

©В. Ю. Прокопюк¹, М. В. Шевченко¹, О. С. Прокопюк¹, І. Б. Мусатова¹, К. Ю. Смоляник², О. В. Чуб¹*Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків¹
Харківська медична академія післядипломної освіти²***ОЦІНКА МОЖЛИВОСТІ КОРОТКОТРИВАЛОГО ЗБЕРІГАННЯ ЕКСПЛАНТІВ ПЛАЦЕНТИ ДЛЯ РЕГЕНЕРАТИВНОЇ МЕДИЦИНИ**

Резюме. Клітини, тканини, біологічно активні речовини плаценти є перспективними об'єктами для ефективного лікування патологічних станів ендокринної, імунної та нервової систем. Для клінічного застосування похідних плаценти необхідна розробка методів їх короткотривалого зберігання і транспортування від клініки до біотехнологічної лабораторії та в зворотному напрямку.

Мета дослідження – визначити можливості субнормотермічного (+20 °С) та гіпотермічного (+4 °С) зберігання експлантів плаценти в середовищі культивування для клінічного використання у регенеративній медицині.

Матеріали і методи. Експланти отримували з плацент після кесаревого розтину. Зберігали в культуральному середовищі при гіпотермічних та субнормотермічних умовах протягом 96 год. Кожен 24 год гістологічно оцінювали структуру експлантів, метаболічні характеристики за даними тестів відновлення резазурину, МТТ, тесту споживання глюкози.

Результати досліджень та їх обговорення. Виявлено, що при субнормотермічних умовах експланти плаценти зберігають структуру, життєздатність та метаболічні характеристики 48 год, при гіпотермічних умовах термін збереження знижується до 24 год. Типовими ураженнями є зменшення ворсин та міжворсинчастих просторів, відшарування трофобласта. Розроблено рекомендації до їх короткотривалого зберігання.

Висновки. Визначено, що транспортування (транспортування) експлантів плаценти в субнормотермічних умовах до 48 год у культуральному середовищі забезпечує збереження властивостей експлантів і зумовлює ефективність їх клінічного використання.

Ключові слова: регенеративна медицина; експланти; плацента; субнормотермія; гіпотермія; біотехнології.

ВСТУП Клітини, тканини, біологічно активні речовини плаценти все більше застосовуються в клітинній та тканинній терапії. Перевагами похідних плаценти є наявність стовбурових клітин, можливість отримання великої кількості матеріалу, відсутність етичних проблем, висока проліферативна активність, низька імуногенність. Результати експериментальних і клінічних досліджень показали ефективність застосування похідних плаценти при цукровому діабеті, виразках, опіках, нейропатіях, безплідді, передчасному виснаженні яєчників, клімактеричному синдромі. Механізм дії похідних плаценти пов'язують з наявністю у них стовбурових клітин та комплексу біологічно активних речовин, які відповідають першим хвилинам життя людини, забезпечують розвиток, становлення, а також відновлення органів, систем і організму в цілому [1–3].

Отримання плаценти відбувається в пологовому будинку, виготовлення біопрепаратів – у біотехнологічній лабораторії, а застосування методів клітинної та тканинної терапії – в спеціалізованій клініці. На сьогодні нестача технологій зберігання призводить до того, що значна частина біоматеріалу не може бути використана для трансплантації. Традиційні методи зберігання біоматеріалу передбачають використання кріотехнологій із застосуванням рідкого азоту чи безперервної перфузії відновлювальними розчинами, що потребує складного обладнання, ультранизьких температур або постійного фармакологічного навантаження [4, 5]. Тому для клінічного застосування похідних плаценти необхідне удосконалення методів їх зберігання і транспортування від клініки до біотехнологічної лабораторії та в зворотному напрямку.

Результати сучасних досліджень субнормотермічний (+20 °С) та гіпотермічний (+4 °С) режими визначили такими, що забезпечують короткотривалі терміни збереження вітальності для ряду органів і тканин, а також є технічно достатньо простими для використання в клініці [6–8]. Проте придатність таких режимів для збереження плацентарних структур не доведена.

Метою дослідження було визначити можливості субнормотермічного та гіпотермічного зберігання експлантів плаценти в середовищі культивування для клінічного використання у регенеративній медицині.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ Дослідження було проведено в рамках НДР “Дослідження геропротекторної та геротерапевтичної дії плацентарних біооб'єктів” (ДР № 0114U00131).

Плаценти отримували з інформованої згоди жінок після кесаревого розтину. Експланти плаценти (360 зразків) брали після її відмивання шляхом фрагментації плаценти до окремих ворсин завдовжки 3 мм. Експланти зберігали 96 год у середовищі DMEM із високим вмістом глюкози, L-глутаміном та піруватом (“BioWest”, Франція) у поліпропіленових пробірках, використовуючи 10 мл середовища на 1 г експлантів при субнормотермічних (+20 °С) та гіпотермічних (+4 °С) умовах. Для оцінки метаболічної активності експлантів плаценти кожні 24 год проводили МТТ-тест, тест відновлення резазурину, поглинання глюкози. Частина експлантів фіксували в 10 % формальдегіді для проведення гістологічного дослідження. Позитивним контролем слугували свіжовиділені експланти, негативним – експланти, девіталізовані 96 % етанолом.

Експланти інкубували 4 год в 12-лункових планшетах у середовищі, ідентичному за складом зберігання середовищу, з додаванням МТТ (“Sigma”, США) в кінцевій концентрації 0,5 мг/мл у CO₂-інкубаторі (Thermo Fisher Scientific, США) при 37 °С в атмосфері з 5 % CO₂. На 10 мг експлантів застосовували 1 мл середовища. Після інкубування середовище відбирали, формазан екстрагували 96 % етанолом та вимірювали абсорбцію на спектрофотометрі PV 1251C (“Solar”, Білорусь) при довжині хвилі 570 нм.

Тест відновлення резазурину проводили аналогічним способом, резазурин (“Sigma”, США) додавали в кінцевій концентрації 0,15 мг/мл, інкубували 24 год. Оптичну щільність вимірювали на спектрофотометрі PV 1251C (“Solar”, Білорусь) при довжині хвилі 590 нм.

Визначення поглинання глюкози з живильного середовища проводили за допомогою комерційного набору "Глюкоза Liquid 500 C" (Erba Lachema s.r.o, Чехія) відповідно до інструкції виробника. Вимірювали оптичну щільність середовища інкубування на спектрофотометрі PV 1251C ("Solar", Білорусь).

Для обробки зображень застосовували програмне забезпечення TourView V 3.7. (Hangzhou Touptek Photonics Co. Ltd, Hangzhou, China). Для отримання статистично вірогідних висновків застосовували U-критерій Манна-Уїтні, критерій Краскела-Уолліса. Для статистичних розрахунків та обробки даних використовували програмне забезпечення Past V. 3.15 (University of Oslo, Norway).

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У результаті аналізу отриманих даних виявлено, що збереження експлантів плаценти в субнормотермічних умовах протягом 1–2 діб не призводить до значного зниження показників метаболічної активності та поглинання глюкози з середовища (табл. 1).

При цьому великі кристали формазану мікроскопічно спостерігали в усіх біоструктурах експлантів. З третьої доби спостереження показники активності метаболізму експлантів відрізнялись від негативного контролю, але значно знижувались, невеликі кристали формазану виявлялися лише в окремих судинах ворсин.

При гістологічному дослідженні свіжовиділених експлантів плаценти, забарвлених гематоксиліном та еозинном, спостерігали типову структуру плацентарної тканини (рис. 1, А). Ворсини вкриті шаром синцитію з нормохромними ядрами, який подекуди формує синцитіальні вузлики. Під синцитієм – окремі скупчення клітин цитотрофобласта. Строму ворсин формує рихла ембріональна мезенхіма, в якій спостерігаються клітини сполучної тканини і макрофагальні елементи. В препаратах бувають вторинні та третинні ворсини, в яких наявні судини з еритроцитами.

Після зберігання експлантів плаценти протягом 24 год при субнормотермічних умовах загальна структура та форма ворсин зберігалася (рис. 1, Б). Шари трофобласту візуально зливалися, потовщувалися, але повністю вкривали ворсини, не відшаровуючись. Клітини мезенхіми чітко не диференціювалися за рахунок їх зближення. Помірно підвищувалася еозинофілія цитоплазми клітин та гетерохромія ядер. На другу добу інкубування експлантів плаценти в культуральному середовищі при +20 °C структура та форма ворсин в цілому залишалася незмінною, проте виявлялося розширення міжворсинних просторів, з'являлися окремі місця від-

шарування трофобласта (рис. 1, В). Через 72 год зберігання трофобласт чітко не диференціювався, відшаровувався від ворсин, спостерігалася деструкція ворсин, гіперхромія ядер, яка свідчить про пригнічення синтезу РНК (рис. 1, Г).

Таким чином, достатній рівень вітальності експлантів плаценти для застосування в регенеративній медицині зберігається до 48 год їх інкубування при +20 °C у культуральному середовищі (за даними гістологічного дослідження і визначення активності метаболізму).

Можливо припустити, що зниження температури зберігання експлантів плаценти до +4 °C дозволить подовжити термін їх збереження за рахунок пригнічення обмінних процесів.

Проте отримані результати дослідження свідчили про наступне: гіпотермія протягом 24 год не призводила до зміни показників МТТ-тесту та тесту поглинання глюкози експлантами плаценти. Водночас, за даними тесту відновлення резазурину через 24 год спостерігали негативну вірогідну різницю вимірюваного показника від показника позитивного контролю. Більш тривале інкубування експлантів при +4 °C призводило до порушень метаболізму, які можливо інтерпретувати як втрату їх вітальності (табл. 2).

При морфологічному дослідженні експлантів плаценти після 24 год зберігання в гіпотермічних умовах виявлено розширення міжворсинних просторів, потоншення трофобласта, зморщення мезенхіми з підвищеною еозинофілією. Ядра клітин були гіперхромні, що свідчить про зниження їх активності (рис. 2, А). При зберіганні експлантів у гіпотермічних умовах 48 год виявлено ознаки деструкції та десквамації трофобласта, подекуди він зливався з мезенхімою чи чітко не візуалізувався. Деструктивні зміни в мезенхімі прогресували, спостерігали її розриви (рис. 2, Б). При проведенні МТТ-тесту до моменту екстракції формазану його кристали були переважно в перисудинних скупченнях клітин. При зберіганні експлантів протягом 72 год в більшості ворсин не диференціювалися строма та трофобласт, не ідентифікувалися окремі структури, що свідчить про руйнування тканини.

Таким чином, гіпотермічні умови не є оптимальними для збереженості морфофункціонального стану експлантів плаценти та можуть бути застосовані лише в якості короткотривалого (до 24 год) зберігання при неможливості отримання субнормотермії.

Проведене дослідження дозволяє стверджувати, що можливе зберігання експлантів плаценти при суб-

Таблиця 1. Активність метаболізму експлантів плаценти після зберігання при субнормотермічних умовах +20 °C (M±m) (n=120)

Експериментальна група	Показник		
	МТТ-тест (Од. ОЩ)	тест відновлення резазурину (зменшення абсорбції, %)	тест поглинання глюкози (Ммоль/л)
Позитивний контроль	3,2±0,31	59,2±5,2	1,95±0,25
Негативний контроль	0,2±0,1	4,3±0,25	2,4±0,2
24 год	3,0±0,41*	58,2±0,24*	2,0±0,28*
48 год	2,9±0,28*	55,3±0,49*	2,1±0,21*
72 год	2,5±0,24**,**	40,2±0,43**,**	2,2±0,19**
96 год	1,2±0,34**,**	20,2±0,91**,**	2,3±0,4**

Примітки: 1) * – відмінності статистично достовірні відносно негативного контролю, p<0,05;

2) ** – відмінності статистично достовірні відносно позитивного контролю, p<0,05.

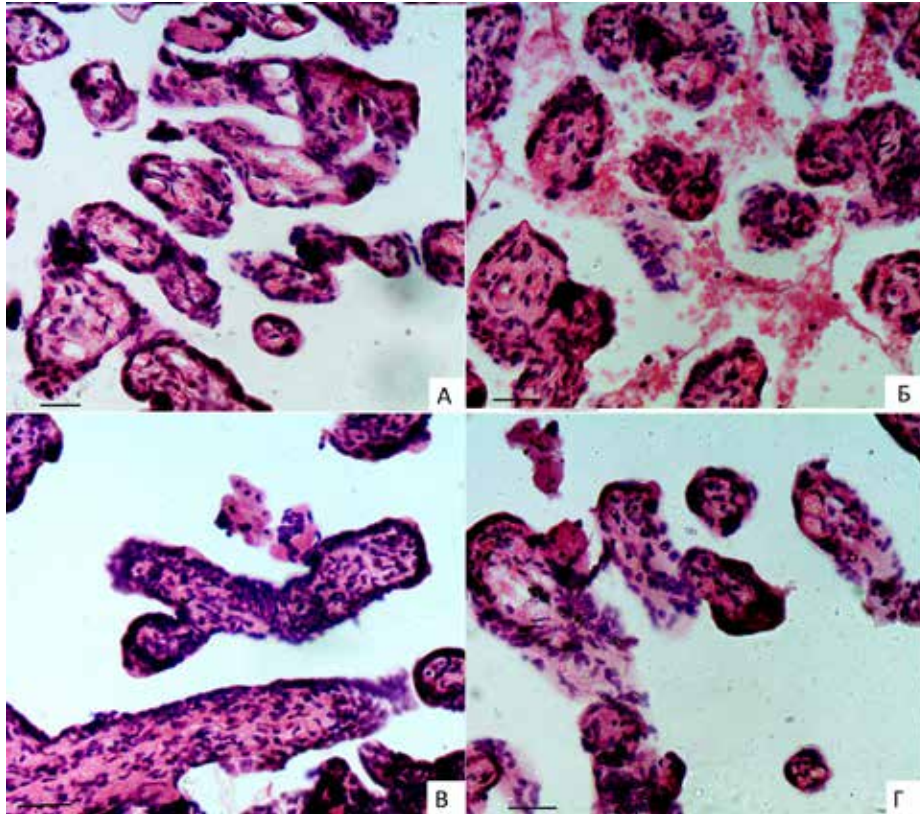


Рис. 1. Експланти плаценти – А – свіжовиділені; після зберігання протягом: Б – 24 год при +20 °С, В – 48 год при +20 °С, Г – 72 год при +20 °С. Забарвлення гематоксином та еозином. Масштабна лінійка – 20 мкм.

Таблиця 2. Активність метаболізму експлантів плаценти при гіпотермічних умовах зберігання (+4 °С) (M±m) (n=120)

Експериментальна група	Показник		
	МТТ-тест (Од. ОЩ)	тест відновлення резазурину (зменшення абсорбції, %)	тест поглинання глюкози (Ммоль/л)
Позитивний контроль	3,2±0,31	59,2±5,2	1,95±0,25
Негативний контроль	0,2±0,1	4,3±0,2	2,4±0,2
24 год	2,6±0,28*	45,3±0,51*,**	2,0±0,15*
48 год	1,5±0,32**,**	21,2±0,34*,**	2,2±0,23**
72 год	0,5±0,25**	6,2±0,23*	2,3±0,21**

Примітки: 1) * – відмінності статистично достовірні відносно негативного контролю, $p < 0,05$;
2) ** – відмінності статистично достовірні відносно позитивного контролю, $p < 0,05$.

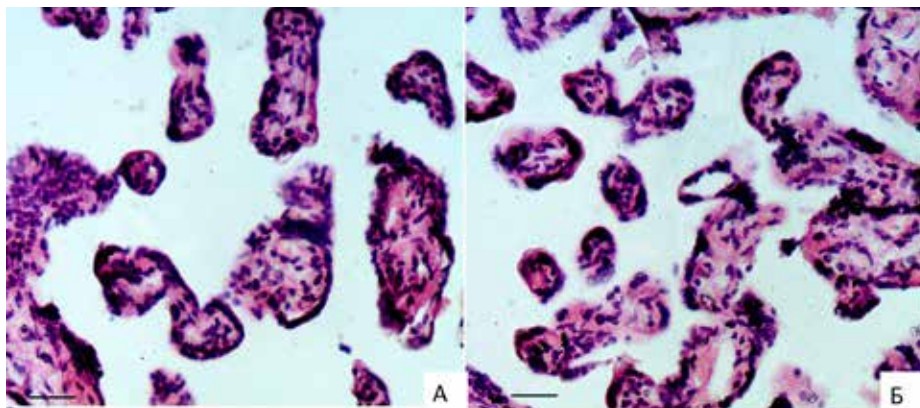


Рис. 2. Експланти плаценти – А – зберігання протягом 24 год при +4 °С, Б – зберігання протягом 48 год при +4 °С. Забарвлення гематоксином та еозином. Масштабна лінійка – 20 мкм.

нормотермічних умовах до 48 год без втрати метаболічних характеристик та порушень структури. Зберігання експлантів при +20 °C більш тривалий час, або зберігання при гіпотермічних умовах, призводить до їх руйнування. Це можна пояснити тим, що ферментні системи людини пристосовані до функціонування при +37 °C, а зниження температури до +4 °C є для них критичним, разом з тим, як субнормотермічні умови здатні підтримувати метаболізм на зниженому рівні, але достатньому для виживання. Ці дані співпадають із результатами, отриманими при дослідженні можливості гіпотермічного та субнормотермічного зберігання клітин плаценти [9].

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Placenta and placental derivatives in regenerative therapies: experimental studies, history, and prospects / O. Pogozhykh, V. Prokopyuk, C. Figueiredo, D. Pogozhykh // *Stem Cells International*. – 2018. – 4837930. doi: 10.1155/2018/4837930.
2. The long path of human placenta, and its derivatives, in regenerative medicine / A. R. Silini, A. Cargnoni, M. Magatti [et al.] // *Front Bioeng. Biotechnol.* – 2015. – Vol. 3. – P. 162. doi: 10.3389/fbioe.2015.00162.
3. Гнатів В. В. Перспективи застосування мезенхімальних стовбурових клітин у лікуванні нейродегенеративних захворювань / В. В. Гнатів, В. В. Бабуленко, Х. С. Демчак // *Вісник наукових досліджень*. – 2013. – № 1 – С. 8–11. doi: 10.11603/2415-8798.2013.1.5678.
4. The promise of organ and tissue preservation to transform medicine / S. Giwa, J. K. Lewis, L. Alvarez [et al.] // *Nat. Biotechnol.* – 2017. – Vol. 35, No. 6. – P. 530–542. doi: 10.1038/nbt.3889.
5. Towards biobanking technologies for natural and bioengineered multicellular placental constructs / O. Pogozhykh, V. Prokopyuk, O. Prokopyuk [et al.] // *Biomaterials*. – 2018. – No. 185. – P. 39–50.

ВИСНОВКИ Для потреб регенеративної медицини доцільно застосовувати субнормотермічне (+20 °C) зберігання експлантів плаценти тривалістю до 48 год. Зберігання експлантів плаценти понад 48 год при субнормотермічних умовах, або понад 24 год при гіпотермічних умовах, призводить до різкого зниження їх метаболічної активності та руйнування.

Перспективи подальших досліджень Планується порівняти характеристики стовбурових клітин, виділених з експлантів плаценти після збереження протягом термінів різної тривалості, та оцінити збереженість окремих структур експлантів із метою подальшого їх експериментального і клінічного використання.

6. Subnormothermic preservation maintains viability and function in a porcine hepatocyte culture model simulating bioreactor transport / M. P. Van de Kerkhove, R. Hoekstra, F. C. van Nooijen [et al.] // *Cell Transplant.* – 2006. – Vol. 15, No. 2. – P. 161–168.

7. Comparative study of single and dual perfusion during end-ischemic subnormothermic liver machine preservation / I. M. A. Brueggewirth, C. Moore, P. Mahboub [et al.] // *Transplant. Direct.* – 2018. – Vol. 4, No. 11. – e400. doi: 10.1097/TXD.0000000000000840.

8. Characterization and modulation of human mesenchymal stem cell stress pathway response following hypothermic storage / W. L. Corwin, J. M. Baust, J. G. Baust, R. G. Van Buskirk // *Cryobiology*. – 2014 – Vol. 68, No. 2. – P. 215–226. doi: 10.1016/j.cryobiol.2014.01.014.

9. Influence of factors of cryopreservation and hypothermic storage on survival and functional parameters of multipotent stromal cells of placental origin / D. Pogozhykh, V. Prokopyuk, O. Pogozhykh [et al.] // *PLoS One*. – 2015 – Vol. 10, No. 10. – e0139834. doi: 10.1371/journal.pone.0139834.

Отримано 16.05.19

©V. Yu. Prokopyuk¹, M. V. Shevchenko¹, O. S. Prokopyuk¹, I. B. Musatova¹, K. Yu. Smolianyuk², O. V. Chub¹
*Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine, National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv¹
 Kharkiv Medical Academy of Postgraduate Education²*

ASSESSMENT OF THE POSSIBILITY OF SHORT-TERM STORAGE OF PLACENTA EXPLANTS FOR REGENERATIVE MEDICINE

Summary. Placental cells, tissues and biologically active substances are promising objects for an effective treatment of pathological conditions of the endocrine, immune and nervous systems. For clinical use of placental derivatives it is necessary to develop methods for their short-term storage and transportation from the clinic to the biotechnological laboratory and in the opposite direction.

The aim of the study – to determine the possibility of subnormothermic (+20°C) and hypothermic (+4°C) storage of placenta explants.

Materials and Methods. Explants were obtained from placentas after a cesarean section. Explants were stored in culture medium under hypothermic and subnormothermic conditions for 96 hours. Explants structure was histologically evaluated every 24 hours, as well as metabolic characteristics of explants according to the tests for the recovery of resazurin, MTT and glucose consumption test.

Results and Discussion. Under subnormothermic conditions placenta explants were found to retain structure, viability and metabolic characteristics for 48 hours; under hypothermic conditions the term of storage is reduced to 24 hours. Typical lesions of placenta explants are reduction of the villi and intervillous spaces, and trophoblast detachment. Recommendations for the short-term storage of placenta explants were developed.

Conclusions. Thus, it was defined that finding (transporting) placenta explants in subnormothermic conditions for up to 48 hours in culture medium ensures the safety of their properties and determines the effectiveness of their clinical use.

Key words: regenerative medicine; explants; placenta; subnormothermia; hypothermia; biotechnology.

©В. Ю. Прокопюк¹, М. В. Шевченко¹, О. С. Прокопюк¹, И. Б. Мусатова¹, К. Ю. Смоляник², О. В. Чуб¹
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков¹
Харьковская медицинская академия последипломного образования, г. Харьков²

ОЦЕНКА ВОЗМОЖНОСТИ КРАТКОВРЕМЕННОГО ХРАНЕНИЯ ЭКСПЛАНТОВ ПЛАЦЕНТЫ ДЛЯ РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ

Резюме. Клетки, ткани, биологически активные вещества плаценты являются перспективными объектами для эффективного лечения патологических состояний эндокринной, иммунной и нервной систем. Для клинического применения производных плаценты необходима разработка методов их кратковременного хранения и транспортировки от клиники к биотехнологической лаборатории и в обратном направлении.

Цель исследования – определить возможности субнормотермического и гипотермического хранения эксплантов плаценты в среде культивирования для клинического использования в регенеративной медицине.

Материалы и методы. Экспланты получали из плацент после кесарева сечения. Хранили в культуральной среде при гипотермических и субнормотермических условиях в течение 96 ч. Каждые 24 ч гистологически оценивали структуру эксплантов, метаболические характеристики по данным тестов восстановления резазурина, МТТ, теста потребления глюкозы.

Результаты исследований и их обсуждение. Обнаружено, что при субнормотермических условиях экспланты плаценты сохраняют структуру, жизнеспособность и метаболические характеристики на протяжении 48 ч, при гипотермических условиях срок хранения снижается до 24 ч. Типичными повреждениями являются уменьшение ворсин и межворсинчатых пространств, отслойка трофобласта. Разработаны рекомендации по их кратковременному хранению.

Выводы. Установлено, что нахождение (транспортировка) эксплантов плаценты в субнормотермических условиях до 48 ч в культуральной среде обеспечивает сохранность свойств эксплантов и обуславливает эффективность их клинического использования.

Ключевые слова: регенеративная медицина; экспланты; плацента; субнормотермия; гипотермия; биотехнологии.

Адреса для листування: О. С. Прокопюк, Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України, вул. Новгородська, 20, Харків, 61000, Україна, e-mail: o.s.prokopiuk@gmail.com