged mice. Endocrinology. 2012 Jun;153(6):2777-88. doi: 10.1210/en.2011-1925.

195. Zhao L, Brinton RD. Select estrogens within the complex formulation of conjugated equine estrogens (Premarin ®) are protective against neurodegenerative insults: implications for a composition of estrogen therapy to promote neuronal function and prevent Alzheimer's disease. BMC Neuroscience. 2006;7:24.

196. Hsuan YC, Lin CH, Chang CP, Lin MT. Mesenchymal stem cell-based treatments for stroke, neural trauma, and heat stroke. Brain Behav. 2016 Aug 3;6(10):e00526. eCollection 2016 Oct.

197. 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 Oct 2;10(10):e0139834. doi: 10.1371/journal.pone.0139834.

198. Pogozhykh D, Pogozhykh O, Prokopyuk V, Kuleshova L, Goltsev A, Blasczyk R, Mueller T. Influence of temperature fluctuations during cryopreservation on vital parameters, differentiation potential, and transgene expression of placental multipotent stromal cells. Stem Cell Res Ther. 2017 Mar 11;8(1):66. doi: 10.1186/s13287-017-0512-7.

199. Schevchenko 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.

200. Fukui M, Song JH, Choi J, Choi HJ, Zhu BT. Mechanism of glutamate-induced

neurotoxicity in HT22 mouse hippocampal cells Eur J Pharmacol. 2009 Sep 1; 617(1-3):1-11. doi: 10.1016/j.ejphar.2009.06.059.

201. Kanno H, Kawakami Z, Mizoguchi K, Ikarashi Y, Kase Y. Yokukansan, a kampo medicine, protects PC12 cells from glutamate-induced death by augmenting gene expression of cystine/glutamate antiporter system Xc-. PLoS One. 2014 Dec 31;9(12):e116275. doi: 10.1371/journal.pone.0116275.

202. Mir C, Clotet J, Aledo R. CDP-choline prevents glutamate-mediated cell death in cerebellar granule neurons. J Mol Neurosci. 2003; 20:53-60.

203. Honmou O, Onodera R, Sasaki M, Waxman SG, Kocsis JD. Mesenchymal stem cells: therapeutic outlook for stroke Trends Mol Med. 2012 May;18(5):292-7. doi: 10.1016/j.molmed.2012.02.003.

204. Imberti B, Morigi M, Tomasoni S, Rota C, Corna D, Longaretti L et al. Insulin-like growth factor-1 sustains stem cell mediated renal repair. J Am Soc Nephrol. 2007 Nov;18(11):2921-8.

205. Lange C, Tögel F, Ittrich H, Clayton F, Nolte-Ernsting C, Zander AR, Westenfelder C. Administered mesenchymal stem cells enhance recovery from ischemia/reperfusion-induced acute renal failure in rats. Kidney Int. 2005 Oct;68(4):1613-7.

206. Portmann-Lanz CB, Schoeberlein A, Huber A, Sager R, Malek A, Holzgreve W, Surbek DV. Placental mesenchymal stem cells as potential autologous graft for pre- and perinatal neuroregeneration. Am J Obstet Gynecol. 2006 Mar;194(3):664-73.

207. Nazarov I, Lee JW, Soupene E, Etemad S, Knapik D, Green W et al. Multipotent stromal stem cells from human placenta demonstrate high therapeutic potential. Stem Cells Transl Med. 2012;1:359-72.

208. Bakondi B, Shimada IS, Perry A, Munoz JR, Ylostalo J, Howard AB et al. CD133 identifies a human bone marrow stem/progenitor cell sub-population with a repertoire of secreted factors that protect against stroke. Mol Ther. 2009;17:1938-47.

209. Dai W, Hale SL, Martin BJ, Kuang JQ, Dow JS, Wold LE, Kloner RA. Allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in postinfarcted rat myocardium: short- and long-term effects. Circulation. 2005;112:214-23.

210. Uchida S, Inanaga Y, Kobayashi M, Hurukawa S, Araie M, Sakuragawa N. Neurotrophic function of conditioned medium from human amniotic epithelial cells. J Neurosci Res. 2000;62:585-90.

211. Sakuragawa N, Thangavel R, Mizuguchi M, Hirasawa M, Kamo I. Expression of markers for both neuronal and glial cells in human amniotic epithelial cells. Neurosci Lett. 1996;209:9-12

212. Portmann-Lanz CB, Schoeberlein A, Huber A, Sager R, Malek A, Holzgreve W, Surbek DV. Placental mesenchymal stem cells as potential autologous graft for pre- and perinatal neuroregeneration. Am J Obstet Gynecol. 2006 Mar;194(3):664-73.

213. Leu S, Lin YC, Yuen CM, Yen CH, Kao YH, Sun CK, Yip HK. Adipose-derived mesenchymal stem cells markedly attenuate brain infarct size and improve neurological function in rats J Transl Med. 2010 Jun 28;8:63. doi: 10.1186/1479-5876-8-63.

214. Chen J, Li Y, Katakowski M, Chen X, Wang L, Lu D et al. Intravenous bone marrow stromal cell therapy reduces apoptosis and promotes endogenous cell proliferation after stroke in female rat. J Neurosci Res. 2003, 73(6):778-86.

215. Liu T, Wu J, Huang Q, Hou Y, Jiang Z, Zang S et al. Human amniotic epithelial cells ameliorate behavioral dysfunction and reduce infarct size in the rat middle cerebral artery occlusion model. Shock. 2008;29:603-11.

216. Chen YT, Sun CK, Lin YC, Chang LT, Chen YL, Tsai TH et al. Adipose-derived mesenchymal stem cell protects kidneys against ischemia-reperfusion injury through suppressing oxidative stress and inflammatory reaction. J Transl Med. 2011;9:51.

217. Hamedi-Asl P, Halabian R, Bahmani P, Mohammadipour M, Mohammadzadeh M, Roushandeh AM et al. Adenovirus mediated expression of the HO-1 protein within MSC decreased cytotoxicity and inhibited apoptosis induced by oxidative stresses. Cell Stress Chaperones. 2012;17:181-90.

218. Tabei T. Biosynthesis of estrogens in the human placenta. Acta Obstet Gynaecol Jpn. 1970;17:1-10.

219. Simpson ER, MacDonald PC. Endocrine physiology of the placenta. Annu Rev

Physiol. 1981;43:163-88.

220. Lu B, Chow A. Neurotrophins and hippocampal synaptic transmission and plasticity. J Neurosci Res. 1999;58:76-87.

221. Solum DT, Handa RJ. Estrogen regulates the development of brain-derived neurotrophic factor mRNA and protein in the rat hippocampus. J Neurosci. 2002;22:2650-9.

222. Thoenen H. Neurotrophins and neuronal plasticity. Science. 1995 Oct 27;270(5236):593-8.

223. Прокопюк ОС, Шевченко НО, Прокопюк ВЮ, Чуб ОВ, Терехова ОО. Вплив кріоконсервованих біооб'єктів плацентарного походження на культуру клітин. Вісник проблем біології і медицини. 2015;3(1):160-4.

224. Skybina KP, Chub OV, Prokopyuk VYu, Shevchenko MV. Placental factors protects neural cells from glutamate-induced toxicity. In: Topical issues of new drugs development. Abstracts of XXIII International Scientific And Practical Conference Of Young Scientists And Student in 2 vol. Vol.2. 2016 April 21; Kharkiv. Kharkiv: Publishing Office NUPh; 2016, p. 106.

225. Прокопюк ВЮ, Чуб ОВ, Шевченко МА. Глутаматна ексайтотоксичність як метод вибору оцінки нейропротекторної дії лікарських препаратів in vitro. В: Тези доповідей VII Національного конгресу патофізіологів України з міжнародною участю Патофізіологія і фармація: шляхи інтеграції. 2016 Жовт 5-7; Харків. Харків: Вид-во НФаУ; 2016, с. 187.

226. Prokopiuk VYu, Musatova IB, Shevchenko MV, Shevchenko NO, Prokopiuk OS, Chub OV. Placental MSCs, explants,extract protect neural cells against glutamate-induced toxicity. In: Program and Abstract Book 8th International Symposium on Experimental and Clinical Neurobiology. 2017 June 18-21; Kosice, Slovakia. Kosice; 2017, p. 72.

227. Chub OV, Shevchenko MV, Prokopyuk VY. Neuroprotective effect of placental factors in model of glutamate induced toxicity in newborn rat brain cells. Problems of Cryobiology and Cryomedicine. 2016;26(2):176.

228. Bravo-San Pedro JM, Senovilla L. Immunostimulatory activity of lifespan-

extending agents. Aging (Albany NY). 2013 Nov;5(11):793-801.

229. Harrison DE, Strong R, Allison DB, Ames BN, Astle CM, Atamna H et al. Acarbose, 17-α-estradiol, and nordihydroguaiaretic acid extend mouse lifespan preferentially in males. Aging Cell. 2014 Apr;13(2):273-82. doi: 10.1111/acel.12170.

230. Kumar S, Lombard DB. Finding Ponce de Leon's Pill: Challenges in Screening for Anti-Aging Molecules. F1000Res. 2016 Mar 29;5. pii: F1000 Faculty Rev-406. doi: 10.12688/f1000research.7821.1.

231. Прокопюк ОС, Прокопюк ВЮ. Использование криоконсервированных препаратов плаценты для коррекции возрастных изменений. В: Матеріали конф. Актуальні питання геронтології та геріатрії, присвяченій пам’яті В.В. Фролькіса; 2013 Січ 25. Київ. Київ; 2013, с.48.

232. Прокопюк ОС, Прокопюк ВЮ, Карпенко ВГ. Плацентарная терапия гериатрических изменений репродуктивной функции. В: Сборник тезисов и программа V Всероссийского симп. с междунар. уч. Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии; 2012 Май 17-18. Уфа. Уфа, с.185-6.

233. Анисимов ВН. Молекулярные и физиологические механизмы старения. 2-е изд., перераб. и доп. СПб: Наука; 2008. 481 с.

234. Farhat MY, Lavigne MC, Ramwell PW. The vascular protective effects of estrogen. FASEB J. 1996;10(5):615-24.

235. Mendelsohn ME. Protective effects of estrogen on the cardiovascular system. Am J Cardiol. 2002;20(12):12-8.

236. Menopause: Full Guideline. National Collaborating Centre for Women's and Children's Health (UK). London: National Institute for Health and Care Excellence (UK); 2015 Nov 12 (NICE Guideline, No. 23). [Internet, cited 2019 Feb 19]. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK327156/.

237. WHO World Health Statistics [Internet, cited 2019 Feb 19]. Available from: https://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/en/.

238. Chub OV, Prokopiuk VY, Musatova IB, Prokopiuk OS. Placental factors can increase lifespan and healthspan in mice. В: Збірник наукових публікацій I

всеукраїнського конкурсу наукових робіт студентів та молодих вчених медико-фармацевтичного профілю. 2017 Лют 17; Київ. Київ; 2017. с. 43-4.

239. Чуб ОВ, Прокопюк ВЮ, Мусатова ІБ, Прокопюк ОС. Кріоконсервовані експланти плаценти підвищують тривалість життя самців і знижують імовірність смерті самиць в репродуктивний період. В: Тези доповідей XIV Міжнародної наук. конф. студентів, аспірантів, докторантів, молодих вчених та фахівців Актуальні питання сучасної медицини; 2017 Бер 30-31; Харків. Харків; 2017, с. 88-9.

240. Чуб ОВ, Прокопюк ВЮ, Мусатова ИБ, Прокопюк ОС. Влияние имплантации криоконсервированных эксплантов плаценты на продолжительность и качество жизни (экспериментальное исследование). Проблемы криобиологии и криомедицины. 2017;27(2):184.

241. Прокопюк ВЮ, Чуб ОВ, Шевченко НО, Фалько ОВ, Мусатова ИБ, Лазуренко ВВ, Тищенко АН, Прокопюк ОС. Криоконсервированные экспланты плаценты увеличивают продолжительность жизни мышей-самцов и изменяют показатели выживаемости мышей-самок. Проблемы криобиологии и криомедицины. 2017;27(2):143-50.

242. Colleoni F, Morash AJ, Ashmore T, Monk M, Burton GJ, Murray AJ. Cryopreservation of placental biopsies for mitochondrial respiratory analysis. Placenta. 2012 Feb;33(2):122-3. doi: 10.1016/j.placenta.2011.11.019.

243. Garrod A, Batra G, Ptacek I, Heazell AE. Duration and method of tissue storage alters placental morphology – implications for clinical and research practice. Placenta. 2013 Nov;34(11):1116-9. doi: 10.1016/j.placenta.2013.07.067.

244. Pipino C, Shangaris P, Resca E, Zia S, Deprest J, Sebire NJ et al. Placenta as a reservoir of stem cells: an underutilized resource. Br Med Bull. 2013;105:43-68. doi: 10.1093/bmb/lds033.

245. Silini AR, Cargnoni A, Magatti M, Pianta S, Parolini O. The Long Path of Human Placenta, and Its Derivatives, in Regenerative Medicine. Front Bioeng Biotechnol. 2015 Oct 19;3:162. doi: 10.3389/fbioe.2015.00162.

246. Mahncke HW, Bronstone A, Merzenich MM. Brain plasticity and functional

losses in the aged: scientific bases for a novel intervention. Prog Brain Res. 2006;157:81-109.

247. Mongiat LA, Schinder AF. Adult neurogenesis and the plasticity of the dentate gyrus network. Eur. J. Neurosci. 2011;33(6):1055-61.

248. Glisky EL. Changes in Cognitive Function in Human Aging. In: Riddle DR, editor. Brain Aging: Models, Methods, and Mechanisms. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2007. Chapter 1. [Internet, cited 2019 Feb 19]. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK3885/.

249. Goh JO, Park DC. Neuroplasticity and cognitive aging: the scaffolding theory of aging and cognition. Restor Neurol Neurosci. 2009;27(5):391-403. doi: 10.3233/RNN-2009-0493.

250. Penner MR, Roth TL, Barnes CA, Sweatt JD. An epigenic Hypothesis of Aging-Related Cognitive Dysfunction, Front Aging Neurosci. 2010 Mar 12;2:9. doi: 10.3389/fnagi.2010.00009.

251. Coras R, Siebzehnrubl FA, Pauli E, Huttner HB, Njunting M, Kobow K, et al. Low proliferation capacities of adult hippocampal stem cells correlate with memory dysfunction in humans. Brain. 2010 Nov;133(11):3359-72. doi: 10.1093/brain/awq215.

252. Drapeau E, Nora Abrous D. Stem cell review series: role of neurogenesis in age-related memory disorders. Aging Cell. 2008 Aug;7(4):569-89. doi: 10.1111/j.1474-9726.2008.00369.x.

253. Nikolova S, Stark SM, Stark CEL. 3T hippocampal glutamate-glutamine complex reflects verbal memory decline in aging. Neurobiol Aging. 2017 Jun;54:103-111. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2017.01.026.

254. Malberg JE, Eisch AJ, Nestler EJ, Duman RS. Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus, J Neurosci. 2000 Dec 15;20(24):9104-10.

255. Geribaldi-Doldán N, Flores-Giubi E, Murillo-Carretero M, García-Bernal F, Carrasco M, Macías-Sánchez AJ et al. 12-Deoxyphorbols Promote Adult Neurogenesis by Inducing Neural Progenitor Cell Proliferation via PKC Activation.

Int J Neuropsychopharmacol. 2015 Jul 29;19(1). pii: pyv085. doi: 10.1093/ijnp/pyv085.

256. Mochizuki N, Moriyama Y, Takagi N, Takeo S, Tanonaka K. Intravenous injection of neural progenitor cells improves cerebral ischemia-induced learning dysfunction. Biol. Pharm. Bull. 2011;34(2):260-5. doi: 10.1248/bpb.34.260.

257. Hill AS, Sahay A, Hen R. Increasing Adult Hippocampal Neurogenesis is Sufficient to Reduce Anxiety and Depression-Like Behaviors. Neuropsychopharmacology. 2015 Sep;40(10):2368-78. doi: 10.1038/npp.2015.85.

258. Nibuya M, Morinobu S, Duman RS. Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments. J Neurosci. 1995;15(11):7539-47.

259. Bull ND, Bartlett PF. The adult mouse hippocampal progenitor is neurogenic but not a stem cell. J Neurosci. 2005 Nov 23;25(47):10815-21.

260. Августинович ДФ, Коваленко ИЛ. Формирование патологии поведения у самок мышей линии C57BL/6J под влиянием длительного психоэмоционального воздействия. Рос физиол журн им ИМ Сеченова. 2004;90(11):1324-36.

261. Мельников АВ, Куликов МА, Новикова МР, Шарова ЕВ. Выбор показателей поведенческих тестов для оценки типологических особенностей поведения крыс. Журн высшей нерв деят. 2004;54(5):712-7.

262. Russe PA. Relationships between exploratory behaviour and fear: a review. Brit J Psychol. 1973;64:417-33.

263. Carobrez A, Bertoglio L. Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on. Neurosci Biobehav Rev. 2005;29(8):1193-205.

264. Мусатова ИБ, Чуб ОВ, Прокопюк ВЮ, Прокопюк ОС, Фалько ОВ, Шевченко НА. Структура поведения мышей позднего онтогенеза после имплантации криоконсервированных эксплантов плаценты. В: Материалы VIII международной науч.-практ. конф. Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине. Проблемы развития

высоких технологий, том 1; 2015 май 20-22; Санкт-Петербург (Россия); 2015, с. 84-7.

265. Musatova IB, Volina VV, Chub OV, Prokopyuk VYu, Prokopyuk OS. Effects of Implantation of Cryopreserved Placental Explants on the Behavioral Indices and Morphological Characteristics of the Cerebral Structures in Senescent Mice. Neurophysiology. 2017 Oct;49(5):363-71.

266. Чуб ОВ, Прокопюк ВЮ, Прокопюк О., Мусатова ІБ, Шевченко МВ. Кріоконсервовані плацентарні біопрепарати в профілактиці і корекції дисфункції ЦНС в пізньому онтогенезі (експериментальне дослідження). В: Матеріали VI Національного конгресу геронтологів і геріатрів України. Проблемы старения и долголетия, том 25; 2016 Жовт 19-21; Київ. Київ; 2016, с. 44.

267. Чуб ОВ, Мусатова ІБ, Прокопюк ВЮ, Карпенко ВГ. Адаптаційні можливості організму мишей пізнього онтогенезу після імплантації кріоконсервованих експлантів плаценти. В: Матеріали наук.-практ. конф. Стратегії профілактики неінфекційних хвороб та шляхи їх реалізації: від постулатів минулого в майбутнє; 2016 Листоп 4; Харків. Харків; 2016, с.240.

268. Чуб ОВ, Мусатова ІБ, Прокопюк ВЮ, Карпенко ВГ. Влияние имплантации криоконсервированных эксплантов плаценты на структуру поведения самок мышей позднего онтогенеза. Проблемы криобиологии и криомедицины. 2015;25(2):192.

269. Зорина ЗА, Полетаева ИИ, Резникова ЖИ. Основы этологии и генетики поведения. Москва: Высшая школа; 2002. 383 с.

270. Мороз МП, Удалова ГП, Захаров АВ. Межполушарная асимметрия при изменениях функционального состояния человека. Физиология человека. 1986;12(2):179-86.

271. Громов ЛА, Евтушенко ОА, Танасова ИН. Межполушарная психофармакология. Журнал АМН України. 2007;13(2):346-53.

272. Карантыш ГВ, Менджерицкий АМ. Роль латерального профиля на выработку условной реакции активного избегания и свободнорадикальные

процессы в мозге крыс. Fundamental research. 2013;4:646-9.

273. Клименко ЛЛ. Динамика показателей энергетического метаболизма коры больших полушарий головного мозга в позднем онтогенезе крыс. Известия АН. Сер биол. 2001;2:213-9.

274. Руководство по функциональной межполушарной асимметрии. Москва: Научный мир; 2009. 836 с.

275. Боголепов НН, Фокин ВФ, редакторы. Функциональная межполушарная асимметрия: Хрестоматия. Москва: Научный мир; 2004. Черноситов АВ, Орлов ВИ. Функциональная асимметрия и неспецифическая резистентность; с.444-80.

276. Рахимов РН, Рахимова НН, Хакман ПЮ, Риандур АВ. Асимметрия пула свободных аминокислот в некоторых участках мозга. Бюлл эксп биол и мед. 1989;107(6):676-8.

277. Larisch R, Meyer W, Klimke A, Kehren F, Vosberg H, Müller-Gärtner HW. Left-right asymmetry of striatal dopamine D2 receptors. Nucl Med Commun. 1998 Aug;19(8):781-7.

278. Guarneri P, Guarneri R, La Bella V, Scondotto S, Scoppa F, Piccoli F. Lateral differences in GABA binding sites in rat brain. Neurochem Res. 1988;13:209-11.

279. Lalonde R. The neurobiological basis of spontaneous alternation. Neurosci Biobehav Rev. 2002 Jan;26(1):91-104.

280. Боголепов НН, Фокин ВФ, редакторы. Функциональная межполушарная асимметрия: Хрестоматия. Москва: Научный мир; 2004. Фокин ВФ, Пономарева НВ. Динамические характеристики функциональной межполушарной асимметрии; с.349-68.

281. Черноситов АВ. Неспецифическая резистентность, функциональные асимметрии и женская репродукция. Ростов-на-Дону: СКНЦ ВШ; 2000. 199 с.

282. Левшина ИП, Мац ВН, Пасикова НВ, Шуйкин НН. Сопоставление поведения крыс после длительной иммобилизации со структурными изменениями в моторной коре и гиппокампе. Журн высшей нерв деят. 2010;60(2):184-91.

283. Васильев ЮГ, Чучков ВМ. Нейро-глио-сосудистые отношения в

центральной нервной системе (морфологическое исследование с элементами морфометрического и математического анализа. Ижевск.: Изд-во АНК; 2003. 164 с.

284. Гомазков ОА. Эндотелий в кардиологии: молекулярные, физиологические и патологические аспекты. Кардиология. 2001;2:50-8.

285. Мотавкин ПА, Ломакин АВ, Черток ВМ. Капилляры головного мозга. Владивосток; 1983. 140 с.

286. Микроциркуляция: Сборник. Москва – Ярославль; 1997. Турина ОЮ, Куприянов ВВ, Васильев ЮГ, Башмаков АА. Морфология сосудистого эндотелия; с.18-23.

287. Осадчий ЛИ, Балуева ТВ, Сергеев ИВ. Механизмы формирования реакций системного кровообращения: роль эндотелиального фактора регуляции тонуса кровеносных сосудов. Известия АН. Сер биол. 2004;3:335-9.

288. Deltheil T, Tanaka K, Reperant C, Hen R, David DJ, Gardier AM. Synergistic neurochemical and behavioural effects of acute intrahippocampal injection of brain-derived neurotrophic factor and antidepressants in adult mice. Int J Neuropsychopharmacol. 2009 Aug;12(7):905-15.

289. Clarkson AN, Overman JJ, Zhong S, Mueller R, Lynch R, Carmichael ST. AMPA receptor-induced local brain-derived neurotrophic factor signaling mediates motor recovery after stroke. J Neurosci. 2011;31:3766-75

290. Гайдукова СМ, редактор. Нове в гематології та трансфузіології: Міжнар. наук.-практ. зб. Київ. мед. акад. післядиплом. освіти ім. П.Л.Шупика МОЗ України. Вип. 1. Київ; 2004. Гайдукова СМ, Видиборець СВ, Попович ЮЮ. Цитокіни. Лекція 1. Біологічні функції цитокінів; с.9-23.

291. Andres RH, Choi R, Pendharkar AV, Gaeta X, Wang N, Nathan JK et al. The CCR2/CCL2 interaction mediates the transendothelial recruitment of intravascularly delivered neural stem cells to the ischemic brain. Stroke. 2011 Oct;42(10):2923-31. doi: 10.1161/STROKEAHA.110.606368.

292. McCullough LD, Hurn PD. Estrogen and ischemic neuroprotection: an integrated view. Trends Endocrinol Metab. 2003;14:228-35.

293. Zhao L, Brinton RD. Select estrogens within the complex formulation of conjugated equine estrogens (Premarin ®) are protective against neurodegenerative insults: implications for a composition of estrogen therapy to promote neuronal function and prevent Alzheimer's disease. BMC Neurosci. 2006 Mar 13;7:24.

294. Barnstable CJ, Reddy R, Li H, Horvath TL. Mitochondrial Uncoupling Protein 2 (UCP2) Regulates Retinal Ganglion Cell Number and Survival. J Mol Neurosci. 2016;58(4):461-9. doi: 10.1007 / s12031-016-0728-5.

295. Spencer B, Potkar R, Metcalf J, Thrin I, Adame A, Rockenstein E, Masliah E. Systemic Central Nervous System (CNS)-targeted Delivery of Neuropeptide Y (NPY) Reduces Neurodegeneration and Increases Neural Precursor Cell Proliferation in a Mouse Model of Alzheimer Disease. J Biol Chem. 2016;291(4):1905-20. doi:10.1074/jbc.M115.678185.

296. Peng S, Zhou YL, Song ZY, Lin S. Effects of Neuropeptide Y on Stem Cells and Their Potential Applications in Disease Therapy. Stem Cells Int. 2017;2017:6823917. doi:10.1155/2017/6823917.

297. Baptista S, Bento AR, Gon3alves J, Bernardino L, Summavielle T, Lobo A. et al. Neuropeptide Y promotes neurogenesis and protection against methamphetamine-induced toxicity in mouse dentate gyrus-derived neurosphere cultures. Neuropharmacology. 2012 Jun;62(7):2413-23. doi: 10.1016/j.neuropharm.2012.02.015.

298. CorvinoV, Marchese E, Podda MV, Lattanzi W, Giannetti S, Di Maria V et al. The neurogenic effects of exogenous neuropeptide Y: early molecular events and long-lasting effects in the hippocampus of trimethyltin-treated rats. PLoS ONE. [Internet]. 2014 [cited 2016 Feb 20]; 9:e88294. Available from: https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0088294.

299. Han J, Pollak J, Yang T, Siddiqui MR, Doyle KD, Taravosh-Lahn K et al. A small molecule TrkB ligand promotes recovery when started 3 days after stroke. Stroke. 2012;43:1918-24.

300. Li W, Bellot-Saez A, Phillips ML, Yang T, Longo FM, Pozzo-Miller L. A small-molecule TrkB ligand restores hippocampal synaptic plasticity and object location

memory in Rett syndrome mice. Dis Model Mech. 2017 Jul 1;10(7):837-45.

301. Прокопюк ВЮ, Мусатова ИБ, Чуб ОВ, Прокопюк ОС, Воліна ВВ, винахідники; Інститут проблем кріобіології та кріомедицини НАН України, патентовласник. Спосіб лікування когнітивних порушень при дисциркуляторній енцефалопатії в постменопаузі. Патент України № 124910. 2018 Квіт 25.

302. Prokopyuk VYu, Falko OV, Musatova IB, Prokopyuk OS, Royenko OO, Terekhova EO, Chub OV. Low temperature preservation and storage of placental biological derivatives. Probl Cryobiol Cryomed. 2015; 25(4):291-311.

303. Лобов МА, Котов СВ, Рудакова ИГ. Патофизиологические, патогенетические и терапевтические аспекты хронической ишемии головного мозга. РМЖ. Неврология Психиатрия. [Internet]. 2002 [cited 2016 Feb 20];10(25): 1156. Available from: https://www.rmj.ru/archive/nevrologiya_psikhiatriya_4/.

304. Park SY, Marasini S, Kim GH, Ku T, Choi C, Park MY et al. A Method for Generate a Mouse Model of Stroke: Evaluation of Parameters for Blood Flow, Behavior, and Survival. Exp Neurobiol. 2014 Mar;23(1):104-14. doi:10.5607/en.2014.23.1.104.

305. Chen L, Shang Y, Sipos E, Saatman KE, Yu G, Toborek M. Novel experimental model for repeated forebrain ischemia-reperfusion J Exp Stroke Transl Med [Internet]. 2012 [cited 2016 Feb 20]; 5(1): 1-10. Available from: https://www.openaccessjournals.com/articles/novel-experimental-model-for repeated-forebrain-ischemiareperfusion.pdf

306. Моргун АВ, Кувачева НВ, Таранушенко ТЕ, Хилажева ЕД, Малиновская НА, Горина ЯВ и др. Современные представления о патогенезе перинатального ишемического повреждения клеток нейроваскулярной единицы головного мозга: молекулы мишени для нейропротекции. Вестник Российской академии медицинских наук. 2013;68(12):26-35. doi:10.15690/vramn.v68i12.856.

307. Poggesi A, Pasi M, Pescini F, Pantoni L, Inzitari D. Circulating biologic markers of endothelial dysfunction in cerebral small vessel disease: A review. J Cereb Blood Flow Metab. 2016 Jan;36(1):72-94.

308. Боголепова АН, Чуканова ЕИ. Проблема нейропластичности в неврологии. Журн неврол и психиатр. 2010;110(8):72-5.

309. Гомазков ОА. Апоптоз нейрональных структур и роль нейротрофических факторов: биохимические механизмы эффективности пептидных препаратов мозга. Журн неврол и психиатр: прил. Инсульт. 2002;7:17-21.

310. Alonso M, Bekinschtein P, Cammarota M. Endogenous BDNF is required for long-term memory formation in the rat parietal cortex. Learn Mem. 2005;12:504-10.

311. Товажнянская ЕЛ, Соловьева ЕТ, Лапшина ИА, Ярош ВА. Возможности коррекции сосудистых когнитивных нарушений препаратами комбинированного ноотропного и вазоактивного действия. Міжнародний неврологічний журнал. 2017;2:33-7.

312. Исламов РР, Валиуллин ВВ, Мурашов АК. Механизмы нейропротекторного действия эстрогенов, связанные с экспрессией сосудистого эндотелиального фактора роста. Известия РАН. Серия биол. 2007;2:145-56.

ДОДАТОК А

Список публікацій здобувача за темою дисертації.

Статті у фахових журналах

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

Статті та тези в матеріалах наукових конференцій, Національних конгресів

6. Мусатова И. Б., **Чуб О. В.**, Прокопюк В. Ю., Прокопюк О .С., Фалько О. В., Шевченко Н. А. Структура поведения мышей позднего онтогенеза после

имплантации криоконсервированных эксплантов плаценты. *Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине: материалы VIII международной науч.-практ. конф. Санкт-Петербург (Россия), 20-22 мая 2015 года. Проблемы развития высоких технологий.* 2015**.** Т.1 С. 84–87.

7. **Чуб О. В.**, Мусатова И. Б., Прокопюк В. Ю., Карпенко В. Г. Влияние имплантации криоконсервированных эксплантов плаценты на структуру поведения самок мышей позднего онтогенеза. *Холод в біології та медицині: матеріали 39-ої щорічної конференції молодих вчених, м. Харків, 20-21 травня 2015 р. Проблемы криобиологии и криомедицины.* 2015. Т. 25. № 2. С. 192. *(Scopus)*.
8. **Чуб О. В.**, Шевченко М. А., Прокопюк В. Ю. Нейропротекторный эффект факторов плацентарного происхождения в модели глутамат-индуцированной токсичности клеток головного мозга новорожденных крыс. *Холод в біології та медицині: матеріали 40-ої щорічної конференції молодих вчених, м. Харків, 23-24 травня 2016 р. Проблемы криобиологии и криомедицины*. 2016. Т. 26. № 2. С. 176. *(Scopus)*.
9. **Чуб О. В.**, Прокопюк В. Ю., Прокопюк О. С., Мусатова І. Б., Шевченко М. В. Кріоконсервовані плацентарні біопрепарати в профілактиці і корекції дисфункції ЦНС в пізньому онтогенезі (експериментальне дослідження). *Матеріали VI Національного конгресу геронтологів і геріатрів України, м. Київ, 19-21 жовтня 2016 р. Проблемы старения и долголетия.* 2016. Т.25. С. 44.
10. **Чуб О. В.**, Прокопюк В. Ю., Мусатова И. Б., Прокопюк О. С. Влияние имплантации криоконсервированных эксплантов плаценты на продолжительность и качество жизни (экспериментальное исследование) *Холод в біології та медицині: матеріали 41-ої щорічної конференції молодих вчених, м. Харків, 24-25 травня 2017 р. Проблемы криобиологии и криомедицины.* 2017. Т. 27. № 2. С. 184. *(Scopus)*.

11. Skybina K. P., **Chub O. V.**, Prokopyuk V. Yu., Shevchenko M. V. Placental factors protects neural cells from glutamate-induced toxicity *Topical issues of new drugs development: Abstracts of XXIII International Scientific And Practical Conference Of Young Scientists And Student, April 21, 2016, Kharkiv, in 2 vol*. Kh.: Publishing Office NUPh, 2016. Vol.2. P. 106.
12. Прокопюк В.Ю., **Чуб О.В.**, Шевченко М.А. Глутаматна ексайтотоксичність як метод вибору оцінки нейропротекторної дії лікарських препаратів *in vitro*. *Патофізіологія і фармація: шляхи інтеграції: тези доповідей VII Національного конгресу патофізіологів України з міжнародною участю, м. Харків, 5 – 7 жовтня 2016.* Харків: Вид-во НФаУ, 2016. С. 187.
13. **Чуб О. В.**, Мусатова І. Б., Прокопюк В. Ю., Карпенко В. Г. Адаптаційні можливості організму мишей пізнього онтогенезу після імплантації кріоконсервованих експлантів плаценти. *Стратегії профілактики неінфекційних хвороб та шляхи їх реалізації: від постулатів минулого в майбутнє: матеріали наук.-практ. конференції за участю міжнародних спеціалістів, м. Харків, 4 листопада 2016 р.* Харків, 2016. С.240.
14. **Chub O. V.**, Prokopiuk V. Yu., Musatova I. B., Prokopiuk O. S. Placental factors can increase lifespan and healthspan in mice. *Збірка наукових публікацій І всеукраїнського конкурсу наукових робіт студентів та молодих вчених медико-фармацевтичного профілю, м. Київ, 17 лютого 2017 р.* Київ, 2017. С. 43–44.
15. **Чуб О. В.**, Прокопюк В. Ю., Мусатова І. Б., Прокопюк О. С. Кріоконсервовані експланти плаценти підвищують тривалість життя самців і знижують імовірність смерті самиць в репродуктивний період. *Актуальні питання сучасної медицини: тези доповідей XIV Міжнародної наукової конференції студентів, аспірантів, докторантів, молодих вчених та фахівців, м. Харків, 30–31 березня 2017 р.* Харків, 2017. С. 88–89.
16. Prokopiuk V. Yu., Musatova I. B., Shevchenko M. V., Shevchenko N. O., Prokopiuk O. S., **Chub O. V**. Placental MSCs, explants,extract protect neural cells against glutamate-induced toxicity. *Program and Abstract Book 8th*

International Symposium on Experimental and Clinical Neurobiolog, Kosice, Slovakia, June 18 – 21, 2017. Kosice, 2017. P. 72.

Патент України на корисну модель

17. Спосіб лікування когнітивних порушень при дисциркуляторній енцефалопатії в постменопаузі: пат. 124910 Україна. (51) МПК A61K 35/16,) МПК A61P 25/28 / В. Ю. Прокопюк, І. Б. Мусатова, **О. В. Чуб**, О. С. Прокопюк, В. В. Воліна; заявник та патентовласник ІПК і К НАН України. № u201711312, заявл. 20.11.17. Опубл. 25.04.18. Бюл. № 8.

ДОДАТОК Б

Відомості про апробацію результатів дисертації.

1. Мусатова И. Б., **Чуб О. В.**, Прокопюк В. Ю., Прокопюк О .С., Фалько О. В., Шевченко Н. А. Структура поведения мышей позднего онтогенеза после имплантации криоконсервированных эксплантов плаценты. *Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине: материалы VIII международной науч.-практ. конф. Санкт-Петербург (Россия), 20-22 мая 2015 года. Проблемы развития высоких технологий.* 2015**.** Т.1 С. 84–87.
2. **Чуб О. В.**, Мусатова И. Б., Прокопюк В. Ю., Карпенко В. Г. Влияние имплантации криоконсервированных эксплантов плаценты на структуру поведения самок мышей позднего онтогенеза. *Холод в біології та медицині: матеріали 39-ої щорічної конференції молодих вчених, м. Харків, 20-21 травня 2015 р. Проблемы криобиологии и криомедицины.* 2015. Т. 25. № 2. С. 192. *(Scopus)*.
3. **Чуб О. В.**, Шевченко М. А., Прокопюк В. Ю. Нейропротекторный эффект факторов плацентарного происхождения в модели глутамат-индуцированной токсичности клеток головного мозга новорожденных крыс. *Холод в біології та медицині: матеріали 40-ої щорічної конференції молодих вчених, м. Харків, 23-24 травня 2016 р. Проблемы криобиологии и криомедицины*. 2016. Т. 26. № 2. С. 176. *(Scopus)*.
4. **Чуб О. В.**, Прокопюк В. Ю., Прокопюк О. С., Мусатова І. Б., Шевченко М. В. Кріоконсервовані плацентарні біопрепарати в профілактиці і корекції дисфункції ЦНС в пізньому онтогенезі (експериментальне дослідження). *Матеріали VI Національного конгресу геронтологів і геріатрів України, м. Київ, 19-21 жовтня 2016 р. Проблемы старения и долголетия.* 2016. Т.25. С. 44.
5. **Чуб О. В.**, Прокопюк В. Ю., Мусатова И. Б., Прокопюк О. С. Влияние имплантации криоконсервированных эксплантов плаценты на

продолжительность и качество жизни (экспериментальное исследование) *Холод в біології та медицині: матеріали 41-ої щорічної конференції молодих вчених, м. Харків, 24-25 травня 2017 р. Проблемы криобиологии и криомедицины.* 2017. Т. 27. № 2. С. 184. *(Scopus)*.

6. Skybina K. P., **Chub O. V.**, Prokopyuk V. Yu., Shevchenko M. V. Placental factors protects neural cells from glutamate-induced toxicity *Topical issues of new drugs development: Abstracts of XXIII International Scientific And Practical Conference Of Young Scientists And Student, April 21, 2016, Kharkiv, in 2 vol*. Kh.: Publishing Office NUPh, 2016. Vol.2. P. 106.
7. Прокопюк В.Ю., **Чуб О.В.**, Шевченко М.А. Глутаматна ексайтотоксичність як метод вибору оцінки нейропротекторної дії лікарських препаратів *in vitro*. *Патофізіологія і фармація: шляхи інтеграції: тези доповідей VII Національного конгресу патофізіологів України з міжнародною участю, м. Харків, 5 – 7 жовтня 2016.* Харків: Вид-во НФаУ, 2016. С. 187.
8. **Чуб О. В.**, Мусатова І. Б., Прокопюк В. Ю., Карпенко В. Г. Адаптаційні можливості організму мишей пізнього онтогенезу після імплантації кріоконсервованих експлантів плаценти. *Стратегії профілактики неінфекційних хвороб та шляхи їх реалізації: від постулатів минулого в майбутнє: матеріали наук.-практ. конференції за участю міжнародних спеціалістів, м. Харків, 4 листопада 2016 р.* Харків, 2016. С.240.
9. **Chub O. V.**, Prokopiuk V. Yu., Musatova I. B., Prokopiuk O. S. Placental factors can increase lifespan and healthspan in mice. *Збірка наукових публікацій I всеукраїнського конкурсу наукових робіт студентів та молодих вчених медико-фармацевтичного профілю, м. Київ, 17 лютого 2017 р.* Київ, 2017. С. 43–44.
10. **Чуб О. В.**, Прокопюк В. Ю., Мусатова І. Б., Прокопюк О. С. Кріоконсервовані експланти плаценти підвищують тривалість життя самців і знижують імовірність смерті самиць в репродуктивний період. *Актуальні питання сучасної медицини: тези доповідей XIV Міжнародної наукової конференції студентів, аспірантів, докторантів, молодих вчених та фахівців, м. Харків, 30–31 березня 2017 р.* Харків, 2017. С. 88–89.

11. Prokopiuk V. Yu., Musatova I. B., Shevchenko M. V., Shevchenko N. O., Prokopiuk O. S., **Chub O. V**. Placental MSCs, explants,extract protect neural cells against glutamate-induced toxicity. *Program and Abstract Book 8th International Symposium on Experimental and Clinical Neurobiolog, Kosice, Slovakia, June 18 – 21, 2017.* Kosice, 2017. P. 72.