

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
ХАРКІВСЬКА МЕДИЧНА АКАДЕМІЯ ПІСЛЯДИПЛОМНОЇ ОСВІТИ

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

СКИБІНА КСЕНІЯ ПАВЛІВНА

УДК: 618.11 – 008.64-08[611.018.1 ”712.4”+615.451.1:618.46]-092.9-042.2

ДИСЕРТАЦІЯ

**ПОРІВНЯЛЬНА ОЦІНКА ЕФЕКТИВНОСТІ ТКАНИННОЇ ТА
КЛІТИННОЇ ТЕРАПІЇ У ЛІКУВАННІ СИНДРОМА ПЕРЕДЧАСНОЇ
НЕДОСТАТНОСТІ ЯЄЧНИКІВ В ЕКСПЕРИМЕНТІ**

за спеціальністю «222 – медицина»
спеціалізація «Акушерство та гінекологія»

Подається на здобуття ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

_____ К.П. Скибіна

Науковий керівник: Козуб М.І., доктор медичних наук, професор

Харків – 2023

АНОТАЦІЯ

Скибіна К.П. Порівняльна оцінка ефективності тканинної та клітинної терапії у лікуванні синдрому передчасної недостатності яєчників в експерименті. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття ступеня доктора філософії в галузі знань 22 «Охорона здоров'я», за спеціальністю 222 «Медицина», спеціалізація «Акушерство та гінекологія». – Харківський національний медичний університет МОЗ України, Харків, 2023. Захист відбудеться в Харківському національному медичному університеті.

Частота передчасної недостатності яєчників (ПНЯ) у популяції становить 1%. Однак у віковому аспекті поширеність цього захворювання прогресивно збільшується. Ураховуючи тенденцію до пізньої реалізації репродуктивної функції, характерну для розвинених країн, висока частота ПНЯ в групі жінок пізнього репродуктивного віку стає все більш актуальною проблемою для сучасної репродуктології.

Метою дисертаційної роботи було розв'язання актуального питання лікування передчасної недостатності яєчників з використанням клітинної та плацентарної терапії, а саме: відновлення функції репродуктивних органів та органів детоксикації самиць мишей і покращення їх поведінкових реакцій в експерименті.

Ураховуючи особливості перебігу синдрому ПНЯ та перспективи застосування клітинної та тканинної терапії при його лікуванні, дослідження складалося з трьох етапів.

На першому етапі проводили вибір моделі та моделювання ПНЯ на самицях мишей. На другому проводили лікування тварин з ПНЯ із застосуванням клітинної та плацентарної терапії. На третьому етапі оцінювали ефективність використаних терапевтичних методів введення кріоекстракту плаценти та мезенхімальних стовбурових клітин за

показниками ревіталізації функціонування репродуктивних органів, органів детоксикації та оцінкою поведінкових реакцій.

Експериментальний розділ роботи проведено на 50 самицях мишей лінії BALB/c. Тварини були розподілені на 5 груп по 10 мишей:

- 1 група (контрольна) – інтактні;
- 2 група – з моделлю ПНЯ без лікування;
- 3 група – з моделлю ПНЯ та парентеральним введенням КП;
- 4 група – з моделлю ПНЯ та інтраперитонеальним введенням МСК ЖТ;
- 5 група – з моделлю ПНЯ та інтраоваріальним введенням МСК ЖТ.

Для відтворення моделі ПНЯ тваринам одноразово вводили циклофосфамід у дозі 200 мг/кг і бусульфан у дозі 20 мг/кг.

Оцінювали динаміку маси тіла тварин методом зважування та функцію яєчників методом вагінальної цитології. Для визначення статевої активності самиць мишей спарювали із самцями лінії BALB/c віком 6-8 місяців, які мали раніше нащадків, тобто були фертильними, у співвідношенні 3:1.

Оцінку поведінкових реакцій проводили, використовуючи тести “відкритого поля”, анксіолітичний і зоосоціальний, що відображають орієнтаційно-пошукову поведінку, ступінь тривожності та здатність тварин до зоосоціальної взаємодії, відповідно.

Через 4 тижні після моделювання ПНЯ по 5 тварин з кожної групи виводили з експерименту, проводячи гістологічне дослідження препаратів органів репродукції – яєчників і маток та органів детоксикації – печінки і нирок. Через 8 тижнів усіх тварин піддослідних груп виводили з експерименту.

За підсумками роботи було визначено, що експериментальна модель супроводжується загальним токсичним впливом та навантаженням на органи детоксикації – печінку та нирки. Моделювання ПНЯ підтверджували за втратою ваги мишей та результатами кольпоцитологічного дослідження (еструс/анеструс). Моделювання ПНЯ застосуванням ХТП вірогідно погіршувало загальний стан тварин, знижувало вагу (на 15,0%), пригнічувало

поведінкові реакції, призводило до посилення тривоги (на 41,4%), погіршувало зоосоціальну поведінку (на 60,8%). У мазках мишей після відтворення моделі ПНЯ був відсутній поверхневий епітелій (анеструс).

Застосування КП, що вводився парентерально для лікування ПНЯ, приводило до появи естрального циклу у 20% мишей на 3-й тиждень, у 80% – на 8-й тиждень. Статева активність з'являлася у 20% мишей на 5-й тиждень, у 60% – на 8-й тиждень. Гістологічне дослідження маток тварин виявило незначну атрофію ендометрію та потовщення міометрію. Використання КП парентерально не призвело до появи типових структурних елементів в яєчниках, проте спостерігались утворення, схожі на фолікули, – округлі ділянки, що містили великі клітини зі світлою цитоплазмою. У мишей, які отримували лікування КП, введеним парентерально, у печінці відзначався клітинний поліморфізм, розширення протоків, ознаки набряку при збереженій балковій структурі. Тоді як у нирках відзначалося помірне зморщування клубочків, помірний набряк, зі збереженою архітектонікою каналців.

Лікування ПНЯ за допомогою МСК ЖТ, які вводилися інтраперитонеально, приводило до появи естрального циклу на 3-й тиждень у більшій на 10% кількості мишей, ніж при парентеральному введенні КП. Статева активність з'являлася також у значно більшій кількості мишей: на 5-му тижні у 40% , а на 8-му тижні – у 80 % мишей. Гістологічне дослідження маток тварин показало, що у мишей з використанням МСК ЖТ інтраперитонеально матка була морфологічно збереженою, місцями спостерігалися стоншення шарів, незначна атрофія ендометрію, а в яєчниках відзначалися поява структурних елементів: жовтих тіл, примордіальних і первинних фолікулів, гіперплазія окремих клітин або груп клітин. У мишей, які отримували лікування МСК ЖТ інтраперитонеально, у печінці також відзначалося збереження балкової структури, спостерігалися клітинний поліморфізм, спостерігалася велика кількість гіперхромних ядер, підвищена неоднорідність, набряк. У нирках відзначався набряк, розширення

дистальних і проксимальних каналців, нерівність стінок кровоносних судин за рахунок здавлення їх розширеними оточуючими каналцями, ознаки холестеринової мікроемболії. Ниркові тільця мали клубочки з характерними щільними плямами в місці прилягання дистального каналця, але подекуди клубочки були деформовані.

Терапія модельованої ПНЯ інтраоваріальним введенням МСК ЖТ призводила до найбільш швидкого відновлення естрального циклу та статевої активності: уже на 7-му тижні естральний цикл спостерігався у 80% тварин, а статеві активність на 6-му тижні у – 60% мишей. Слід відзначити, що на 8-му тижні у 80% тварин, яких лікували різними методами, відновився естральний цикл, але швидкість відновлення була найшвидшою при застосуванні клітинної терапії. При цьому статеві активність відновлювалася до 80% також при застосуванні МСК ЖТ, на відміну від терапії введенням КП, при якій цей показник сягав лише 60%.

Гістологічне дослідження маток тварин виявило, що в мишей, яких лікували введенням МСК ЖТ інтраоваріально, матка морфологічно була близькою до інтактної, з місцями незначною гіпоплазею ендометрію. У яєчниках відзначалося відновлення структурних елементів: жовтих тіл, примордіальних, первинних та поодиноких вторинних фолікулів, причому кількість первинних фолікулів була вищою, ніж після інтраперитонеального введення МСК ЖТ. У печінці добре візуалізувалися окремі місця скупчення дрібних ядер, що може свідчити про інтенсивне ділення клітин; зберігалася балкова структура та спостерігався поліморфізм ядер, без ознак набряку. Відзначалася морфологічна збереженість протоків та гістологічна картина, близька до фізіологічної. У нирках – судини з недеформованими стінками. Візуалізувалися неоднорідно розширені каналці, клубочки характерної форми зі збереженими пластинками щільної плями та клітинами юкстагломерулярного комплексу. Паренхіматозний та мозковий шари нирки – зі збереженою архітектонікою.

Лікування тварин за допомогою КП та МСК дозволяє вірогідно покращити поведінкові реакції та нормалізувати вагу. Досліджено, що на 8-му тижні спостереження лікування КП прискорює нормалізацію ваги (на 4,3%), веде до зменшення тривоги (на 69,5%), покращує зоосоціальну поведінку (на 42,0%). Було виявлено, що лікування тварин МСК ЖТ шляхом перитонеального введення прискорює нормалізацію ваги (на 4,8%), покращує зоосоціальну поведінку (на 10,0%), але не призводить до покращення показників анксиолітичної поведінки (не зменшує тривожність). Було виявлено, що лікування тварин МСК ЖТ шляхом інтраоваріального введення прискорює нормалізацію ваги (на 7,5%), покращує зоосоціальну поведінку (на 40%), веде до зменшення тривоги (на 60,9%).

Таким чином, наукова новизна дослідження полягає в тому, що вперше в порівняльному аспекті досліджено терапевтичні ефекти лікування експериментальної хіміоіндукованої ПНЯ за допомогою парентерального введення кріоконсервованого екстракту плаценти й перитонеального та інтраоваріального способів введення мезенхімальних стовбурових клітин жирової тканини.

Уперше при лікуванні хіміоіндукованої ПНЯ за допомогою МСК ЖТ були виявлені позитивні морфологічні зміни в органах репродукції (яєчниках та матці), які є ознаками відновлення досліджуваних органів: матка була морфологічно збереженою, у яєчниках відзначалася поява структурних елементів – жовтих тіл, примордіальних і первинних фолікулів та, крім того, при інтраоваріальному введенні МСК ЖТ з'являлися вторинні фолікули. Підтвердженням морфологічного відновлення є підвищення показника статевої активності від 60% при введенні КП до 80% при введенні МСК та показника відновлення овуляторного циклу до 80% після введення КП та МСК.

Уперше показано, що використання КП та МСК ЖТ ревіталізує органи детоксикації (печінку та нирки): у печінці спостерігалися ознаки інтенсивного ділення клітин, відсутність набряку та холестеринової

мікроемболії. У нирках нівелювалися ознаки тубулоінтерстиціального нефриту.

Уперше виявлено, що найбільший ефект ревіталізації органів репродукції та детоксикації відзначався при лікуванні хіміоіндукованої ПНЯ шляхом введення МСК ЖТ інтраоваріально, що може бути пов'язано з паракринною дією МСК ЖТ.

Дослідження поведінкових реакцій самиць мишей з хіміоіндукованою ПНЯ після застосування методів клітинної та тканинної терапії виявило покращення показників зоосоціальної поведінки тварин до 42,0% при застосуванні КП та 40,0% при застосуванні МСК ЖТ інтраоваріально, при цьому показники анксиолітичної поведінки покращувалися на 69,5% при застосуванні КП та на 60,9% при застосуванні МСК ЖТ інтраоваріально.

Лікування тварин за допомогою КП та МСК дозволяє нормалізувати вагу мишей. Вага всіх тварин, які отримували лікування КП та МСК ЖТ, відновлювалася швидше, ніж вага мишей з моделлю ПНЯ без лікування. До найкращих результатів відновлення ваги приводило лікування із застосуванням МСК ЖТ інтраоваріально.

Практичне значення отриманих результатів полягає в тому, що проведене експериментальне дослідження дозволяє обґрунтувати застосування клітинної та плацентарної терапії пацієнткам з ПНЯ, як перспективний, патогенетично обґрунтований лікувальний метод для ревіталізації структури та функціональної спроможності репродуктивних органів, органів детоксикації, корекції поведінкових реакцій. Виявлені ефекти терапевтичної дії КП та МСК жирової тканини можуть бути використані в розробці нових та вдосконалення існуючих алгоритмів лікування ПНЯ та її ускладнень.

Наше дослідження знайшло вихід у практичну охорону здоров'я в ClinicalTrials.gov ID NCT04675970 USA «Long Term Follow up Patients With Premature Ovarian Failure ex Vivo Gene Therapy (UB-OVF)» та було

впроваджено в роботу КНП «Міський клінічний пологовий будинок №2 ХМР ім. М.Х. Гельфериха».

На підставі проведених досліджень запропоновано та одержано патент України на корисну модель № 115706 «Спосіб лікування передчасної недостатності яєчників в експерименті» та патент України на корисну модель №107968 «Спосіб лікування передчасної недостатності яєчників». Результати дисертаційної роботи можуть бути включені в програму навчання студентів біологічних і медичних спеціальностей і програму підвищення кваліфікації лікарів-інтернів.

Ключові слова: передчасна недостатність яєчників, кріоконсервований екстракт плаценти, мезенхімальні стовбурові клітини, клітинна терапія, плацентарна терапія, оваріальний резерв, репродуктивна система, органи детоксикації, поведінка, експериментальна модель.

ABSTRACT

Skybina K.P. Comparative assessment of the effectiveness of tissue and cellular therapy in the treatment of premature ovarian failure syndrome in an experiment. – Qualifying scientific work as a manuscript. Dissertation for the degree of Doctor of Philosophy in the field of knowledge 22 "Healthcare," in the specialty 222 "Medicine," specialization "Obstetrics and Gynecology." – Kharkiv National Medical University of the Ministry of Health of Ukraine, Kharkiv, 2023. The defense will take place at Kharkiv National Medical University.

The incidence of premature ovarian insufficiency (POI) in the population is 1%. However, in the age aspect, the prevalence of this condition progressively increases. Considering the trend towards delayed realization of reproductive function, characteristic of developed countries, the high frequency of POI in the group of women of late reproductive age becomes an increasingly relevant issue for modern reproductive medicine.

The aim of the dissertation was solution to a pressing issue of treating premature ovarian insufficiency using cellular and placental therapy, specifically focusing on restoring the function of reproductive organs and detoxification organs in female mice and improving their behavioral reactions in the experiment.

Given the characteristics of POI progression and the prospects of using cellular and tissue therapy in its treatment, the research consisted of three stages.

In the first stage, the selection of the model and modeling of POI in female mice were conducted.

In the second stage, the treatment of animals with POI was carried out using cellular and placental therapy.

In the third stage, the effectiveness of the therapeutic methods, including the administration of cryoextract of the placenta and mesenchymal stem cells, was evaluated based on the indicators of revitalization of the functioning of reproductive organs, detoxification organs, and assessment of behavioral reactions.

The experimental section of the work was conducted on 50 female mice of the BALB/c strain. The animals were divided into 5 groups of 10 mice each:

- 1 control group - intact;
- 2 group with POI model without treatment;
- 3 group with POI model and treatment by parenteral injection of placental cryoextract;
- 4 group with POI model and treatment by intraperitoneal injection of mesenchymal stem cells from adipose tissue;
- 5 group with POI model and treatment by intraovarian injection of mesenchymal stem cells from adipose tissue.

To reproduce the POI model, the animals were injectioned cyclophosphamide at a dose of 200 mg/kg and busulfan at a dose of 20 mg/kg.

The dynamics of body weight of the animals were evaluated by weighing, and the ovarian function was assessed by vaginal cytology. To determine the sexual activity of female mice, they were paired with BALB/c male mice aged 6-8 months, which had previously had offspring, i.e., were fertile, in a ratio of 3:1.

Behavioral reactions were assessed using the "open field" test, anxiolytic and zoosocial tests, reflecting orientation-search behavior, the degree of anxiety, and the animals' ability to engage in zoosocial interaction, respectively.

After 4 weeks of modeling POI, 5 animals from each group were removed from the experiment, conducting histological examination of reproductive organs (ovaries and uteri) and detoxification organs (liver and kidneys). After 8 weeks, all animals from the experimental groups were removed from the experiment.

The results of the work determined that the experimental model is accompanied by a general toxic effect and a load on detoxification organs – the liver and kidneys. The modeling of POI was confirmed by the weight loss of mice and the results of colpocytological examination (estrus/anestrus). Modeling POI with the use of cellular therapy likely worsened the general condition of the animals, decreased weight (by 15.0%), suppressed behavioral reactions, led to increased anxiety (by 41.4%), and worsened zoosocial behavior (by 60.8%). In the smears of mice after reproducing the POI model, the surface epithelium was absent (anestrus).

The use of placental cryoextract (CP) parenteral injection for the treatment of premature ovarian insufficiency (POI) resulted in the appearance of estrous cycles in 20% of mice by the 3 week and in 80% by the 8 week. Sexual activity appeared in 20% of mice by the 5 week and in 60% by the 8 week. Histological examination of the animals' uteri revealed endometrial hyperplasia and thickening of the myometrium. The use of CP parenterally did not lead to the appearance of typical structural elements in the ovaries, but formations resembling follicles were observed – round areas containing large cells with light cytoplasm. In mice treated with CP parenteral injection, the liver showed cellular polymorphism, ductal expansion, and signs of edema while maintaining the lobular structure. Meanwhile, the kidneys exhibited moderate glomerular shrinkage, mild edema, with preserved tubular architecture.

Treatment of POI using mesenchymal stem cells from adipose tissue (MSC AT), intraperitoneal injection, led to the appearance of estrous cycles in a larger

percentage of mice by the third week, 10% more than with the parenteral administration of CP. Sexual activity also appeared in a significantly larger number of mice: 40% by the 5 week and 80% by the 8 week. Histological examination of the animals' uteri showed that in mice treated with intraperitoneal cell injection of MSC AT, the uterus was morphologically preserved, with occasional thickening of layers, slight endometrial atrophy, and the ovaries showed the presence of structural elements: corpus luteum, primordial and primary follicles, hyperplasia of individual cells or cell groups. In the liver of mice receiving intraperitoneal treatment with MSC AT, the lobular structure was well-preserved, cellular polymorphism was observed, with a large number of hyperchromatic nuclei and swelling. In the kidneys, there was edema, dilation of distal and proximal tubules, unevenness of vessel walls due to compression by dilated surrounding tubules, signs of cholesterol microembolism. Renal corpuscles had glomeruli with characteristic dense spots at the junction of the distal tubule, but sometimes the glomeruli were deformed.

Therapy for modeled POI with intraovarian injection of MSC AT resulted in the fastest restoration of estrous cycles and sexual activity: by the 7 week, estrous cycles were observed in 80% of animals, and sexual activity appeared in 60% by the 6 week. It is worth noting that by the 8 week, 80% of mice treated with various methods had restored estrous cycles, but the speed of recovery was fastest with cellular therapy. Sexual activity also recovered up to 80% with intraovarian injection of MSC AT, unlike the therapy with CP injection, where this indicator reached only 60%.

Histological examination of the animals' uteri showed that in mice treated with intraovarian administration of MSC AT, the uterus was morphologically close to intact, with some areas of slight endometrial hypoplasia. In the ovaries, there was a restoration of structural elements: corpus luteum, primordial, primary, and occasional secondary follicles, with a higher number of primary follicles than after intraperitoneal administration of MSC AT. In the liver, individual areas of nuclear clustering were well visualized, indicating intensive cell division; the lobular

structure was preserved, and there was cellular polymorphism, without signs of edema. The ducts and histological pattern in the liver were close to physiological. In the kidneys, vessels with undistorted walls were visualized. Unevenly dilated tubules, glomeruli of characteristic shape with preserved plates of dense stain, and cells of the juxtaglomerular complex were observed. The parenchymal and medullary layers of the kidney showed preserved architecture.

Treatment of animals with CP and MSC likely improves behavioral reactions and normalizes weight. It has been observed that CP treatment accelerates weight normalization (by 4.3%), reduces anxiety (by 69.5%), and improves zoosocial behavior (by 42.0%). Treatment of animals with MSC AT through intraperitoneal administration expedites weight normalization (by 4.8%), improves zoosocial behavior (by 10.0%), but does not lead to improvements in anxiolytic behavior (stress). Treatment with MSC AT through intraovarian administration accelerates weight normalization (by 7.5%), improves zoosocial behavior (by 40.0%), and reduces anxiety (by 60.87%).

Thus, the scientific novelty of the study lies in the comparative examination of the therapeutic effects of treating experimentally induced premature ovarian insufficiency (POI) through parenteral administration of cryopreserved placental extract and intraperitoneal and intraovarian methods of administering adipose tissue-derived mesenchymal stem cells (MSC AT).

For the first time in the treatment of chemically induced POI with MSC AT, positive morphological changes in the reproductive organs (ovaries and uterus) were identified, indicating the restoration of the studied organs. The uterus was morphologically preserved, and the ovaries showed the appearance of structural elements—corpora lutea, primordial, and primary follicles, and with intraovarian administration of MSC AT, the appearance of secondary follicles. Confirmation of morphological restoration is the increase in the sexual activity index from 60% with CP administration to 80% with MSC administration and the indicator of ovulatory cycle restoration to 80% after CP and MSC administration.

It was also demonstrated for the first time that the use of CP and MSC AT revitalizes detoxification organs (liver and kidneys): in the liver, signs of intensive cell division were observed, absence of edema, and cholesterol microembolism. In the kidneys, signs of tubulointerstitial nephritis were alleviated.

For the first time, it was found that the most significant revitalization effect on reproductive and detoxification organs was observed in the treatment of chemically induced POI by administering MSC AT intraovarianly, which may be associated with the paracrine action of MSC AT.

The study of behavioral reactions of female mice with chemically induced POI after the application of cellular and tissue therapy showed improvement in zoosocial behavior indicators up to 42.0% with CP application and 40.0% with intraovarian application of MSC AT, while anxiolytic behavior indicators improved by 69.5% with CP application and 60.87% with intraovarian application of MSC AT.

Treatment of animals with CP and MSC allows for weight normalization in mice. The weight of all animals receiving CP and MSC AT treatment recovered significantly faster than the weight of mice with POI model without treatment. The best weight restoration results were achieved with MSC AT intraovarian administration.

The practical significance of the obtained results lies in the experimental study's justification for the application of cellular and placental therapy to patients with POI as a promising, pathogenetically substantiated treatment method for revitalizing the structure and functional capacity of reproductive organs, detoxification organs, and correcting behavioral reactions. The therapeutic effects of CP and MSC adipose tissue can be used in the development of new and improvement of existing algorithms for treating POI and its complications.

Our research has found its way into practical healthcare in ClinicalTrials.gov ID NCT04675970 USA "Long Term Follow up Patients With Premature Ovarian Failure ex Vivo Gene Therapy (UB-OVF)" and has been implemented in the work

of Municipal Clinical Maternity Hospital No. 2 of Kharkiv Medical Academy of Postgraduate Education named after M. Kh. Hel'ferikh.

Based on the conducted research, a patent of Ukraine for a useful model No. 115706 "Method of Treatment of Premature Ovarian Insufficiency in Experiment" and a patent of Ukraine for a useful model No. 107968 "Method of Treatment of Premature Ovarian Insufficiency" has been proposed and obtained. The results of the dissertation work can be included in the training programs for students of biological and medical specialties and the program for the qualification improvement of intern doctors.

Key words: premature ovarian insufficiency, placental cryoextract, mesenchymal stem cells, cell therapy, placental therapy, ovarian reserve, reproductive system, organs of detoxification, behavior, experimental model.

СПИСОК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові праці, у яких відображено основні результати дисертаційного дослідження:

1. Kozub MM, Prokopiuk VY, Skibina KP, Prokopiuk OV, Kozub NI. Comparison of various tissue and cell therapy approaches when restoring ovarian, hepatic and kidney's function after chemotherapy-induced ovarian failure. *Exp Oncol.* 2017;39(3):181-5. *(Дисертантом особисто систематизовано отримані результати, написані основні розділи статті).*
2. Kozub MI, Skybina KP, Musatova IB, Prokopiuk OV, Gramatiuk SM, Tynnyuka LM, et al. Comparison of therapeutic effects of different methods of administration of mezenchimal stem cells to mice with premature ovarian insufficiency. *Проблеми ендокринної патології.* 2021;2:35-9. doi: 10.21856/j-PEP.2021.2.05. *(Дисертантом особисто проаналізовано ефективність застосованих лікувальних методів, систематизовано отримані результати, написані основні розділи статті).*
3. Козуб ММ, Козуб МІ, Скибіна КП. Експериментальне обґрунтування застосування кріоекстракту плаценти у пацієток з синдромом передчасної недостатності яєчників. *Збірник наукових праць співробітників НМАПО ім. П.Л.Шупіка.* 2016;27(1):117-23. *(Дисертантом здійснено набір клінічного матеріалу, проаналізовані отримані результати, оформлено статтю до друку).*
4. Козуб МН, Скибіна КП, Козуб НІ, Прокопюк ВЮ. Реалии и перспективы использования клеточной и тканевой терапии в лечении преждевременной недостаточности яичников (обзор литературы). *Збірник наукових праць асоціації акушерів-гінекологів України.* 2017;1(35):70-5. *(Дисертантом особисто проаналізовано літературні джерела та підготовлено текст статті).*

5. Скибина КП, Козуб НИ, Прокопюк ВЮ. Порівняльна характеристика терапевтичних ефектів кріоекстракта плаценти і мезенхімальних стовбурових клітин жирової тканини у лікуванні передчасної недостатності яєчників, викликаних хіміотерапією, в експерименті. Збірник наукових праць асоціації акушерів-гінекологів України. 2018;1(41):140-5. doi: 10.35278/2664-0767.1(41).2018.172562. *(Дисертантом особисто проаналізовано ефективність застосованих лікувальних методів, систематизовано отримані результати, написані основні розділи статті).*
6. Козуб МІ, Граматюк СМ, Гирман ЛІ, Ольховська ВМ, Скибіна КП. Шляхи підвищення ефективності лікування пацієток з ендометріюїдними кістами яєчників репродуктивного віку (огляд літератури). Збірник наукових праць асоціації акушерів-гінекологів України. 2019;1:43-51. doi: 10.35278/2664-0767.1(43).2019.178055. *(Дисертантом особисто проаналізовано літературні джерела та підготовлено текст статті).*

Наукові праці, що засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

1. Skybina KP, Prokopyuk VY, Kozub NI, Kozub MN. Placental cryoextract rescue ovarian function of mice with premature ovarian failure induced by chemotherapy. In: 24th Intern. med. stud. conf. (IMSC)); 2016 Apr 14-16; Cracow, Poland; 2016, p. 5.
2. Skybina KP, Chub OV, Prokopyuk VYu, Shevchenko MV. Placental factors protects neural cells from glutamate-induced toxicity. In: XXIII Intern. scien. pract. conf. young scien. and student «Topical Issues Of New Drugs Development»; 2016 Apr 21; Kharkiv: NUPh; 2016, p. 82.
3. Прокопюк ВЮ, Скибіна КП, Прокопюк АВ, Козуб МН. Экстракт плаценты ускоряет восстановление половой и репродуктивной функции после химиотерапии в эксперименте (пилотное исследование). В: Мат. XIII З'їзд онкол. та радіол. України; 2016 Трав 26-28; Київ, 2016, с.159.

4. Скибіна КП. Порівняльна оцінка тканинної та клітинної терапії у лікуванні передчасної недостатності яєчників в експерименті. В: Мат. наук.-практ. конф. мол. вчен. з міжн. участю «Медицина ХХІ століття»; 2019 Лис 29; Харків: ХМАПО; 2019, с.69.
5. Skybina KP, Musatova IB, Kozub MI. Application of mesenchymal stem cells of adipose tissue for restoration of sexual function and behavior in the ovarian failure model. In: I conf. scien. et pratiq. intern. «Debats scientifiques et orientations prospectives du developpement scientifique»; 2021 Feb 5; Vinnitsia-Paris: Plateforme scientifique européenne & La Fedeltà; 2021, p.47-48.
6. Прокопюк ВЮ, Скибіна КП, Козуб НИ, Мусатова ИБ, Шевченко МВ, Прокопюк ОС. Экспериментальне изучение возможностей клеточной и тканевой терапии в реабилитации после химиотерапии. В: Всеукр. наук.-практ. internet-конф. «Фізіологія, валеологія, медицина: сучасний стан та перспективи розвитку»; 2021 Квіт 6; Харків: НФаУ; 2021, с.114.
7. Prokopiuk VYu, Shevchenko MV, Musatova IB, Skybina KP, Prokopiuk OS, Kozub MI. Optimization of conditions for subnormothermic and hypothermic treatment of mscs as biomaterial for experimental medicine. In: Intern. med. conf. «Biomedical perspectives III»; 2021 Oct 26-28; Sumy: Medical Institute of Sumy State University; 2021, p. 86.
8. Скибіна КП. Стан печінки та нирок у тварин з передчасною недостатністю яєчників. В: Збірник мат. ХХ наук.-практ. студ. конф. «Uzhgorod medical students conference»; 2023 Квіт 26-28; Ужгород: УжНУ; 2023, с. 48.

Наукові праці, що додатково відображають наукові результати дисертації:

1. Козуб ММ, Пасієшвілі НМ, Скибіна КП, Прокопюк ОВ, Прокопюк ВЮ, винахідники; Інститут проблем кріобіології і кріомедицини Національної академії наук України, патентовласник. Спосіб лікування передчасної недостатності яєчників. Патент України на корисну модель № 107968. 2016 Чер 24.
2. Козуб МІ, Прокопюк ВЮ, Скибіна КП, винахідники; Харківська академія післядипломної освіти, патентовласник. Спосіб лікування передчасної недостатності яєчників в експерименті. Патент України на корисну модель № 115706. 2017 Квіт 25.

ЗМІСТ

	стр
АНОТАЦІЯ.....	2
СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ.....	15
ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ ТА УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	23
ВСТУП.....	24
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	37
1.1. Епідеміологія синдрому передчасної недостатності яєчників.....	37
1.2. Етіологія та патогенез передчасної недостатності яєчників.....	37
1.2.1. Генетичні чинники.....	37
1.2.2. Імунологічні чинники.....	39
1.2.3. Хіміотерапія.....	40
1.2.4 Ятрогенні чинники.....	41
1.2.5. Ідіопатичні чинники.....	41
1.3. Клініка розвитку передчасної недостатності яєчників.....	42
1.4. Діагностика синдрому передчасної недостатності яєчників.....	44
1.5. Лікування передчасної недостатності яєчників.....	45
1.5.1. Гормональна терапія.....	45
1.5.2. Інші методи лікування.....	46
1.5.3. Плацентарна терапія.....	47
1.5.4. Терапія стовбуровими клітинами.....	48
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	55
2.1. Дизайн дослідження.....	55
2.2. Лабораторні тварини.....	56
2.3. Методи отримання екстракту плаценти та клітин жирової тканини	56
2.3.1. Отримання кріоконсервованого екстракту плаценти.....	56
2.3.2. Отримання мезенхімальних стовбурових клітин жирової тканини.....	57

2.4. Моделювання хіміоіндукованого синдрому ПНЯ.....	59
2.5. Методи оцінки впливу моделювання ПНЯ, клітинної та плацентарної терапії на лабораторних тварин.....	60
2.5.1. Дослідження естрального циклу та статевої активності мишей	60
2.5.2. Дослідження динаміки ваги тварин.....	61
2.5.3. Дослідження поведінки тварин.....	61
2.5.4. Морфологічне дослідження органів репродукції та детоксикації	62
2.6. Методи статистичної обробки даних.....	63
2.7. Біоетичні протоколи.....	64
РОЗДІЛ 3. ВПЛИВ КЛІТИННОЇ ТА ПЛАЦЕНТАРНОЇ ТЕРАПІЇ НА ПОВЕДІНКОВІ РЕАКЦІЇ САМИЦЬ МИШЕЙ У МОДЕЛІ ПЕРЕДЧАСНОЇ НЕДОСТАТНОСТІ ЯЄЧНИКІВ.....	
3.1. Дослідження впливу клітинної та плацентарної терапії на загальний стан мишей.....	66
3.2. Дослідження впливу клітинної та плацентарної терапії на поведінку мишей.....	70
РОЗДІЛ 4. ВПЛИВ КЛІТИННОЇ ТА ПЛАЦЕНТАРНОЇ ТЕРАПІЇ НА ОРГАНИ СИСТЕМИ ДЕТОКСИКАЦІЇ САМИЦЬ МИШЕЙ У МОДЕЛІ ПЕРЕДЧАСНОЇ НЕДОСТАТНОСТІ ЯЄЧНИКІВ.....	
4.1. Морфологічні зміни в печінці мишей у моделі ПНЯ та після застосування методів клітинної та плацентарної терапії	85
4.1.1. Морфологічний опис препаратів печінки контрольної групи мишей.....	86
4.1.2. Морфологічні зміни в печінці самиць мишей при моделюванні ПНЯ.....	87
4.1.3. Морфологічні зміни в печінці самиць мишей після лікування модельованої ПНЯ парентеральним введенням КП.....	88

4.1.4. Морфологічні зміни в печінці самиць мишей після лікування модельованої ПНЯ інтраперитонеальним введенням МСК ЖТ.....	89
4.1.5. Морфологічні зміни в печінці самиць мишей після лікування модельованої ПНЯ інтраовуляторним введенням МСК ЖТ.....	90
4.2. Вплив клітинної та плацентарної терапії на морфологічні порушення в нирках мишей у моделі хіміоіндукованої ПНЯ.....	91
4.2.1. Морфологічний опис препаратів нирки контрольної групи мишей.....	92
4.2.2. Морфологічні зміни в нирках самиць мишей при моделюванні хіміоіндукованої ПНЯ.....	93
4.2.3. Морфологічні зміни в нирках самиць мишей після лікування модельованої ПНЯ парентеральним введенням КП.....	94
4.2.4. Морфологічні зміни в нирках самиць мишей після лікування модельованої ПНЯ інтраперитонеальним введенням МСК ЖТ.....	95
4.2.5. Морфологічні зміни в нирках самиць мишей після лікування модельованої ПНЯ інтраовуляторним введенням МСК ЖТ.....	96
РОЗДІЛ 5. ВПЛИВ КЛІТИННОЇ ТА ПЛАЦЕНТАРНОЇ ТЕРАПІЇ НА СТАТЕВУ СИСТЕМУ САМИЦЬ МИШЕЙ У МОДЕЛІ ПЕРЕДЧАСНОЇ НЕДОСТАТНОСТІ ЯЄЧНИКІВ.....	99
5.1. Вплив клітинної та плацентарної терапії на естральний цикл та статеву активність самиць мишей.....	100
5.2. Вплив клітинної та плацентарної терапії на статеві органи самиць мишей у моделі ПНЯ.....	103
5.2.1. Морфологічні зміни в матках самиць мишей у моделі ПНЯ та після застосування методів клітинної та плацентарної терапії.....	103
5.2.2. Морфологічні зміни в яєчниках самиць мишей у моделі ПНЯ та після застосування методів клітинної та плацентарної терапії.....	106
АНАЛІЗ ТА ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	112
ВИСНОВКИ.....	122

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ.....	124
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	125
ДОДАТОК А.....	153
ДОДАТОК Б.....	157

ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ ТА УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

АМГ	- антимюллерів гормон
АР	- андрогеновий рецептор
ДНК	- дезоксирибонуклеїнова кислота
ЕКЗ	- екстракорпоральне запліднення
ЖТ	- жирова тканина
ЗГТ	- замісна гормональна терапія
КП	- кріоконсервований екстракт плаценти
МСК	- мезенхімальні стовбурові клітини
ПНЯ	- передчасна недостатність яєчників
РНК	- рибонуклеїнова кислота
СК	- стовбурові клітини
Т4	- тироксин вільний
ТТГ	- тиреотропний гормон
ФСГ	- фолікулостимулюючий гормон
ХТП	- хіміотерапевтичний препарат
BDNF	- нейротрофний фактор головного мозку
bFGF	- основний фактор росту фібробластів
GDF9	- фактор росту і диференціювання 9
GDNF	- нейротрофний фактор
HGF	- фактор росту гепатоцитів
HLA	- головний комплекс гістосумісності
NGF	- фактор росту нервів
SCF	- фактор стовбурових клітин
SDF-1a	- фактор стромы - 1a
VEGF	- фактор росту судинного ендотелію

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження

Тривалість репродуктивного періоду жінок залежить від активності продукції стероїдних гормонів у яєчниках. Передчасна недостатність яєчників (ПНЯ) – це багатофакторний синдром, який характеризується виснаженням фолікулів яєчників, вторинною аменореєю, високим рівнем гонадотропінів і низькою концентрацією естрогенів у сироватці крові жінок віком до 40 років [204].

Розвиток ПНЯ в популяції жінок залежить від віку: до 20 років – 1:10000, 30 років – 1:1000, 40 років – 1%. Середній вік формування ПНЯ становить $26,8 \pm 1,6$ рік [69]. Поширеність ПНЯ у дівчат підліткового віку не перевищує 0,01% [35].

У жінок із первинною аменореєю поширеність ПНЯ сягає 10-28%, а із вторинною аменореєю – 4-18%. Цей синдром має суттєві психологічні наслідки та великий вплив для здоров'я. ПНЯ знижує фертильність та негативно діє на планування сім'ї [84].

Автоімунні захворювання відіграють певну роль в етіології ПНЯ. У 7-14,9% пацієнтів із ПНЯ виявляють автоантитіла до антигенів яєчника, тоді як у 17,6% хворих спостерігається супутня екстрагенітальна автоімунна патологія, така як хронічний кандидоз, вітиліго, алопеція, автоімунні гемолітичні анемії, системний червоний вовчак, синдром Шегрена, міастенія Гравіс, хвороби Крона, автоімунний гепатит та інші. Мішенями для антитіл при автоімунній ПНЯ слугують стероїдпродукуючі клітини надниркових залоз, 3β -гідроксистероїд дегідрогеназа, гонадотропний рецептор (дуже рідко), а також антигени пелюцида та жовтого тіла. [62].

Поширеність ПНЯ у пацієток із галактоземією становить 60-70%. Це може бути спричинене токсичною впливом галактози чи одного з її метаболітів на фолікулярні структури. Також відзначається зменшенням

початкової кількості овогоній під час ембріонального періоду та прискоренням фолікулярної атрезії як після народження, так і до досягнення статевого дозрівання. ПНЯ може мати різне походження, включаючи генетично обумовлене, автоімунне, ідіопатичне та функціональне (пов'язане із зниженням маси тіла, фізичним навантаженням або прийомом лікарських препаратів) [15].

Певне значення у виникненні в жінок ПНЯ мають порушення функціонування рецепторів, зокрема до фолікулостимулюючого гормону (ФСГ), що вважається важливим у патогенезі розвитку ПНЯ. Дефект цього рецептора знижує здатність рецепторів або пов'язувати ФСГ, або активувати сигнальні шляхи, погіршуючи його функцію [12].

Рецептор лютеїнізуючого гормону (ЛГ) відіграє важливу роль у підтримці виробництва прогестерону жовтим тілом, у зростанні фолікулів, стимуляції стероїдогенезу та дозріванні яйцеклітин. Аномалії розвитку цього рецептора призводять до порушення овуляції, передчасного дозрівання ооцитів, що спричиняє порушення менструального циклу, безпліддя та розвинення ПНЯ [2]. Відповідальним за функціонування яєчників є фактор росту і диференціювання 9 (GDF9) (5q31.1), що експресується в ооцитах і є геном-кандидатом для ПНЯ [22].

При дослідженні тканин яєчника було виявлено позитивну експресію андрогенового рецептора (AR) у 4 (22,2%) з 18 хворих на ПНЯ, на відміну від контрольної групи жінок зі своєчасною менопаузою, у яких експресія AR була відсутня. При вивченні поліморфізму гена AR у жінок із ПНЯ було виявлено тенденцію до вкорочення алелей CAG-повторів цього гена, довжина яких негативно корелювала з високим рівнем тестостерону, що додатково свідчило про підвищення трансактиваційної (ліганднезв'язаної) активності AR [3].

Значуще порушення функції фолікулів відзначається після використання алкілюючих засобів або прокарбазину під час проведення

хіміотерапії, при цьому, чим молодший вік має пацієнтка, тим вища ймовірність «виживання» окремих фолікулів.

Цитостатична терапія, яка пригнічує функцію яєчників, суттєво впливає на характер менструального циклу. Наприклад, серед жінок, старше 40 років які отримували в якості первинного лікування стандартну поліхіміотерапію спостерігалася аменорея майже в 100% випадків, а серед молодших пацієнток, 25-39 років, цей показник досягав до 86%, тоді як у молодих до 25 років аменорея виникала в 28% випадків. Такі самі закономірності спостерігаються і при проведенні променевої терапії: опромінення пахово-клубових ділянок у дозі більше 40-50 Гр призводить до стійкої аменореї в 40% жінок до 20 років і в 90-95% жінок віком понад 35 років. Яєчникова недостатність може тривати від декількох місяців до 3 років у молодих жінок або стати незворотною в більшості пацієнток старше 35 років [19].

Одним з достеменних факторів розвитку ПНЯ в жінок репродуктивного віку є хірургічне видалення маткових труб при оперативному лікуванні трубної вагітності, від обсягу та характеру якого залежать морфофункціональні особливості яєчників. Під час хірургічного втручання в пацієнток із трубної вагітністю в 70,6% хворих виконується сальпінгектомія, у 29,4% – сальпінготомія. Із виразністю порушення стану яєчників після оперативного лікування трубної вагітності корелюють кількість крововтрати, тривалість захворювання та вік пацієнтки. Найвиразніші зміни відбуваються в яєчнику на боці видаленої маткової труби, а порушення кровотоку в контрлатеральному яєчнику носить вторинний характер. Нормальний менструальний цикл відновлюється в 68% хворих, що перенесли односторонню тубектомію, та у 85% пацієнток – при консервативно-оперативному втручанні на маткових трубах. Найагресивнішими чинниками вважають оперативні втручання на яєчниках [12]. Також одним з патогенетичних чинників виникнення ПНЯ в пацієнток із трубною вагітністю

після оперативного видалення труб вважається наявність оксидативного стресу [9].

Порушення продукції цитокінів є одним з етапів у розвитку ПНЯ. Ці цитокіни впливають на гонадотропін-опосередкований контроль функції яєчників, сповільнюючи їхню дію. Овуляція розглядається як запальний процес, у якому беруть участь цитокіни, і порушення їхньої продукції може перешкоджати функції яєчників, призводячи до первинної нефропатії. Цей процес може пришвидшити фолікулярну атрезію або призвести до руйнування фолікулогенезу. [82].

Більшість жінок не мають будь-яких симптомів, проте за відсутності лікування ПНЯ, можливі типові прояви нестачі естрогену, зокрема дратівливість, нервозність, припливи, неспокій, безсоння, депресія, втрата лібідо, втрата концентрації та ін. Фізичне обстеження може виявити витончення шкіри, зниження ваги, остеоалгії та ін. [190].

У половині випадків у жінок із ПНЯ спостерігаються періодичні овуляторні цикли, проте ймовірність вагітності вкрай мала і не перевищує 5-10%. За даними літератури, самостійно або при використанні замісної гормональної терапії (ЗГТ), вагітність виникала у 5,2% та 3,3% випадків відповідно. [36].

При обстеженні пацієток із ПНЯ за тестами функціональної діагностики виявляються ознаки гіпофункції яєчників: витончення слизових оболонок вульви і піхви, слабопозитивний симптом «зіниці», низькі ключові показники ефективності (від 0 до 25%). При гінекологічному дослідженні, ехографії та лапароскопії діагностується зменшення в розмірах матки та яєчників. Аномальні каріотиби виявляються в 13-50% хворих на ПНЯ. Підвищений рівень тестостерону, який діагностується лише у 2,56% жінок із ПНЯ, може свідчити про умовне збереження оваріального резерву [21].

Для лікування пацієток із ПНЯ та стимуляції овуляції використовують естрогени, дигідроепіандростерон, оральні контрацептиви, кломіфенцитрат, гонадотропіни. Через наявність у 30-40% пацієток із ПНЯ супутньої

автоімунної патології, позитивний ефект на результат лікування ПНЯ надає застосування глюкокортикоїдів, функціонування яких здійснюється шляхом прямої протизапальної дії на макрофаги, залучені в руйнування зростаючих фолікулів, або за рахунок пригнічення функції клітин, які б виробляли медіатори запалення [15].

У той же час, при замісній гормональній терапії, пацієнткам із ПНЯ особливу увагу необхідно приділяти рівню С-реактивного білка через те, що він запускає індукцію ендотеліальної дисфункції, підвищуючи синтез молекул клітинної адгезії та призводить до міокардіальної катастрофи, інсультів, захворювань артерій тощо. Це обумовлено тим, що стероїди мають низку негативних ефектів, зокрема підвищують рівень тригліцеридів, С-реактивного білка, протромбіну та зменшують уміст антитромбіну III, сприяючи підвищенню ризику ішемічних уражень і венозних тромбоемболій [3].

Через вищевказані недоліки фармакологічних засобів, що застосовуються при лікуванні пацієток із ПНЯ, останніми роками все більше уваги надається використанню аутологічної тканини яєчників, отриманої лапароскопічним доступом, яка зазнала фрагментації та вітрифікації з подальшою аутотрансплантацією під серозну оболонку фаллопієвих труб і проведенням процедури ЕКЗ, а також використання для лікування ПНЯ препаратів клітинної та тканинної терапії [122].

Плацентарні клітини та препарати з плаценти забезпечують розвиток структур *de novo* та адекватну перебудову існуючих тканин декількома інструментами, зокрема плацентарними факторами росту різних класів, високим рівнем анаболічних процесів, а також регулюванням процесів апоптозу. Плацентарні клітини активно продукують проапоптичні сигнали, власне ініціюють й активують апоптоз. Одночасно базовою особливістю плацентарних макрофагів є пошук (завдяки набору поверхневих молекул) і поглинання апоптичних клітин. Цей процес відрізняється від фагоцитозу некротичних змін клітин та екзогенних мікроорганізмів, який

супроводжується секрецією медіаторів запалення. Поглинання плацентарними макрофагами апоптичних клітин призводить до пригнічення медіаторів запалення та індукції протизапальних цитокінів [29].

Екстракти плаценти людини, через високий вміст біологічно активних речовин, зокрема таких як: білки, пептиди, РНК, ДНК, полідезоксирибонуклеотиди, амінокислоти, ферменти та мікроелементи, виявляють антиоксидантну, протизапальну та тромболітичну активність, а також є стимулюючим агентом репарації тканин [40].

Одним з методів лікування хворих на ПНЯ є застосування мезенхімальних стовбурових клітин (МСК), що вводяться не тільки в кровотік, а й локально – у яєчник [84].

Основним джерелом МСК є кістковий мозок, жирова тканина, кров, плацента, амніотична рідина тощо. МСК, що виділені з кісткового мозку і не піддані культивуванню, позбавлені адгезивних молекул. МСК володіють унікальною здатністю надавати імуносупресивну дію через модуляцію функції дендритних клітин та індукцію регуляторних Т-лімфоцитів. Ця їх властивість дозволяє вирішити проблему HLA-несумісності донора та реципієнта. Однак, для використання МСК із метою автотрансплантації, необхідна попередня оцінка їх диференційного потенціалу. Очевидно, що ефективність такого лікування багато в чому визначається збереженням їх диференційного потенціалу, яка, у свою чергу, залежить від багатьох факторів – вік, генетичні особливості хворої, характер і поширеність патологічного процесу, медикаментозне лікування, джерело отримання та особливості виділення та експансії МСК *in vitro* та *in*.

МСК експресують широкий спектр молекул клітинної адгезії, рецепторів ростових факторів, які важливі в клітинній взаємодії та хоумінгу. МСК проявляють високу експресію інтегринів $\alpha 1$, $\alpha 5$ і $\beta 1$ (CD29); низьку експресію $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 6$, αV , B2 і B4 і не експресують $\alpha 4$, aL і $\beta 2$. Ці дані вказують на ключові механізми взаємодії МСК з іншими типами клітин, при їх системному введенні, зокрема МСК вибірково репопулюють у ділянці

тканинного пошкодження незалежно від типу тканини. Разом з тим, МСК володіють імуномодулюючим ефектом *in vitro* та здатні пригнічувати проліферацію активованих лімфоцитів і функціональну активність зрілих Т-клітин [85]. При цьому, трансплантовані МСК здатні не тільки безпосередньо замінювати пошкоджені клітини, але й змінювати клітинне мікрооточення шляхом секреції різних факторів, тим самим слугують найважливішим джерелом факторів росту й цитокінів, які беруть участь у регуляції регенерації тканин.

МСК продукують фактори, необхідні для самопідтримки гемопоетичних стовбурових клітин та утримання їх у ніші, зокрема, SDF-1a (фактор стромы – 1a), SCF (фактор стовбурових клітин), ангіопоетин – 1 і інтерлейкін – 7. МСК продукують ангіогенні та нейротрофні фактори росту, зокрема, VEGF (фактор росту судинного ендотелію), bFGF (основний фактор росту фібробластів), HGF (фактор росту гепатоцитів), NGF (фактор росту нервів), BDNF (нейротрофний фактор головного мозку) та GDNF (нейротрофний фактор) [35].

Через значну кількість ускладнень, що можуть виникнути після застосування гормональної замісної терапії, на сьогодні важливим завданням є пошук альтернативних методів лікування передчасної недостатності яєчників, таких як: клітинна і тканинна терапія, які мають меншу кількість ускладнень та віддалених наслідків.

Значний обсяг ускладнень гормонозамісної терапії, а саме: підвищення ризику розвитку раку молочної залози та ендотеліальної дисфункції, які призводять до збільшеної клітинної адгезії, та, згодом, - до серцевих ускладнень: інсультів, інфарктів, артеріальних захворювань і венозних тромбоемболій. Крім того, гормонозамісна терапія сприяє патологічним змінам в органах-мішенях, одним з яких є печінка. При використанні гормонів для лікування передчасної недостатності яєчників, через явище "першого проходження через печінку", відбуваються значні метаболічні перетворення, що особливо стосується ліпідного обміну.

Вищенаведене обумовлює актуальність питання щодо пошуку альтернативних методів лікування ПНЯ, таких як клітинна та тканинна терапія, які б мали менше ускладнень та віддалених наслідків.

Таким чином, одним з важливих завдань сучасної гінекології є пошук більш безпечних методів лікування ПНЯ, які, сприяючи покращенню репродуктивної функції, не мали б негативного впливу на функціонування інших важливих органів і систем організму.

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

Робота є фрагментом науково-дослідної роботи кафедри акушерства та гінекології №2 Харківської медичної академії післядипломної освіти «Експериментальне обґрунтування та клінічне застосування біотехнологічних препаратів у відновленні фертильності у пацієнок репродуктивного віку при ендоскопічному лікуванні матки та додатків». Номер дежреєстрації 0118U000316.

Мета дослідження: відновлення функції репродуктивних органів та органів детоксикації самиць мишей, поліпшення їх поведінкових реакцій в експериментальній моделі передчасної недостатності яєчників за допомогою введення кріоконсервованого екстракту плаценти та мезенхімальних стовбурових клітин жирової тканини .

Завдання дослідження:

1. Вивчити вплив кріоконсервованого екстракту плаценти, введеного парентерально, на відновлення овуляторного циклу, статевої активності та морфологічної структури репродуктивних органів та органів детоксикації (печінки та нирок) самиць мишей лінії BALB-c із моделлю ПНЯ.
2. Вивчити вплив мезенхімальних стовбурових клітин жирової тканини, введених інтраперитонеально, на відновлення овуляторного циклу, статевої активності та морфологічної структури репродуктивних органів

та органів детоксикації (печінки та нирок) самиць мишей лінії BALB-c із моделлю ПНЯ.

3. Вивчити вплив мезенхімальних стовбурових клітин жирової тканини, введених інтраовуляторно, на відновлення овуляторного циклу, статевої активності та морфологічної структури репродуктивних органів та органів детоксикації (печінки та нирок) самиць мишей лінії BALB-c із моделлю ПНЯ.
4. Вивчити вплив кріоконсервованого екстракту плаценти, введеного парентерально, мезенхімальних стовбурових клітин жирової тканини, введених інтраперитонеально та інтраовуляторно, на динаміку ваги та поведінкові реакції самиць мишей лінії BALB-c із моделлю ПНЯ.
5. Визначити доцільність використання кріоекстракту плаценти та мезенхімальних стовбурових клітин жирової тканини в комплексі заходів, спрямованих на ревіталізацію органів репродуктивної системи, органів детоксикації, а також на покращення якості життя при лікуванні ПНЯ.

Об'єкт дослідження: вплив методів клітинної та плацентарної терапії на фертильність самиць мишей лінії BALB-c із модельованою ПНЯ.

Предмет дослідження: морфологічні характеристики репродуктивних органів (матки та яєчники) та органів детоксикації (нирки та печінка) самиць мишей лінії BALB-c із моделлю ПНЯ, їх овуляторний цикл, статева активність, вага та поведінка.

Методи дослідження: експериментальні (гістоморфологічні, кольпоцитологічні, методика підрахунку вагінальних пробок, вимір динаміки ваги тварин, поведінкові тести: “відкрите поле”, анксиолітичний та зоосоціальний); статистичні.

Наукова новизна отриманих результатів

У дослідженні виявлено, що моделювання ПНЯ із застосуванням ХТП вірогідно погіршує загальний стан тварин, знижує вагу (на 15,0%), пригнічує

поведінкові реакції, призводить до посилення тривоги (на 41,4%), погіршує зоосоціальну поведінку (на 60,8%).

Уперше було виявлено, що лікування тварин КП та МСК дозволяє вірогідно покращити поведінкові реакції та нормалізувати вагу: лікування КП прискорює нормалізацію ваги (на 4,3%), веде до покращення показників анксиолітичної поведінки (на 69,5%), покращує зоосоціальну поведінку (на 42,0%).

Уперше виявлено, що лікування тварин МСК ЖТ шляхом перитонеального введення прискорює нормалізацію ваги (на 4,8%), покращує зоосоціальну поведінку (на 10,0%), але не призводить до покращення показників анксиолітичної поведінки.

Уперше виявлено, що лікування тварин МСК ЖТ шляхом інтраоваріального введення прискорює нормалізацію ваги (на 7,5%), покращує зоосоціальну поведінку (на 40,0%), веде до покращення показників анксиолітичної поведінки (на 60,9%).

Уперше виявлено, що при лікуванні КП та інтраперитонеальним введенням МСК ЖТ естральний цикл відновлювався до 80% на 8-му тижні експерименту, а при інтраоваріальному введенні МСК ЖТ процес відновлення відбувався на 7-му тижні та естральний цикл відновився у 80% мишей.

Уперше виявлено, що статева активність після хіміотерапії та лікування КП на 8-й тиждень відновилася у 60% мишей, а при лікуванні МСК ЖТ - у 80% тварин.

При гістологічному дослідженні мікропрепаратів мишей після лікування КП уперше виявлено наявність незначної атрофії ендометрію, потовщення міометрію, появу в яєчниках фолікулоподібних утворень.

Уперше виявлено, що лікування МСК ЖТ шляхом інтраперитонеального введення привело до незначної атрофії ендометрію матки та появи структурних елементів у яєчниках: жовтих тіл, примордіальних та первинних фолікулів.

Уперше виявлено, що при інтраоваріальному введенні МСК ЖТ матка морфологічно була близька до інтактною, а в яєчниках відзначалася поява значної кількості первинних фолікулів та поодиноких вторинних фолікулів.

Уперше виявлено, що при застосуванні КП та інтраперитонеальному введенні МСК ЖТ у печінці відзначалося збереження балкової структури, спостерігалися клітинний поліморфізм та підвищена неоднорідність, набряк.

Уперше виявлено, що інтраоваріальне введення МСК ЖТ мало суттєву ревіталізуючу дію на тканину печінки піддослідних тварин: на 8-му тижні після початку лікування спостерігалися ознаки інтенсивного ділення клітин, відсутність набряку та холестеринової мікроемболії.

Гістологічні дослідження нирок мишей після лікування застосуванням КП парентерально і МСК ЖТ інтраперитонеально виявили наявність незначного набряку, зморщування окремих клубочків. Однак, вперше виявлено, що інтраоваріальне введення МСК ЖТ приводило до збереження структури нирок та відсутності в них патологічних змін.

Практичне значення отриманих результатів

Практичне значення отриманих результатів полягає в тому, що виконане експериментальне дослідження дозволяє визначити введення клітинної та плацентарної терапії пацієнткам з ПНЯ як перспективний, патогенетично обґрунтований лікувальний метод для відновлення репродуктивної та детоксикаційної функцій, а також якості життя. Виявлені ефекти терапевтичної дії КП та МСК жирової тканини можуть використовуватися в розробці нових та вдосконаленні існуючих методів лікування ПНЯ та її ускладнень. Удосконалення алгоритму лікувальних заходів у жінок з ПНЯ мають бути спрямовані на своєчасне відновлення репродуктивної, детоксикаційної функції, що буде сприяти зниженню ускладнень та підвищенню якості життя жінок з ПНЯ.

Матеріали дисертації впроваджено в практику роботи КНП «Міський клінічний пологовий будинок № 2 ім. М. Х. Гельферіха» ХМР (м. Харків).

Особистий внесок дисертанта

Дисертаційна робота є самостійним і оригінальним науковим дослідженням. Автором самостійно знайдено та проведено аналіз вітчизняних та закордонних літературних джерел, здійснено патентно-інформаційний пошук з досліджуваної теми, визначена тема роботи, обґрунтована мета, завдання та методологія наукового дослідження. Дисертантом проведено експериментальне дослідження на 50 самицях мишей у віварії ІПКіК НАН України, ТОВ "Інститут кліткової біореабілітації" та на кафедрах патологічної анатомії ХМАПО. На підставі результатів проведених досліджень здобувачем особисто оформлені розділи дисертації, сформульовано наукові положення, висновки та практичні рекомендації, підготовлені матеріали до публікації. Самостійно розроблені нововведення та впроваджено їх в практику роботи пологового будинку.

Апробація результатів дисертації

Основні матеріали дисертаційного дослідження доповідалися на наступних конгресах та конференціях: науково-практичній конференції «Uzhgorod medical students conference» (Ужгород, 2023); науково-практичній конференції молодих вчених з міжнародною участю «Медицина XXI століття» (Харків, 2019); I Міжнародній науково-практичній конференції "Debats scientifiques et orientations prospectives du developpement scientifique" (Париж, 2021); Всеукраїнській науково-практичній internet-конференції «Фізіологія, валеологія, медицина: сучасний стан та перспективи розвитку» (Харків, 2021); 24th International medical students' conference (IMSC) (Cracow, Poland, 2016); XXIII International Scientific And Practical. Conference Of Young Scientists And Student «Topical Issues Of New Drugs Development» (Kharkiv, 2016); XIII З'їзді онкологів та радіологів України (Київ, 2016); International Medical Conference «Biomedical perspectives III» (Суми, 2021).

Публікації результатів дослідження

За матеріалами дисертації опубліковано 16 наукових праць, з яких 4 статті надруковано в провідних наукових фахових виданнях, рекомендованих МОН України, 2 статті – у виданнях, що входять до наукометричної бази «Scopus», у збірниках науково-практичних конференцій опубліковано 8 тез, які пов'язані з виконаною роботою, додатково відображають наукові результати дисертації 2 патенти України на винахід.

Обсяг та структура дисертації

Дисертаційна робота викладена на 158 сторінках комп'ютерного тексту. Складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів та методів дослідження, 3 розділів власних досліджень, аналізу та узагальнення отриманих результатів, висновків, практичних рекомендацій, списку використаної літератури, який містить 222 джерела, з яких 42 кирилицею, 180 – латиницею. Дисертацію ілюстровано 5 таблицями та 31 рисунком.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

Передчасна недостатність яєчників (ПНЯ) – багатофакторний синдром, який характеризується вторинною аменореєю, високим рівнем гонадотропінів і низькою концентрацією естрогенів у сироватці крові жінок, віком до 40 років [21, 51, 87, 98, 121, 130].

1.1. Епідеміологія синдрому передчасної недостатності яєчників

Поширеність ПНЯ в дівчат в підлітковому віці становить 0,01%, а в жінок залежно від віку: до 20 років – 1:10000, 30 років – 1:1000, 40 років – 1%. Середній вік формування ПНЯ становить $26,8 \pm 1,6$ року [71, 78].

Перехресне обстеження жінок у віці 40-55 років, проведене в США, показало, що поширеність ПНЯ варіюється залежно від етнічної приналежності, коливаючись від 1,4% серед жінок афроамериканського та латиноамериканського походження, до 1,0% – серед жінок європейського походження, 0,5% – серед жінок, що походять з Китаю, та 0,1% – серед жінок, що походять з Японії [107]. Згідно з різними дослідженнями, середній вік настання менопаузи серед індійських жінок становить від 40 до 47 років [116].

Частота випадків спонтанного виникнення ПНЯ збільшується з підвищенням рівня успішного лікування раку в дівчат та молодих жінок [127].

1.2. Етіологія та патогенез передчасної недостатності яєчників

1.2.1. Генетичні чинники

Передчасна яєчникова недостатність може мати генетично обумовлене, автоімунне, ідіопатичне, функціональне (зниження маси тіла, фізичне навантаження, вплив лікарських препаратів) походження [77, 88, 122, 137, 145].

Виділяють дві основні форми передчасної недостатності яєчників: першу форму, що характеризується зменшенням кількості або відсутністю фолікулів, причинами якої є генетичні відхилення, наслідки хіміотерапії, променевої терапії, перенесені хірургічні втручання на яєчниках. Друга форма — та, при якій кількість фолікулів не змінено, а найчастішою причиною ПНЯ є аутоімунні захворювання, які пошкоджують зрілі фолікули, але залишають примордіальні фолікули інтактними [74, 99, 197].

Зниження оваріального резерву в дівчаток із вторинною аменореєю спостерігається у 9,7% випадків. Як прогностичні критерії внутрішньоутробного формування неповноцінності гонад необхідно розглядати довгострокову поточну загрозу переривання й перенесені інфекції в ранньому терміні вагітності, плацентарну недостатність, прееклампсію, гіпоксію, гіпотрофію плода і його незрілість. У пубертатному періоді в якості причин зниження оваріального резерву можуть бути перенесені вірусні захворювання: епідемічний паротит і краснуха; ендокринна патологія — цукровий діабет і гіпотиреоз; шкідливі звички, а до особливо агресивних чинників відносяться оперативні втручання на яєчниках, хіміотерапія [114].

Хромосомні аномалії в структурі причин ПНЯ посідають 10-13% [59, 101, 148, 187].

У 80% жінок виникнення ПНЯ пов'язано з батьківською Х-хромосою [191]. Пов'язані з Х-хромосою дефекти відіграють важливу роль у цих генетичних патогенезах, які включають Х-моносомію (так званий синдром Тернера), трисомію, мозаїцизм і делеції Х-хромосоми. На сьогоднішній день не доведено участь у розвитку ПНЯ окремої ділянки або гена на Х-хромосомі. Це може бути будь-який структурний дефект Х-хромосоми: Х-моносомія (синдром Тернера), трисомія, мозаїцизм або делеція Х-хромосоми [99, 134, 211]. Оваріальна функція в більшості пацієнток із трисомією по Х-хромосомі не порушена, але вона може маніфестувати як рання менопауза, вторинна аменорея або олігоменорея [147]. Найчастіше в

пацієнок із ПНЯ спостерігаються зміни таких генів: FOXP3a, INHA, FMR1, BMP15, MSH5 [65, 71, 73, 98, 161, 170, 207, 213].

Первинна яєчникова недостатність, асоційована із синдромом ламкої Х-хромосоми, являє собою клінічний стан, що виникає в жінок – носіїв мутації гена FMR1 і характеризується зниженням функції яєчників [100, 162, 172, 196].

У жінок з ПНЯ в 20-25% випадків виявляється поліморфізм гена андрогенових рецепторів [21].

Певне значення у виникненні в пацієнок ПНЯ мають порушення функціонування рецепторів. Дефект гена ФСГ рецептора знижує здатність рецепторів, щоб пов'язувати ФСГ або активувати сигнальні шляхи, погіршуючи його функцію [71, 106, 107]. Аномалії розвитку рецептора ЛГ призводять до порушення овуляції, передчасного дозрівання ооцитів, а отже, - до порушень менструального циклу, безпліддя, розвитку ПНЯ [71, 106]. Фактор росту і диференціювання 9 (GDF9) (5q31.1) експресується в ооцитах і є геном-кандидатом для розвитку ПНЯ в пацієнок європейських, кавказьких та азійських країн [148].

1.2.2. Імунологічні чинники

Певне значення в етіології ПНЯ мають автоімунні захворювання. Автоантитіла до антигенів яєчника виявляються в 7-14,9% хворих із ПНЯ, а в 17,6% присутня супутня екстрагенітальна автоімунна патологія, а саме: хронічний кандидоз, вітиліго, алопеція, автоімунні гемолітичні анемії, системний червоний вовчак, синдром Шегрена, міастенія Гравіс, хвороби Крона, автоімунний гепатит та ін. [21, 99]. Антигенними мішенями для антитіл при автоімунній ПНЯ є: стероїдпродукуючі клітини; 3 β -гідроксистероїд дегідрогенази; гонадотропіновий рецептор блокуючих антитіл (дуже рідко), антигени пелюцида і жовтого тіла [63].

Автоантитіла до стероїдів продукуються клітинами широко поширеними у хворих із ПНЯ, які страждають на хворобу Аддісона. При

автоімунному оофориті лімфатична інфільтрація обмежується середніми та антральними фолікулами, які мають тека-клітини. Це доводить, що стероїдпродукуючі клітини експресують антигени, які стимулюють імунну відповідь. Виявлення автоімунних автоантитіл до пелюцида у хворих із ПНЯ варіює від 7 до 67% [84].

Поширеність ПНЯ сягає в 60-70% випадків у пацієток з галактоземією. Це може бути пов'язано з токсичною дією галактози (або одного з метаболітів) на фолікулярні структури, зменшення початкового числа овогоній під час ембріонального періоду, прискорення фолікулярної атрезії після народження та до статевого дозрівання [84].

1.2.3 Хіміотерапія

Достовірне порушення функції фолікулів відзначається після використання хіміотерапевтичних препаратів (алкілюючих засобів або прокарбазину), при цьому, чим молодше пацієтка під час проведення хіміотерапії, тим вище ймовірність «виживання» окремих фолікулів [70]. При проведенні хіміотерапії з приводу злоякісних новоутворень у дитинстві ПНЯ розвивається в 6,3% – 8,0% пацієток. У групі дівчаток, які отримали алкілюючі препарати та променеву терапію на ділянку малого таза, частка пацієток з ПНЯ збільшується до 30,0% [31].

Передбачається, що під впливом ХТП фолікули, які вступили у фазу зростання або знаходяться в ранній фазі стимуляції гіпофізом, піддаються атрезії, через це знижується секреція естрадіолу та інгібіну В, що, у свою чергу, призводить до підвищення концентрації фолікулостимулюючого гормону (ФСГ) унаслідок негативного зворотного зв'язку. Підвищений рівень ФСГ викликає надмірне утворення фолікулів і подальшу їх загибель під впливом хіміопрепаратів. Більш того, збереження менструальної функції після ХТП ще не означає, що яєчники не пошкоджені. Часткова втрата резерву примордіальних фолікулів може призвести до ранньої менопаузи (відстрочена реакція на лікування) [9, 150].

Цитостатична терапія, пригнічуючи функцію яєчників, істотно впливає й на характер менструального циклу. Так, у жінок молодше 25 років, які отримували в якості первинного лікування стандартну поліхіміотерапію з включенням алкілюючих препаратів, аменорея виникає у 28% випадків, у жінок старше 25 років – у 86% і в пацієток старше 40 років – майже в 100% спостережень. Подібні закономірності відзначені й при застосуванні променевої терапії: опромінення пахово-клубових ділянок у дозі більше 40-50 Гр викликає стійку аменорею в 40% жінок до 20 років і у 90-95% жінок у віці старше 35 років. Яєчникова недостатність триває від декількох місяців до 3 років у молодих жінок або стає незворотною в більшості пацієток старше 35 років [7]. Зміни оваріального резерву спостерігаються також у жінок з трубною вагітністю, що отримували ін'єкції метотрексату [142].

1.2.4. Ятрогенні чинники

Розвиток ПНЯ різного ступеня вираженості спостерігається в пацієток з видаленими матковими трубами при виконанні оперативних втручань з приводу трубної вагітності. З виразністю порушення стану яєчників після оперативного лікування трубної вагітності корелюють величина крововтрати та вік пацієнтки. Найбільш виражені зміни відбуваються в яєчнику на стороні видаленої маткової труби. Порушення кровотоку в контрлатеральному яєчнику мають вторинний характер. Нормальний менструальний цикл відновлюється в 68% хворих, які перенесли односторонню тубектомію та у 85% пацієток, які перенесли консервативно-оперативне втручання на маткових трубах. Крім цього, ПНЯ може розвиватися у хворих з трубною вагітністю при її лікуванні метотрексатом [142].

1.2.5. Ідіопатичні чинники

У фолікулах пацієток з ПНЯ порушений процес нормального стероїдогенезу, у результаті цього або відбувається їх атрезія, або формується синдром «пустого фолікула». Виявлення лютеїнізації незрілих

фолікулів під час гістологічного дослідження в деяких хворих дозволило висловити припущення про те, що при ідіопатичній формі ПНЯ провідним патофізіологічним механізмом прискореної атрезії фолікулів є їх передчасна лютеїнізація. Вона може бути викликана ослабленням негативного зворотного зв'язку з лютеїнізуючим гормоном за рахунок як зниження числа примордіальних фолікулів, так і погіршення їх якості [21].

Одним із механізмів розвитку ПНЯ вважається порушення продукції цитокінів, які модулюють гонадотропін-опосередкований контроль функції яєчників і, як правило, діють як інгібітор. Овуляція розглядається як запальний процес із залученням до нього цитокінів, а порушення їх продукції може порушувати функцію яєчників і викликати ПНЯ, прискорюючи фолікулярну атрезію або порушуючи фолікулогенез [83].

1.3. Клініка розвитку передчасної недостатності яєчників

ПНЯ вперше був визначений де Мораесом-Рухсеном та Джонсом у 1967 р. як нефізіологічна аменорея до віку 40 років, але після статевого дозрівання. У 1939 р. профіль гормонів у жінок з ПНЯ був описаний як гіпергонадотропний гіпоестрогенізм. У 1950 р. клінічні особливості ПНЯ були детально обговорені автором Atria A., який повідомив про випадки у 20 молодих жінок до 35 років із вторинною втратою менструацій, припливами, безпліддям та атрофією ендометрію [113].

Більшість пацієнок початок захворювання пов'язують зі стресом, важкими вірусними інфекціями і т. ін. Зазвичай, перша менструація настає своєчасно, а через 5-10 років розвивається аменорея, але у 84% хворих бувають епізодичні менструації. Пацієнтки з ПНЯ правильної статури, задовільного харчування, з добре розвиненими вторинними статевими ознаками [37]. Більшість жінок не мають будь-яких симптомів. Проте при неналежному лікуванні пацієнок з ПНЯ, типові симптоми нестачі естрогену можуть бути присутніми. Вони включають у себе дратівливість, нервозність, припливи, неспокій, безсоння, депресію, втрату лібідо, втрату концентрації

тощо. Фізичне обстеження може виявити витончення шкіри, зниження ваги, остеопенії і т.д. [191].

Дефіцит естрогену призводить до перших симптомів: припливів, надмірного потовиділення, нервозності, зниження лібідо, слабкості, сухості шкіри та слизової оболонки.

Крім того, передчасний дефіцит естрогену призводить до зниження мінеральної щільності кісток (остеопенія, остеопороз). Навіть у молодих жінок із ПНЯ суттєво знижується мінеральна щільність кісток, тому в цих випадках необхідне проведення денситометрії. Доведено, що в пацієнток із ПНЯ ризик переломів вищий, ніж у жінок, у яких остеопороз розвивався з інших причин, окрім ПНЯ (таких як: гіпертиреоз, лікування стероїдами, гіперпаратиреоз). Цим пацієнткам також необхідно виміряти рівень вітаміну 25ОНD3. Таким чином, можна усунути можливий дефіцит та запобігти втраті кісткової маси.

Недостатній рівень естрогену пов'язаний із порушенням обміну речовин, що призводить до серцево-судинних захворювань, таких як: атеросклероз, гіперхолестеринемія, а також уrogenітальна атрофія, зокрема сухість піхви та інфекції.

Автоімунний гіпотиреоз – це захворювання, яке найчастіше асоціюється з ПНЯ, тому рекомендується проводити скринінг шляхом вимірювання рівня ТТГ, вільного Т4, антитиреоїдної пероксидази та антитілоглобулінових антитіл. Захворювання, яке найчастіше асоціюється з ПНЯ, це целиакія [113].

У жінок з ПНЯ приблизно в 50% випадків періодично виникають овуляторні цикли, однак відсоток настання вагітності вкрай невисокий і не перевищує 5-10%. За даними літератури, самотійно або на тлі замісної гормональної терапії (ЗГТ) вагітність настає в 5,2 і 3,3% випадків відповідно [21, 137].

1.4. Діагностика синдрому передчасної недостатності яєчників

Згідно з рекомендаціями ESHRE (2016), діагностичними критеріями передчасної недостатності яєчників є:

- олігоменорея або відсутність менструацій протягом 4-х місяців;
- рівень ФСГ більше 25 МО/мл у 2-х дослідженнях з інтервалом не менше 4 тижнів [200].

При обстеженні пацієток із ПНЯ за тестами функціональної діагностики виявляються ознаки гіпофункції яєчників: витончення слизових оболонок вульви і піхви, слабопозитивний феномен «зіниці», низькі показники КПП (від 0 до 25%). При гінекологічному дослідженні, ехографії, лапароскопії матка і яєчники дещо зменшені [7].

Оцінка резерву яєчників проводиться на третій день циклу шляхом визначення рівнів антимюллерового гормону (АМГ), фолікулостимулюючого гормону (ФСГ), кількості антральних фолікулів, тесту на інгібін В та естрадіолу (Е2). При первинній нефропатії (ПНЯ) спостерігається підвищення рівня ФСГ (ФСГ > 25 МО/л), зниження рівня Е2 (< 20 пг/мл), значне зниження рівня АМГ (< 1 нг/мл), зменшення рівня інгібіну В та низька кількість антральних фолікулів [96,137].

АМГ – це глікопротеїн, що продукується клітинами гранульози преантральних та дрібних антральних фолікулів. АМГ належить до групи факторів росту та диференціації пептидів. Рівень АМГ не залежить від дня циклу. Його концентрації зменшуються з віком, що робить його дуже хорошим маркером для визначення зниження фертильності, включаючи передчасну недостатність яєчників. У пацієток із ПНЯ рівень АМГ дуже низький або незначний. У жінок, які страждають синдромом полікістозних яєчників (СПКЯ), рівень АМГ значно підвищений, оскільки цей стан характеризується надмірною кількістю фолікулів яєчників (однак фолікулогенезу немає). На цей час вважається, що АМГ є найкращим маркером для оцінки яєчничового резерву [96, 137].

Рівень ФСГ може змінюватися залежно від циклу. Загальновизнано, що рівень $\text{ФСГ} > 15 \text{ МО / л}$ є ненормальним, а при $\text{ФСГ} > 20 \text{ МО / л}$ шанси завагітніти дуже малі. За деякими даними, вважається, що запас яєчників зменшується навіть при рівні $\text{ФСГ} > 10 \text{ МО / л}$. Жінки з низьким оваріальним резервом нерідко виявляють нормальну концентрацію ФСГ. Із цієї причини для оцінки яєникового резерву слід вимірювати рівні ФСГ та АМГ [96, 137].

Низький рівень Е2 є наслідком розладів яєчників у випадках, коли механізм зворотного зв'язку стимулює гіпофіз до секреції гонадотропного гормону (високий рівень ФСГ) [93, 96].

Інгібін В також корисний для оцінки запасу яєчників. Однак його вимірювання залежить від фази циклу, оскільки він виробляється гранульозними клітинами ранніх антральних фолікулів, головним чином у фолікулярній фазі менструального циклу. На ранній фолікулярній фазі рівні інгібіну В відображають кількість і якість фолікулів яєчників. Отже, у пацієнтів з ПНЯ знижується рівень інгібіну В [76, 96, 113].

1.5. Лікування передчасної недостатності яєчників

1.5.1. Гормональна терапія

Для лікування пацієток із ПНЯ та стимуляції овуляції використовується замісна гормональна терапія: естрогени, дигідроепіандростерон, оральні контрацептиви, кломіфенцитрат, гонадотропіни [105, 188, 200]. Пероральний, трансдермальний або періодично вагінальний естрадіол є терапією вибору. Призначення трансдермального естрадіолу в дозі 100 мкг на день з додаванням прогестерону в циклічному режимі протягом 10-12 днів кожного місяця (або гель прогестерону 100-200 мкг/добу протягом 12-14 днів) має захисний вплив у відношенні розвитку гіперплазії та раку ендометрію. Але тривала гормонозамісна терапія має багато побічних дій. Наприклад, може збільшити ризик раку молочної залози або інших захворювань. У той же час, проводячи замісну гормональну терапію пацієткам із ПНЯ, особливу увагу необхідно

приділяти рівню С-реактивного білка, оскільки він запускає індукцію ендотеліальної дисфункції, підвищуючи синтез молекул клітинної адгезії та призводить до міокардіальної катастрофи, інсультів, захворювань артерій. Це пов'язано з тим, що стероїди чинять і низку негативних ефектів – підвищують рівень тригліцеридів і С-реактивного білка, збільшують рівень протромбіну та зменшують уміст антитромбіну ІІІ, сприяючи підвищенню ризику ішемічних уражень і венозних тромбоемболій [3].

1.5.2 Інші методи лікування

Через наявність у 30-40% пацієток із ПНЯ супутньої аутоімунної патології позитивний ефект на результат лікування ПНЯ надає імуномодуюча терапія (з метою індукції овуляції), включаючи високі дози кортикостероїдів та внутрішньовенне лікування імуноглобулінами [76].

Нещодавно мелатонін був описаний як спосіб лікування у випадку перименопаузи. Повідомляється, що він позитивно впливає на функцію щитовидної залози та підвищує рівень гонадотропіну. За деякими даними, мелатонін також корисний для відновлення фертильності та менструацій, а також для профілактики депресії, пов'язаної з менопаузою. Введення 3 мг мелатоніну щодня протягом шести місяців призвело до зниження рівня ЛГ у жінок 43-49 років (перименопауза), цього не спостерігалось в жінок після менопаузи (у віці 50-62 років). Нижні рівні ФСГ були виявлені в жінок із первинно низькими концентраціями мелатоніну. У всіх випадках введення мелатоніну призводило до вищих концентрацій гормонів щитовидної залози. Мелатонін іноді називають гормоном, що утримує час, оскільки він регулює секрецію гонадотропінів гіпофізом [54].

Поєднання плазми, насиченої тромбоцитами та мононуклеарними клітинами периферичної крові, має синергетичний ефект на відновлення фолікулогенезу при трансплантації в циклофосфамід-індукованій моделі ПНЯ [109].

Одним з новітніх підходів до лікування ПНЯ є використання кріоекстракту плаценти та її складових. В експериментальних дослідженнях був підтверджений терапевтичний ефект використання екстракту плаценти та покращення оваріальної функції в мишей із моделлю ПНЯ [126, 216].

1.5.3. Плацентарна терапія

Клітини та продукти, отримані з плаценти, сприяють розвитку структур *de novo* та ефективній перебудові існуючих тканин за допомогою кількох механізмів. Серед них можна виокремити плацентарні фактори росту різних класів, високий рівень анаболічних процесів та контроль над процесами апоптозу. Плацентарні клітини взаємодіють з апоптотичними сигналами, ініціюючи та активуючи процес апоптозу. Важливою рисою плацентарних макрофагів є їх здатність виявляти (завдяки певним поверхневим молекулам) та поглиблювати апоптотичні клітини. Цей процес відрізняється від фагоцитозу некротичних змін у клітинах та екзогенних мікроорганізмів, який супроводжується виділенням запальних медіаторів. Поглибленням апоптотичних клітин плацентарні макрофаги призводять до пригнічення вироблення запальних медіаторів та індукції протизапальних цитокінів.

Екстракти плаценти, завдяки високому вмісту біологічно активних речовин, таких як білки, пептиди, РНК, ДНК, полідезоксирибонуклеотиди (PDRN), амінокислоти, ферменти та мікроелементи, виявляють активність в антиоксидантному, протизапальному та тромболітичному спрямуваннях, а також виступають як стимулюючий фактор для репарації тканин. Екстракти плаценти людини здатні пригнічувати гідроксильні, супероксидні радикали, а також окис азоту; відновлювати тривалентне залізо та ABTS+-радикал; хелатувати іони металів змінної валентності; запобігати перекисному окисленню ліпідів. Кріоекстракт плаценти, будучи одним з найбільш простих у зберіганні та використанні кріопрепарат, має виражені імунокоригуючі та регенеративні властивості, вигідно відрізняючись від препаратів, що піддаються термічній обробці. Використання кріоекстракту плаценти

призводить до стимуляції метаболізму та посиленню мікрогемоциркуляторного русла в різних органах і тканинах, нормалізує антиокислювальну активність й активність супероксиддисмутази в сироватці крові, серці й печінці експериментальних тварин [23].

1.5.4. Терапія стовбуровими клітинами

Одним з перспективних методів терапії ПНЯ є трансплантація стовбурових клітин, що покращує функцію яєчників за рахунок збільшення експресії споріднених гормонів та запобігання апоптозу гранульозних клітин, що свідчить про їх терапевтичний потенціал [74, 81, 88, 93, 132, 136, 180, 186, 217].

Терапевтичні ефекти МСК можна виміряти кількома факторами, такими як фолікулогенез, рівень апоптозу гранульозних клітин, судинне утворення, рівень вагітності та регуляція рівня гормонів [64, 82, 88, 141, 220]. Фолікулогенезу сприяє трансплантація стовбурових клітин, що може прискорити оогенез або підготувати адекватне середовище. Відомо, що МСК жирової тканини підвищують ригідність клітин тека та гранульозних клітин, що призводить до виникнення оптимального середовища для фолікулогенезу [108].

Терапевтичний потенціал МСК можна розподілити на дві складові. Одна пов'язана з їх замісною функцією – здатністю диференціюватися та заміщати пошкоджені клітини. Механізм хоумінга МСК: вони вибірково репопулюють клітини в місця пошкодження незалежно від типу тканини та диференціюються *in vivo* імплантованих клітин під впливом місцевих сигналів.

Друга обумовлена паракринною дією – формою міжклітинного взаємозв'язку, при якому клітина передає сигнал сусідній клітині, тим самим змінює її поведінку [53, 131, 158, 164]. Паракринні фактори (сигнальні молекули) діють шляхом дифузії і тому впливають на найближчі клітини мікрооточення. Зв'язування паракринного фактору з відповідним рецептором

сусідньої клітини викликає каскад сигнальної трансдукції (signal transduction cascade), метою якого є перетворення сигналу ззовні клітини до функціональної зміни всередині клітини-мішені. Більше ніж 1000 клінічних випробувань щодо застосування МСК для лікування різних захворювань на цей час затверджені Управлінням із санітарного догляду за якістю продуктів та медикаментів (Food and Drug Administration, FDA (США), більшу частину яких складають протоколи лікування, засновані на їх паракринній дії. Паракринна дія МСК реалізується двома шляхами. Перший шлях обумовлений прямою дією розчинних синтезованих та виділених клітинами ростових факторів, хемокінів, цитокінів, об'єднаних терміном «секретом». Другий шлях пов'язаний із дією молекул РНК, мікро-РНК, мембранних рецепторів, ферментів, цитокінів та ростових факторів, інкапсульованих у мембранні мікроезосомы або екзосомы [93, 169, 176].

МСК можуть стимулювати ділення ендогенних СК та клітин-попередників, секретуючи фактор СК (stem cell factor, SCF), колонієстимулюючий фактор макрофагів (macrophage colony-stimulating factor, M-CSF), фактор стромы-1 (stromal cell-derived factor-1, SDF-1), фактор, інгібуючий лейкемію (leukemia inhibitory factor, LIF) та ангіопоетин 1 (angiopoietin1). Імуномодулюючий ефект МСК обумовлений дією індолеамін-2,3-діоксигенази (indoleamine 2,3-dioxygenase, IDO), простагландином E2 (PGE2), трансформуючим фактором росту- β 1 (transforming growth factor, TGF- β 1), LIF, лейкоцитарним антигеном людини G5 (human leukocyte antigen G5, HLA-G5), фактором росту гепатоцитів (hepatocyte growth factor, HGF), білком 6, фактором некрозу пухлин (TSG-6) та оксидом азота (NO). МСК можуть стимулювати місцевий ангіогенез, секрецію екстраклітинного матриксу, фактора зростання судин (VEGF), інсуліноподібного фактору росту 1 (IGF-1), плацентарного фактору росту (placenta growth factor, PLGF), білка 1 хемоатрактанта моноцитів (monocyte chemoattractant protein 1, MCP-1), основного фактору росту фібробластів (bFGF) та ІЛ-6 (IL-6). МСК можуть інгібувати апоптоз, виділяючи фактор

росту гепатоцитів (HGF), трансформуючий фактор росту- β 1 (TGF- β 1), інсуліноподібний фактор росту 1 (IGF-1), основний фактор росту фібробластів (bFGF), фактор росту судин (VEGF) та колонієстимулюючий фактор макрофагів та гранулоцитів (macrophage and granulocyte colony-stimulating factor, GM-CSF) [60, 112, 174, 208]. Крім того, МСК можуть стимулювати цільову міграцію лейкоцитів та моноцитів до місця пошкодження, викликаючи відновлення нормального тканинного гомеостазу.

МСК проявляють антизапальні властивості при високих рівнях прозапальних цитокінів та прозапальні – при їх низьких рівнях. Про- та антизапальний ефекти МСК наведено на рис.1.1. Шлях дії регулюється активацією в МСК толл-подібного рецептора (TLR) внаслідок взаємодії з молекулами (ліпополісахаридами або двохланцюговими РНК вірусу), асоційованими з патогеном.

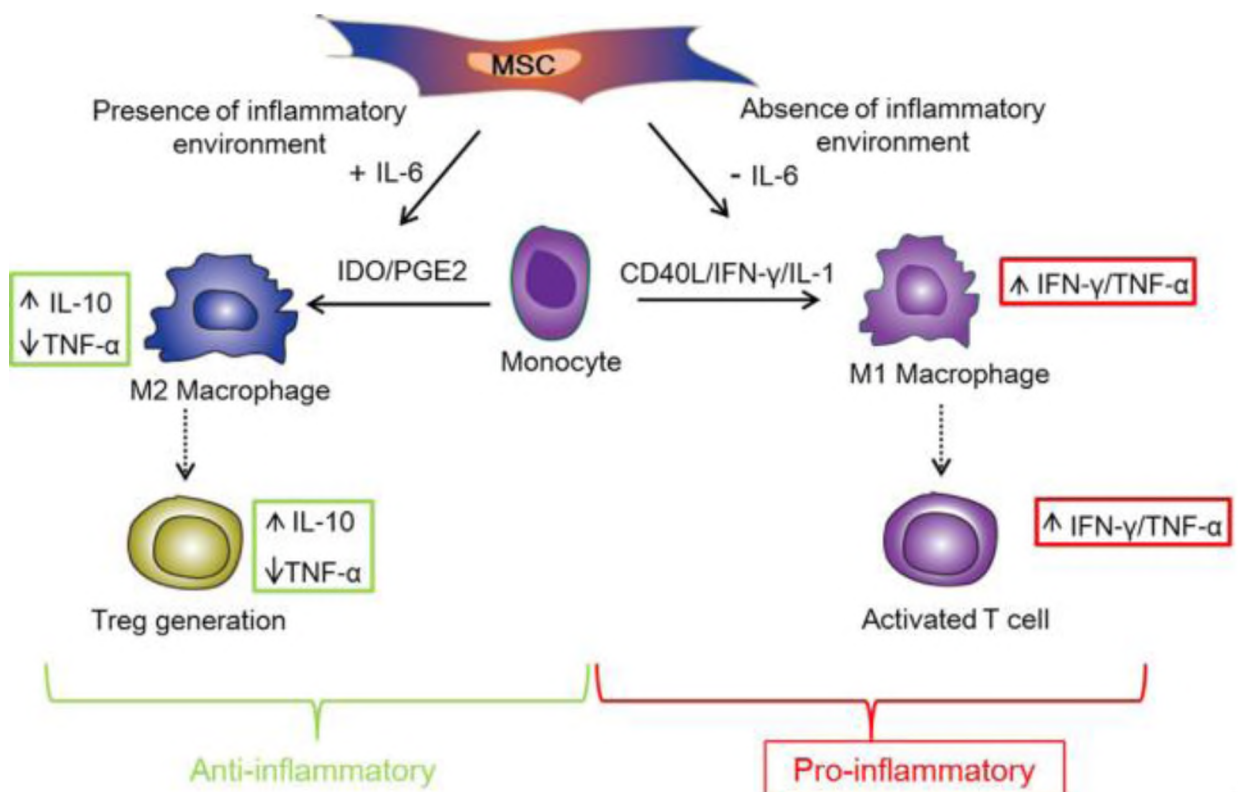


Рис. 1.1. Про- та антизапальний ефекти МСК. (Regmi et al. 2019)

МСК можуть бути примійовані до стимуляції продукції як TLR3, так і TLR4, викликаючи різнонаправлені реакції імунної системи. TLR3-примійовані МСК проявляють протизапальну дію, а TLR4- примійовані МСК – прозапальну дію [18, 164].

У відповідь на розпізнавання мікробної молекули МСК секретують ІЛ-6, ІЛ-8, фактор, інгібуючий міграцію макрофагів (macrophage migration inhibitory factor, MIF), колонієвостимулюючий фактор макрофагів та гранулоцитів (macrophage and granulocyte colony-stimulating factor, GM-CSF) та хемокіни, які прискорюють проліферацію нейтрофілів та моноцитів. Моноцити, залучені в реалізацію імунної відповіді, здобувають прозапальний M1 фенотип та секретують запальні цитокіни та біомолекули, що стимулюють Т-лімфоцити.

Більш того, TLR4-примійовані МСК секретують хемокіни MIP-1 α та MIP-1 β , RANTES, CXCL9, CXCL10, CXCL11, які стимулюють накопичення лімфоцитів у зоні інфекції. При низькому рівні прозапальних цитокінів МСК секретують також NO або IDO, які викликають активацію Т-лімфоцитів та стимулюють наступну імуномодулюючу дію МСК. При сильному запаленні та високому рівню прозапальних цитокінів МСК знижують імунну реакцію, переключаючись на TLR3- примійований антизапальний тип [18, 68, 72, 157, 182].

Таким чином, прозапальний ефект МСК реалізується на ранніх стадіях запалення та інфекційних захворювань, у той час як їх протизапальна дія сприятливо впливає на перебіг пізньої фази запалення, коли надмірна імунна реакція може призвести до пошкодження тканин. Ця унікальна двовекторна дія МСК може бути ефективно застосована для відновлення структури та функціональної спроможності жіночих статевих органів [18, 48, 55, 66, 182].

Кілька досліджень показали паракринну активність стовбурових клітин шляхом виявлення екзосомних мікроРНК із стовбурових клітин у тканинах плода та вивчення їх генів-мішеней. Екзосоми, отримані з МСК амніотичної

рідини, містять miR-146a та miR-10a, які обидва гени-мішені індуюють апоптоз гранульозних клітин [112, 130, 177, 205].

Нещодавні клінічні результати вказують на те, що трансплантація стовбурових клітин покращує функцію яєчників, про що свідчать відновлені менструації, регульований рівень гормонів і, у рідкісних випадках, можливість завагітніти [43, 56, 88, 214, 217].

Дослідження, проведене M. Edessy, оцінювало десять пацієток із ПНЯ ґрунтуючись на оваріальний резерв, зокрема рівні АМГ, ФСГ та Е2 із загальним числом антральних фолікулів та середнім об'ємом яєчників. Результати показали, що серед 10 пацієток 2 відновили менструацію через 3 місяці після трансплантації МСК, а одна завагітніла [85].

МСК є підмножиною негемопоетичних дорослих стовбурових клітин, що походять від мезодерми. Вони здатні до самовідновлення та багатолінійної диференціації не лише на мезодермні лінії, такі як: хондроцити, остецити та адипоцити, але також на ектодермічні клітини та ендодермічні клітини [55, 202].

МСК уперше були виділені з кісткового мозку, і до цього часу вони були виділені з різних тканин, зокрема, жирової тканини, амніона, менструальної крові та пуповини [55, 66, 102, 140, 133, 182, 201].

МСК кісткового мозку людини були першими стовбуровими клітинами, що використовувалися для оцінки терапевтичної здатності МСК у щурів з моделлю ПНЯ, викликаною хіміотерапією. Вони мають високий проліферативний потенціал і здатність диференціюватися в адипоцити, хондроцити та остеобласти [47, 51, 52, 56, 93, 97, 176, 194].

Найбільш очевидним ефектом є факт настання вагітності після лікування МСК. Самицям мишей із моделлю ПНЯ трансплантували МСК кісткового мозку та спарювали зі здоровими тваринами. У цьому дослідженні повідомляється про 100-відсотковий рівень вагітності, указуючи на те, що ці миші з моделлю ПНЯ завагітніли принаймні один раз після трансплантації МСК кісткового мозку. Однак ооцити, вилучені у цих мишей після клітинної

терапії, важко було запліднювати здоровою спермою *in vitro*. Цей висновок свідчить про сучасні обмеження застосування цієї терапії стовбуровими клітинами в процесі ЕКЗ і необхідність подальших досліджень щодо цієї теми [138].

Одним із найновіших терапевтичних підходів є використання МСК з менструальної крові людини. Ангіогенез є компонентом проліферативної фази ендометрію менструального циклу. Таким чином, науковці висунули гіпотезу про існування популяції стовбурових клітин, яку можна виділити з менструальної крові. Головним чином, їх почали використовувати в терапії стовбуровими клітинами тому, що для вилучення цих клітин не потрібні будь-які інвазивні методи. Jalalie et al. повідомили про успішне приживлення МСК менструальної крові, вилучених у жінок у віці 25-35 років, на мишах із моделлю ПНЯ, індукованої циклофосфамідом. Імпантовані МСК пригнічували апоптоз та зупинку клітинного циклу через ЕСМ-залежний сигнальний шлях FAK-AKT [67, 112, 128, 135, 144, 165, 175, 199, 119, 221].

Жирова тканина вважається доступним джерелом МСК. МСК з жирової тканини людини (МСК ЖТ) отримують з підшкірної жирової тканини, видаленої під час операцій ліпосакції або абдомінопластики. У порівнянні з МСК кісткового мозку, МСК ЖТ мають вищі здатності до проліферації та самовідновлення й демонстрували вищу генетичну стабільність у довготривалій культурі. МСК ЖТ експресують CD34, CD14 та CD45, пригнічують проліферацію Т-клітин, секретуючи різноманітні розчинні медіатори, включаючи простагландин E2 (PGE2) та IFN- γ /індолеамін 2,3-діоксигеназу [69, 93, 108, 171, 174].

Процедура отримання МСК з амніону неінвазивна і є вигідним джерелом отримання МСК. Самицям мишей із моделлю ПНЯ трансплантували амніотичні МСК. Результати дослідження показали відновлення рівнів естрогену, ФСГ та коефіцієнту фертильності [79].

МСК пуповини людини – це різновид плюрипотентних стовбурових клітин, які виділяються з пуповини новонароджених. Менш дослідженим

джерелом МСК є строма пуповини, яку також називають желе Уортона, яке походить від позазародкової мезодерми на 13-й день ембріонального розвитку. Менша кількість етичних проблем, безболісне отримання з пуповини та гіпоімуногенність є основними перевагами МСК пуповинної крові. Декілька досліджень показали, що трансплантація МСК пуповини за допомогою колагенових каркасів може підвищити ефективність трансплантації за рахунок поліпшення прикріплення та проліферації клітин. Клінічне дослідження двох груп лікування показало, що в порівнянні з 1-ою групою, яка отримувала просто трансплантацію МСК пуповини інтраоваріально, 2-а група, яка отримувала трансплантацію МСК пуповини з колагеновим каркасом інтраоваріально, показала поліпшення функції яєчників, і одна пацієнтка завагітніла після лікування [80, 86, 112, 120, 130, 137, 163, 168, 214, 218].

Список праць, опублікованих за темою розділу дисертації:

1. Козуб МН, Скибіна КП, Козуб НИ, Прокопюк ВЮ. Реалии и перспективы использования клеточной и тканевой терапии в лечении преждевременной недостаточности яичников (обзор литературы). Збірник наукових праць асоціації акушерів-гінекологів України. 2017;1(35):70-5.
2. Козуб МІ, Граматюк СМ, Гирман ЛІ, Ольховська ВМ, Скибіна КП. Шляхи підвищення ефективності лікування пацієнток з ендометріюїдними кістами яєчників репродуктивного віку (огляд літератури). Збірник наукових праць асоціації акушерів-гінекологів України. 2019;1:43-51. doi: 10.35278/2664-0767.1(43).2019.178055.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Дизайн дослідження

Ураховуючи особливості перебігу ПНЯ та перспективи застосування клітинної та плацентарної терапії, дослідження складалося з трьох етапів (рис. 2.1).

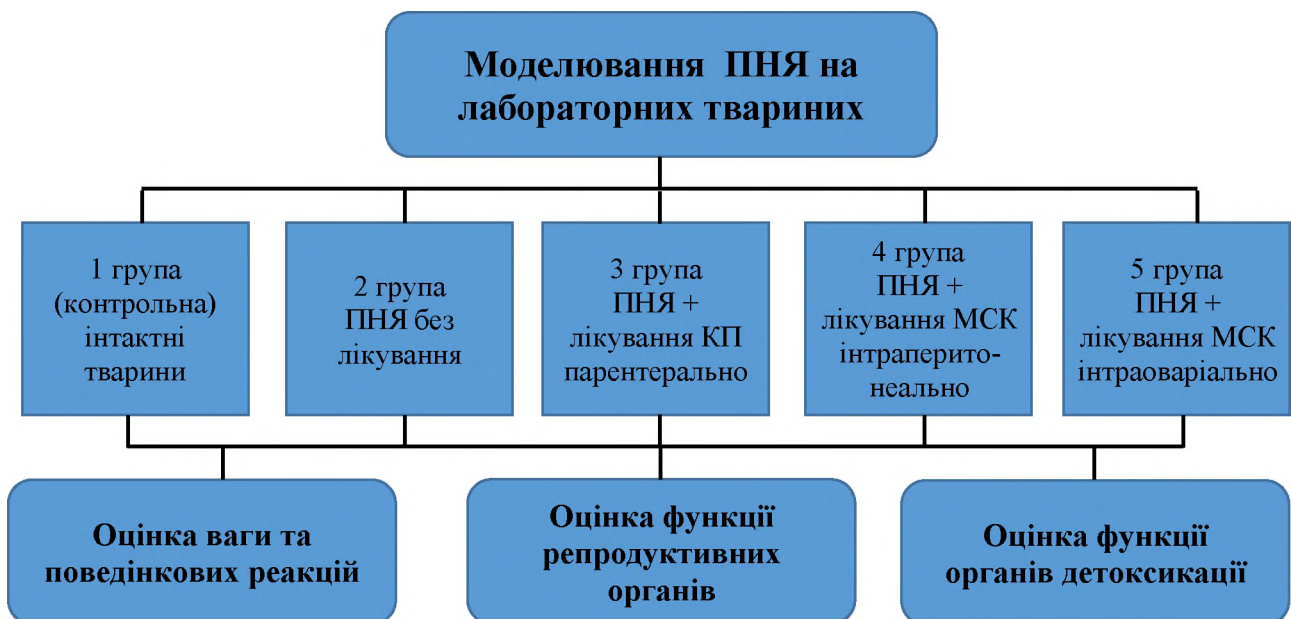


Рис. 2.1. Дизайн дослідження.

На першому етапі проводили вибір моделі та моделювання ПНЯ на лабораторних тваринах. На другому проводили лікування мишей з ПНЯ із застосуванням плацентарної та клітинної терапії (кріоекстрактом плаценти - парентерально та стовбуровими клітинами жирової тканини інтраоваріальним та інтраперитонеальним введенням). На третьому етапі оцінювали ефективність використаних терапевтичних методів у відновленні репродуктивної функції та функції органів детоксикації, покращенні поведінкових реакцій та відновлення ваги у експериментальних тварин з моделлю ПНЯ.

2.2. Лабораторні тварини

Дослідження проведені у віварії ІПКіК НАН України, ТОВ "Інститут кліткової біореабілітації", на кафедрах патологічної анатомії ХМАПО.

Експериментальний розділ роботи виконаний на 50 самицях мишей лінії BALB/c середньою масою $20,1 \pm 1,2$ г у віці 6 місяців. На час дослідження тварини знаходилися при природному освітленні, отримували стандартне харчування *ad libitum*. Тварин утримували відповідно діючим правилам про оснащення та функціонування віварію.

Тварини були розподілені на п'ять груп:

- 1-а (контрольна група) – 10 інтактних самиць мишей лінії BALB/c;
- 2-а група – 10 самиць мишей лінії BALB/c з моделлю ПНЯ без лікування;
- 3-я група – 10 самиць мишей лінії BALB/c з моделлю ПНЯ та лікуванням парентеральним введенням КП;
- 4-а група – 10 самиць мишей лінії BALB/c з моделлю ПНЯ та лікуванням за допомогою інтраперитонеального введення МСК ЖТ;
- 5-а група - 10 самиць мишей лінії BALB/c з моделлю ПНЯ та лікуванням за допомогою інтраоваріального введення МСК ЖТ.

2.3. Методи отримання екстракту плаценти та клітин жирової тканини

2.3.1. Отримання кріоконсервованого екстракту плаценти

Кріоконсервований екстракт плаценти отримували з плаценти після операції кесаревого розтину за умови інформованої згоди жінки [40]. Суть методу полягає в руйнуванні клітин плаценти під дією низьких температур, що дозволяє вивільнити біологічно активні речовини без денатурації білкових компонентів унаслідок дії низьких температур або хімічних сполук. Цей метод було обрано, оскільки більшість факторів росту є саме білковими.

Плаценту доставляли до лабораторії протягом 3-х годин після операції кесаревого розтину, відмивали 0,9% розчином хлориду натрію (Юрія-Фарм,

Україна), фрагментували тканину плаценти до розмірів 2-3 мм. До отриманої маси додавали 0,9% розчину хлориду натрію у співвідношенні 1 частина плацентарної тканини до 3-х частин 0,9%-го розчину хлориду натрію. Після цього отриману суспензію розливали по поліпропіленових пробірках (SPL, Республіка Корея) та занурювали в рідкий азот, де тримали протягом 10 хвилин. Після цього пробірки зі суспензією відігрівали на водяній бані (MicroMed, Китайська народна республіка) протягом 10 хвилин при 37°C. Цього часу достатньо для повного розморожування зразків. Цикли заморожування-відігрівання повторювали тричі. Зразки центрифугували при 1500 об/хв за допомогою центрифуги ЦЛМН-Р10/2700 (Елекон, Росія) протягом 10 хвилин. Надосад – кріоконсервований екстракт плаценти (КП) – збирали та розливали в кріопробірки (SPL, Республіка Корея) ємністю 2 мл, які зберігали в рідкому азоті при -196°C до початку експерименту з дослідження терапевтичної дії введення КП на перебіг модельованої ПНЯ. Перед введенням зразки КП підігрівали на водяній бані (MicroMed, КНР) протягом 10 хвилин при 37°C.

2.3.2. Отримання мезенхімальних стовбурових клітин жирової тканини

Мезенхімальні стовбурові клітини жирової тканини (МСК ЖТ) мишей отримували за методом Sun M. et al. [173]. Жирову тканину отримували з черевної порожнини мишей лінії BALB/c віком 6-8 місяців (рис. 2.2, а, б).

Жирову тканину ретельно промивали стерильним фосфатно-сольовим буфером (PBS) («BioWest», Франція) з 10% ципрофлоксацину (Fresenius Kabi, Bad Homburg, Німеччина), розрізали на дрібні шматочки та інкубували в присутності 0,1%-го розчину колагенази II типу («ПанЕко», Росія) у середовищі α MEM («BioWest», Франція) протягом 1 години при 37°C на магнітній мішалці. Надосад зливали та після інактивації ферментів 10%-ою фетальною бичачою сироваткою («Lonza», Німеччина) зразки фільтрували

через клітинний фільтр з розміром пор 100 мкм (BD Biosciences, Durhan, США).

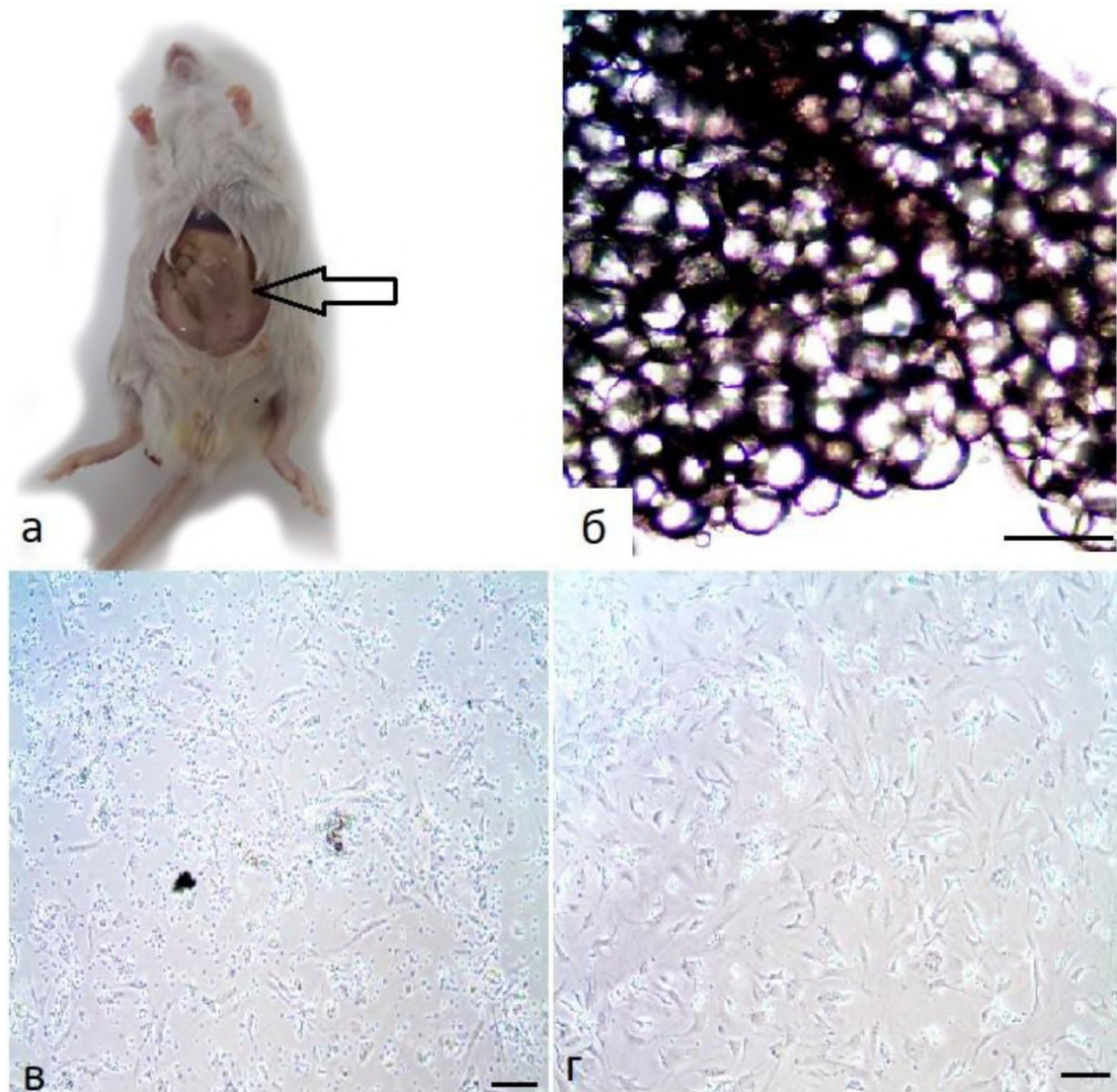


Рис. 2.2. Отримання МСК з жирової тканини мишей: а - жирова тканина позначена стрілкою, б - фрагмент жиру при збільшенні, в - перша доба культивування з домішками еритроцитів, г - третя доба культивування. Масштабні лінійки 100 мкм.

Отриману клітинну суспензію центрифугували протягом 5 хв при 1200 об/хв за допомогою центрифуги ЦЛМН-Р10/2700 («Елекон», Росія), клітинний осад ресуспендували в середовищі α MEM («BioWest», Франція),

збагаченому 10% фетальної бичачої сироватки («Lonza», Німеччина), антибіотиком, антимікотиком (PPA, Австрія) і висівали на 25 см³ флаконах («SPL», Корея) (рис. 2.2, в, г).

МСК ЖТ культивували на флаконах та культуральних планшетах («SPL», Корея) в CO₂-інкубаторі (Thermo Fisher Scientific, США) при 37°C в атмосфері 5% CO₂, культуральне середовище змінювали кожні 2 - 3 доби, клітини пересівали при формуванні моношару за допомогою 0,25%-го розчину трипсину («BioWest», Франція).

2.4. Моделювання хіміоіндукованого синдрому передчасної недостатності яєчників

Для моделювання хіміоіндукованої ПНЯ була обрана модель циклофосфамідіндукованої ПНЯ, описаної Xiao G.Y. зі співавторами [206], як найбільш відтворювана та найбільш розповсюджена за даними літератури. Принцип моделі засновано на пригніченні функції яєчників унаслідок хіміотерапії. Важливою перевагою моделі перед оваріоектомічними аналогами є залишення яєчників та можливість відновлення їх функції після лікування. Модель супроводжується загальним токсичним впливом та навантаженням на органи детоксикації – печінку та нирки. Для відтворення моделі тваринам одноразово вводили циклофосфамід у дозі 200 мг/кг (Baxter Oncology, Німеччина) і бусульфан (Aspen Pharma, Німеччина) у дозі 20 мг/кг. Для цього 200 мг циклофосфаміду розчиняли в 20 мл PBS, додавали 20 мг бусульфана, розчиненого в 2 мл ДМСО та вводили інтраперитонеально по 0,5 мл кожній тварині.

Через 2 тижні після моделювання ПНЯ шляхом введення циклофосфаміду та бусульфану підтверджували за втратою ваги та результатами кольпоцитологічного дослідження (еструс/анеструс) та починали лікування. Дози КП для тварин розраховували згідно діючих рекомендацій з дослідження лікарських препаратів та даними літератури [11, 32, 205]. Доза КП складала 0,01 мл (КП розводили в 10 разів буфером PBS та

вводили 0,1 мл парентерально). Доза МСК ЖТ складала 100000 клітин на тварину. Інтраперитонеальне введення МСК ЖТ здійснювали в об'ємі 0,1 мл культурального середовища. Інтраоваріальне введення моделювали за найбільш розповсюдженим методом [206], по 50000 клітин в об'ємі 0,05 мл культурального середовища шляхом введення в періоваріальну жирову тканину кожного яєчника.

Через 4 тижні після хіміотерапії по 5 тварин з групи виводили з експерименту, проводячи гістологічне дослідження препаратів органів репродукції – яєчників і маток та органів детоксикації – печінки і нирок. Через 8 тижнів усіх тварин виводили з експерименту.

2.5. Методи оцінки впливу моделювання ПНЯ, клітинної та плацентарної терапії на лабораторних тварин

2.5.1. Дослідження естрального циклу та статевої активності мишей

Перед початком дослідження в усіх самиць досліджували естральний цикл протягом двох тижнів методом вагінальних мазків (кольпоцитології). До дослідження залучали тільки самиць з регулярним естральним циклом.

Принцип методу полягає в тому, що під час фази еструсу насиченість організму естрогенами підвищується та в мазку вагінального епітелію переважають поверхові ороговілі клітини (рис. 2.3, а), під час дієструсу внаслідок дефіциту естрогенів трофіка піхви знижується та в мазку спостерігаються лише глибокі клітини (рис. 2.3, б). У фазі проєструсу спостерігаються обидва типи клітин. Для проведення кольпоцитологічного тесту в мишей кожного дня з понеділка по п'ятницю бавовняним тампоном брали мазки з піхви, забарвлювали метиленовим синім (Пан Еко, Росія), оглядали під мікроскопом.

Для визначення статевої активності самиць мишей спарювали із самцями лінії BALB/c віком 6-8 місяців, які мали раніше нащадків, тобто були фертильними, у співвідношенні 3:1. Кожного ранку наявність

спарювання реєстрували за наявністю вагінальних пробок, при наявності сумнівів досліджували вміст піхви під мікроскопом на наявність сперміїв.

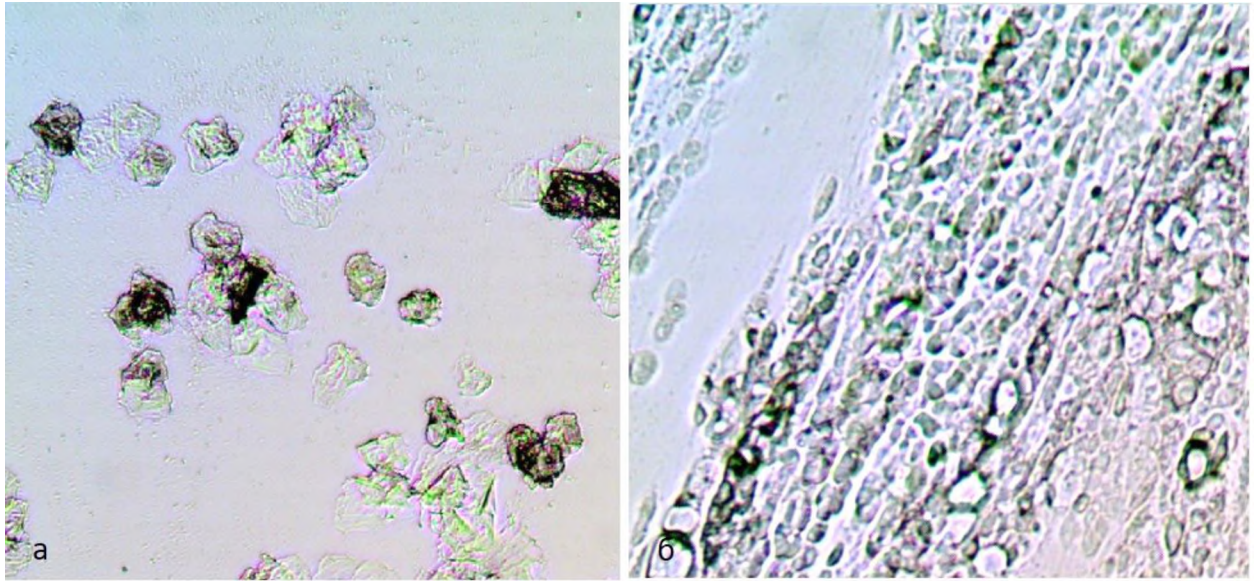


Рис. 2.3. Кольпоцитограми мишей: а – поверхневі клітини у фазі еструсу, б – глибокі клітини у фазі дієструсу.

2.5.2. Дослідження динаміки ваги тварин

Зміна ваги під час лікування хіміотерапевтичними препаратами (ХТП) вважається прогностичним фактором щодо виживаності [129]. Оскільки зміни витрати енергії під час і після хіміотерапії відбуваються з перевагою катаболічних процесів на етапі прийому ХТП [185], важливо дослідити зміну ваги мишей. Зважування самиць мишей усіх досліджуваних груп проводили двічі на тиждень за допомогою лабораторних вагів ФЕН-600л з точністю ± 0.01 г.

2.5.3. Дослідження поведінки тварин

Оцінку поведінкових реакцій проводили, використовуючи тест “відкритого поля”, анкіолітичний і зоосоціальний тести, що відображають орієнтаційно-пошукову поведінку, ступінь тривожності та здатність тварин до зоосоціальної взаємодії, відповідно [104, 117, 193].

Тест відкритого поля проводили для оцінки загальної активності та тривожності, розміщуючи тварину на полі 50 x 50 см, яке було поділене на 9 рівних квадратів. Реєстрували кількість відвіданих квадратів за 5 хвилин, кількість стійок, кількість актів грумінгу. Кількість відвіданих твариною квадратів зазвичай характеризує пошукову активність, стійки відповідають орієнтаційній поведінці, грумінг є характеристикою спокою, відсутності тривоги.

Анксиолітичний тест (піднесений хрестоподібний лабіринт) застосовували для виявлення тривоги. Для цього тварин розміщували на 5 хвилин у хрестоподібний лабіринт, дві частини якого відкриті, а дві – закриті. Реєстрували час знаходження тварини в закритих рукавах лабіринту, що характеризує стан тривоги та бажання сховатись.

Зоосоціальну поведінку досліджували за допомогою трикамерного тесту. Принцип тесту полягає в тому, що тварин розташовували в закритій ємності, яка складалася з трьох однакових скляних камер з вільним переходом між ними. У середню камеру поміщали піддослідну тварину, в одній з крайніх камер у клітці знаходилася інша тварина, у третій камері розташовували порожню клітку. Підраховували час, який піддослідна тварина проводить у камері з іншою твариною, що характеризує комунікативну активність піддослідної тварини.

2.5.4. Морфологічне дослідження органів репродукції та детоксикації

Морфологічне дослідження органів проводили після виведення тварин з експерименту.

Органи тварин (матки, яєчники, піхви, нирки, печінка) фіксували в 10%-му розчині нейтрального формаліну, зневоднювали в спиртах, ксилолі, заливали в парафін та робили зрізи, які забарвлювали гематоксиліном та еозином.

При аналізі маток аналізували товщу стінки органа, товщу ендометрію, наявність залоз на зрізі.

При аналізі яєчників звертали увагу на їх розмір, кількість примордіальних, первинних та третинних фолікулів на зрізі.

При аналізі печінки звертали увагу на архітекtonіку органа, наявність циротичних змін, крововиливів.

При аналізі нирок звертали увагу на морфологічну будову клубочків, наявність їх набряку, стан канальців, явища атрофії, склерозу та фіброзу.

Для аналізу морфологічних досліджень з аналізом цифрових фотографій застосовували мікроскоп Delta Optical NIB-100 («Delta Optical», Польща) та програмне забезпечення ToupView V 3.7 (Hangzhou ToupTek Photonics Co. Ltd, Hangzhou, China) та ImageJ V.1.48. (National Institutes of Health, USA), GraphPad Prism 5,0 GraphPad SoftwareInc, USA

2.6. Методи статистичної обробки даних

Статистична обробка даних проводилася з використанням електронних таблиць Microsoft Excel 2010 і програми Statistica 10.0 ("StatSoft", США). Обчислювали медіану, нижній та верхній квартилі, дані представляли у вигляді Me [Q1; Q3]. Порівняння декількох незалежних вибірок проводилося методом Краскела–Уолліса (Kruskal-Wallis H-test) з подальшим застосуванням методу Мана-Вітні з поправкою Бонфероні. Відмінності вважали достовірними при $p < 0,01$. Непараметричні методи дослідження були обрані з урахуванням невеликих обсягів вибірки груп мишей, що дозволено виводити з експерименту (декапітація) етичними нормами.

2.7. Біоетичні протоколи

При виконанні дослідження дотримувалися принципів Гельсинської декларації, прийнятої Генеральною асамблеєю Всесвітньої медичної асоціації (1964-2000рр.), відповідних положень ВООЗ, Міжнародної ради медичних

наукових товариств, Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» та положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються в експериментальних та інших наукових цілях 86/609/ЕЕС», Міжнародного кодексу медичної етики (1983р.) та законів України.

Проведення експериментальної роботи було погоджено з комітетом з питань етики та біоетики Харківського національного медичного університету (протокол №10 від 12.09.2023).

Плаценти для виділення екстракту отримували під час операції кесарів розтин за інформованої згоди жінок.

РОЗДІЛ 3

ВПЛИВ КЛІТИННОЇ ТА ПЛАЦЕНТАРНОЇ ТЕРАПІЇ НА ПОВЕДІНКОВІ РЕАКЦІЇ САМИЦЬ МИШЕЙ В МОДЕЛІ ПЕРЕДЧАСНОЇ НЕДОСТАТНОСТІ ЯЄЧНИКІВ

Синдром передчасного виснаження яєчників у жінок призводить до зниження вмісту естрогенних гормонів, які відіграють ключову роль у забезпеченні якості її життя, а саме: сприяють запобіганню деменції; знижують частоту хвороби Альцгеймера та вікової втрати пам'яті; сприяють гальмуванню підвищеного розпаду нейронів у тім'яній ділянці та гіпокампі, збереженню серотонінергічної функції в жінок після настання менопаузи; знижують ризик дегенерації жовтої плями; відіграють певну роль у попередженні раку прямої кишки; мають позитивний вплив на ліпідний профіль плазми крові; надають захисну дію на коронарні судини; знижують рівень тригліцеридів. Синдром гіпоестрогенемії при ПНЯ патогенетично пов'язаний із формуванням атерогенних дисліпідемій, патологією гемостазу, а також розвитком артеріальної гіпертензії та атеросклерозу судин головного мозку й серця [44; 119]. Ендотеліальна дисфункція є відомим наслідком гіпоестрогенемії [154, 190]. У жінок з ПНЯ спостерігалися також порушення ліпідного обміну, метаболізму глюкози та зниження функції нирок [110]. Підкреслюється необхідність раннього виявлення та довічного лікування метаболічних аномалій.

ПНЯ, що виникає на тлі застосування хімотерапевтичних препаратів, викликає зміни у функціональному стані судин, подібні до таких при клімактеричних розладах [33]. При цьому відзначаються порушення нервової системи з перевагою процесів збудження над процесами гальмування, які призводять до порушень пам'яті, поведінки та якості життя в цілому.

Втрата ваги, яка також спостерігається при застосуванні ХТП, є результатом дизбалансу між споживанням і витратою енергії та може бути пов'язана зі зниженою переносимістю хіміотерапії й підвищеною токсичністю. Виявлено підвищення виживання онкохворих пацієнтів, у яких після хіміотерапії відбулася стабілізація ваги [155].

При синдромі передчасної недостатності функції яєчників зниження продукції естрогенів та відсутність нормального оваріального циклу призводить до змін ваги, зовнішнього вигляду (шкіри, волосся, нігтів, осанки та ін.), розладів в емоційній сфері (депресія, перепади настрою, емоційна нестабільність), підвищеної кількості захворювань жінок у менопаузі, які є результатом зниження захисного впливу естрогенів. В експерименті вищевказані зміни в жінок екстраполюються на лабораторних тварин, у яких при синдромі виснаження яєчників відбувається зміна ваги, загального виду, поведінки та тривалості життя.

3.1. Дослідження впливу клітинної та плацентарної терапії на загальний стан та вагу мишей

Вивчення динаміки ваги тварин протягом 8 тижнів показало збільшення ваги мишей контрольної групи з 19,9 до 22,5 г (рис. 3.1, група 1).

Зовнішній вигляд тварин, активність та цікавість до їжі відповідали нормі [36].

Вага тварин усіх досліджуваних експериментальних груп після моделювання хіміоіндукованої ПНЯ знижувалася протягом двох тижнів (рис. 3.1, група 2), достовірно відрізняючись від ваги мишей контрольної групи, що є проявом токсичного впливу хіміотерапії (табл. 3.1). При моделюванні ПНЯ у тварин спостерігали також зниження фізичної активності, звалюність хутра, втрату цікавості до їжі.

Таблиця 3.1

Динаміки ваги тварин протягом 8 тижнів за Kruskal-Wallis (H-test)

Depend.: 1-й тиждень	Multiple Comparisons p values (2-tailed); 1-й тиждень (Spreadsheet1) Independent (grouping) variable: Група Kruskal-Wallis test: $H(4, N=50) = 6,183511$ $p = ,1859$				
	1гр	2гр	3гр	4гр	5гр
1гр		1,000000	1,000000	0,153671	1,000000
2гр	1,000000		1,000000	1,000000	1,000000
3гр	1,000000	1,000000		1,000000	1,000000
4гр	0,153671	1,000000	1,000000		1,000000
5гр	1,000000	1,000000	1,000000	1,000000	

Depend.: 3-й тиждень	Multiple Comparisons p values (2-tailed); 3-й тиждень (Spreadsheet1) Independent (grouping) variable: Група Kruskal-Wallis test: $H(4, N=50) = 34,29386$ $p = ,0000$				
	1гр	2гр	3гр	4гр	5гр
1гр		0,000001	0,000421	0,002319	0,398340
2гр	0,000001		1,000000	0,945275	0,009739
3гр	0,000421	1,000000		1,000000	0,413377
4гр	0,002319	0,945275	1,000000		1,000000
5гр	0,398340	0,009739	0,413377	1,000000	

Depend.: 5-й тиждень	Multiple Comparisons p values (2-tailed); 5-й тиждень (Spreadsheet1) Independent (grouping) variable: Група Kruskal-Wallis test: $H(4, N=25) = 18,45783$ $p = ,0010$				
	1гр	2гр	3гр	4гр	5гр
1гр		0,003336	0,087677	0,352584	1,000000
2гр	0,003336		1,000000	1,000000	0,013694
3гр	0,087677	1,000000		1,000000	0,254648
4гр	0,352584	1,000000	1,000000		0,856734
5гр	1,000000	0,013694	0,254648	0,856734	

Depend.: 8-й тиждень	Multiple Comparisons p values (2-tailed); 8-й тиждень (Spreadsheet1) Independent (grouping) variable: Група Kruskal-Wallis test: $H(4, N=25) = 12,41743$ $p = ,0145$				
	1гр	2гр	3гр	4гр	5гр
1гр		0,012707	0,646636	1,000000	1,000000
2гр	0,012707		1,000000	0,781297	0,077230
3гр	0,646636	1,000000		1,000000	1,000000
4гр	1,000000	0,781297	1,000000		1,000000
5гр	1,000000	0,077230	1,000000	1,000000	

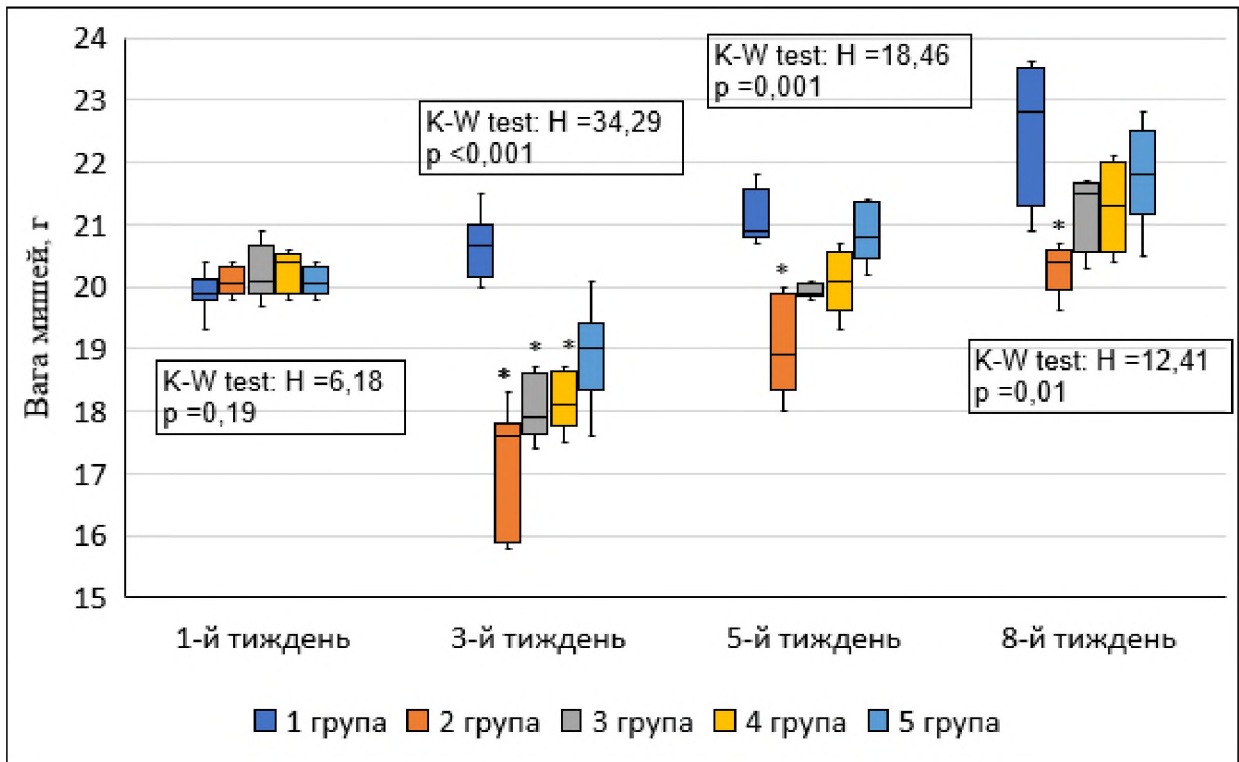


Рис. 3.1. Динаміка ваги мишей після моделювання ПНЯ та лікування: 1 – контрольна група тварин, 2 група – модель ПНЯ без лікування, 3 група – моделювання ПНЯ та лікування кріоекстрактом плаценти парентерально, 4 група – моделювання ПНЯ та лікування введенням МСК інтраперитонеально, 5 група – моделювання ПНЯ та лікування введенням МСК інтраоваріально; * – різниця є статистично значущою порівняно з контролем ($p < 0,01$). Верхня і нижня межі стовпчиків відповідають 75- і 25-у перцентилям відповідно; довжина стовпчика – межквартильний інтервал; горизонтальна лінія стовпчика – медіана; планки похибки – мінімальні й максимальні значення.

Van Soom T. зі співавторами показали, що зміни витрати енергії під час і після хіміотерапії мають U-образну залежність з перевагою катаболічних процесів на етапі прийому ХТП [185]. Втрата ваги при цьому може бути наслідком гіперметаболізму, який впливає на здатність організму до засвоєння енергії та надмірною її витратою [183]. Зміна ваги під час лікування ХТП вважається прогностичним фактором щодо виживання також і у тварин [129].

Після проведеного лікування КП парентеральним введенням та МСК ЖК інтраперитонеальним введенням у тварин 3-ої та 4-ої груп не було зафіксовано негативної реакції на введення. Миші 5-ої групи, яким вводили клітини в яєчники, виходили з наркозу протягом однієї години, але їх стан залишався пригніченим протягом двох діб. Загоєння рани передньої черевної стінки повністю відбувалося протягом тижня. Усі тварини, які пережили операцію, не мали пізніх післяопераційних ускладнень.

В усіх експериментальних групах, у яких тварини піддавалися лікуванню (тобто в групах 3-5) вага тварин почала відновлюватися, починаючи з третього тижня. Різниця показників ваги мишей у 2 - 5 групах та контрольною групою була достовірно значущою протягом чотирьох тижнів. На п'ятому тижні вага тварин 5 групи, які отримували МСК ЖТ інтраоваріально, уже не відрізнялася від відповідних показників тварин контрольної групи (Kruskal-Wallis test: $H = 18,46$; $p = 0,001$). Вірогідність різниці ваги між мишами контрольної групи та 3-ою, 4-ою і 5-ою групами, які отримували клітинну та плацентарну терапію, зникла на шостому тижні. Утім вага тварин 2-ої групи, які лікування не отримували, відрізнялася від відповідних показників контрольної групи навіть після 8-ми тижнів спостереження (Kruskal-Wallis test: $H = 12,41$; $p = 0,01$).

Таким чином, вага всіх тварин, які отримували лікування, тобто самиць мишей 3-ої, 4-ої та 5-ої груп, відновлювалася значуще швидше, ніж вага мишей з 2-ої групи (нелікованих). До найкращих результатів відновлення ваги приводило лікування із застосуванням МСК ЖТ інтраоваріально. У

тварин в усіх групах з модельованою ПНЯ та отриманням лікування, відновилися цікавість до їжі, якість хутра та активність через 3 тижні, на відміну від мишей у 2-ій групі, загальний стан і фізична активність яких не покращилися.

Було виявлено, що бетатрофін та інші гепатокіни, такі як фетуїн-А та фактор росту фібробластів 21, відіграють важливу ендокринну роль у ліпідному обміні та регуляції маси тіла [153]. У своєму комплексному складі КП, як і МСК, мають регуляторні протеїни та фактори росту, здатні стимулювати й відновлювати функцію яєчників, позитивно впливаючи на фолікулогенез, запобігаючи апоптозу, регулюючи рівень гормонів яєчників [181, 184]. Таким чином, адипозні МСК та КП саме наявністю широкого спектра факторів росту та інших регуляторних речовин можуть позитивно впливати на відновлення обмінних порушень.

Ураховуючи вищезначені факти та отримані результати, ми дійшли висновку, що застосування як КП, так і МСК ЖТ для лікування хіміоіндукованої ПНЯ суттєво покращує метаболізм, знижуючи частку катаболічних процесів, але більш ефективним виявляється інтраоваріальне введення МСК ЖТ.

3.2. Дослідження впливу клітинної та плацентарної терапії на поведінку мишей

Оцінку поведінкових реакцій проводили, використовуючи тести “відкритого поля” [58], анксиолітичний [160,193] і зоосоціальний [117], що відображають поведінку тварин в умовах новизни (дослідницька поведінка), ступінь тривожності та здатність тварин до зоосоціальної взаємодії, відповідно.

Раніше було показано позитивний вплив клітинної та тканинної терапії на зоосоціальну поведінку, тривожність і адаптацію мишей до стресу, пов'язані з рівнем естрогенів і їх гальмуючим впливом на ЦНС [125]. Таким

чином, дослідження поведінкових реакцій дало б опосередковану інформацію про відновлення продукції естрогенів або інші позитивні зміни в організмі мишей з ПНЯ після лікування за допомогою КП та МСК ЖТ.

При проведенні тесту відкритого поля було відзначено, що горизонтальна локомоторна активність тварин 2-ої групи після моделювання ПНЯ значно знижувалася порівняно з тваринами контрольної групи (табл.3.2,рис.3.2) (Kruskal-Wallis test: $H = 44,47$; $p < 0,001$), кількість відвіданих квадратів та пересічених ліній зменшувалася, що свідчить про пригнічення внаслідок моделювання хіміоіндукованої ПНЯ.

Тварини 2-ої групи більше часу проводили в бокових ділянках поля, уникаючи виходити на середину, що може також свідчити про збільшення тривоги в досліджуваних тварин. Вертикальна локомоторна активність також знижувалась у тварин 2-ої групи після проведення моделювання ПНЯ, що характеризує зниження дослідницької поведінки (табл. 3.3,рис.3.3).

При цьому активність тварин 5-ої групи, які перенесли операцію, була навіть нижче, ніж у тварин 2-ої групи після моделювання ПНЯ без лікування, що пояснюється важкістю післяопераційного періоду на тлі інтоксикації та гормонального дисбалансу.

Через вісім тижнів горизонтальна локомоторна активність тварин 3-ої групи, які отримували кріоекстракт плаценти, та тварин, яким вводили МСК інтраперитонеально (4 група), не відрізнялася від відповідних показників тварин контрольної групи, та значуще відрізнялася від відповідних показників тварин з моделлю ПНЯ (Kruskal-Wallis test: $H = 37,89$; $p < 0,001$) (табл. 3.2,рис.3.2).

При дослідженні вертикальної локомоторної активності кількість стійок у тварин із груп, що отримували лікування (3-5 групи) була менша, ніж у тварин контрольної групи, але більше, ніж у 2-ій групі тварин з ПНЯ і без лікування (табл. 3.3,рис.3.3).

Таблиця 3.2

**Динаміки горизонтальної локомоторної активності самиць
протягом 8 тижнів за Kruskal-Wallis (H-test)**

Depend.: 3-й тиждень	Multiple Comparisons p values (2-tailed); 3-й тиждень (Spreadsheet1)				
	Independent (grouping) variable: Група				
	Kruskal -Wallis test: H (4, N= 50) =44,47459 p =,0000				
	1гр	2гр	3гр	4гр	5гр
1гр		0,045430	0,000078	0,581715	0,000000
2гр	0,045430		1,000000	1,000000	0,009739
3гр	0,000078	1,000000		0,099661	0,960497
4гр	0,581715	1,000000	0,099661		0,000222
5гр	0,000000	0,009739	0,960497	0,000222	

Depend.: 5-й тиждень	Multiple Comparisons p values (2-tailed); 5-й тиждень (Spreadsheet1)				
	Independent (grouping) variable: Група				
	Kruskal-Wallis test: H (4, N= 50) =36,61568 p =,0000				
	1гр	2гр	3гр	4гр	5гр
1гр		0,000023	0,009477	0,436832	0,000001
2гр	0,000023		1,000000	0,067815	1,000000
3гр	0,009477	1,000000		1,000000	0,469846
4гр	0,436832	0,067815	1,000000		0,010568
5гр	0,000001	1,000000	0,469846	0,010568	

Depend.: 8-й тиждень	Multiple Comparisons p values (2-tailed); 8-й тиждень (Spreadsheet1)				
	Independent (grouping) variable: Група				
	Kruskal-Wallis test: H (4, N= 50) =37,88588 p =,0000				
	1гр	2гр	3гр	4гр	5гр
1гр		0,000006	1,000000	1,000000	0,000977
2гр	0,000006		0,002538	0,000100	1,000000
3гр	1,000000	0,002538		1,000000	0,101895
4гр	1,000000	0,000100	1,000000		0,008727
5гр	0,000977	1,000000	0,101895	0,008727	

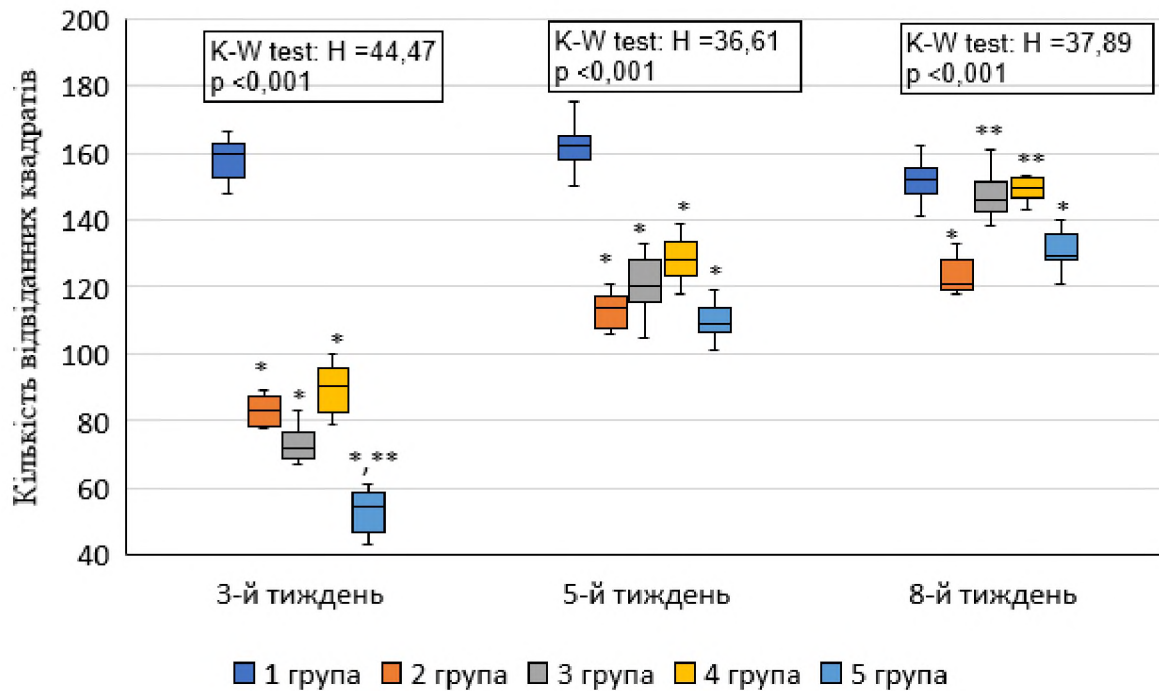


Рис.3.2. Горизонтальна локомоторна активність самиць мишей у тесті «відкритого поля». 1 – контрольна група тварин, 2 група – модель ПНЯ без лікування, 3 група – моделювання ПНЯ та лікування кріоекстрактом плаценти парентерально, 4 група – моделювання ПНЯ та лікування введенням МСК інтраперитонеально, 5 група – моделювання ПНЯ та лікування введенням МСК інтраоваріально, * – статистично значущі відмінності від 1 контрольної групи (тварин) ($p < 0,01$), ** – статистично значущі відмінності від 2 групи без лікування ($p < 0,01$).

Таблиця 3.3

**Динаміка вертикальної локомоторної активності самиць
протягом 8 тижнів за Kruskal-Wallis (H-test)**

Depend.: 3-й тиждень	Multiple Comparisons p values (2-tailed); 3-й тиждень (Spreadsheet1)				
	Independent (grouping) variable: Група Kruskal-Wallis test: $H(4, N=50) = 42,96364$ $p = ,0000$				
	1гр	2гр	3гр	4гр	5гр
1гр		0,000187	0,007814	0,886313	0,000000
2гр	0,000187		1,000000	0,099661	0,857963
3гр	0,007814	1,000000		0,975914	0,083308
4гр	0,886313	0,099661	0,975914		0,000175
5гр	0,000000	0,857963	0,083308	0,000175	

Depend.: 5-й тиждень	Multiple Comparisons p values (2-tailed); 5-й тиждень (Spreadsheet1)				
	Independent (grouping) variable: Група Kruskal-Wallis test: $H(4, N=50) = 40,67826$ $p = ,0000$				
	1гр	2гр	3гр	4гр	5гр
1гр		0,000000	0,041249	0,369655	0,000049
2гр	0,000000		0,032280	0,001934	1,000000
3гр	0,041249	0,032280		1,000000	0,886313
4гр	0,369655	0,001934	1,000000		0,129564
5гр	0,000049	1,000000	0,886313	0,129564	

Depend.: 8-й тиждень	Multiple Comparisons p values (2-tailed); 8-й тиждень (Spreadsheet1)				
	Independent (grouping) variable: Група Kruskal-Wallis test: $H(4, N=50) = 39,72230$ $p = ,0000$				
	1гр	2гр	3гр	4гр	5гр
1гр		0,000000	0,031489	0,144203	0,001423
2гр	0,000000		0,014581	0,002250	0,197231
3гр	0,031489	0,014581		1,000000	1,000000
4гр	0,144203	0,002250	1,000000		1,000000
5гр	0,001423	0,197231	1,000000	1,000000	

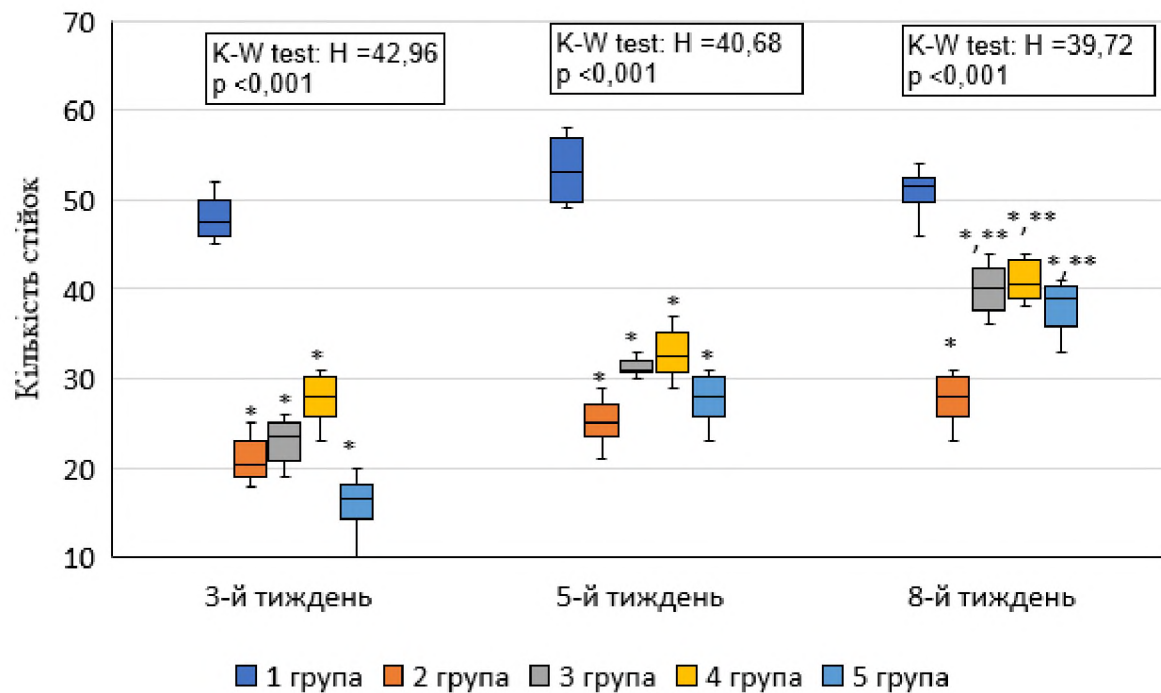


Рис. 3.3. Вертикальна локомоторна активність тварин у тесті відкритого поля. 1 – контрольна група тварин, 2 група – модель ПНЯ без лікування, 3 група – моделювання ПНЯ та лікування криоекстрактом плаценти парентерально, 4 група – моделювання ПНЯ та лікування введенням МСК інтраперитонеально, 5 група – моделювання ПНЯ та лікування введенням МСК інтраоваріально, * – статистично значущі відмінності від 1 контрольної групи ($p < 0,01$), ** – статистично значущі відмінності від 2 групи без лікування ($p < 0,01$).

Через п'ять тижнів вертикальна локомоторна активність у тварин усіх 2, 3, 4, 5 груп була вірогідно нижче, ніж у здорових тварин 1 групи (Kruskal-Wallis test: $H = 40,68$; $p < 0,001$) (табл. 3.3, рис.3.3).

Таким чином, при лікуванні ПНЯ відновлення загальної поведінкової активності за допомогою методів із застосуванням КП та МСК було однаково ефективним.

При дослідженні поведінки мишей в анкіолітичному тесті (ступінь тривоги) методом підрахування часу знаходження тварин на відкритому рукаві підведеного хрестоподібного лабіринту було виявлено, що через 3 тижні ступінь тривоги зростав у тварин усіх експериментальних груп з моделлю ПНЯ (2-5 групи) (табл.3.4, рис. 3.4).

Таблиця 3.4

**Динаміка ступеня тривоги самиць
протягом 8 тижнів за Kruskal-Wallis (H-test)**

Depend.: 3-й тиждень	Multiple Comparisons p values (2-tailed); 3-й тиждень (Spreadsheet1) Independent (grouping) variable: Група Kruskal-Wallis test: $H(4, N=50) = 41,66653$ $p = 0,0000$				
	1гр	2гр	3гр	4гр	5гр
1гр		0,000381	0,830351	0,000000	0,003837
2гр	0,000381		0,170670	0,691089	1,000000
3гр	0,830351	0,170670		0,000263	0,691089
4гр	0,000000	0,691089	0,000263		0,170670
5гр	0,003837	1,000000	0,691089	0,170670	

Depend.: 5-й тиждень	Multiple Comparisons p values (2-tailed); 5-й тиждень (Spreadsheet1) Independent (grouping) variable: Група Kruskal-Wallis test: $H(4, N=50) = 46,20751$ $p = 0,0000$				
	1гр	2гр	3гр	4гр	5гр
1гр		0,000026	1,000000	0,000000	0,026427
2гр	0,000026		0,018950	1,000000	0,900768
3гр	1,000000	0,018950		0,000090	1,000000
4гр	0,000000	1,000000	0,000090		0,024495
5гр	0,026427	0,900768	1,000000	0,024495	

Depend.: 8-й тиждень	Multiple Comparisons p values (2-tailed); 8-й тиждень (Spreadsheet1) Independent (grouping) variable: Група Kruskal-Wallis test: $H(4, N=50) = 44,80159$ $p = 0,0000$				
	1гр	2гр	3гр	4гр	5гр
1гр		0,000036	0,323683	0,000000	0,138181
2гр	0,000036		0,126799	1,000000	0,299682
3гр	0,323683	0,126799		0,000733	1,000000
4гр	0,000000	1,000000	0,000733		0,002694
5гр	0,138181	0,299682	1,000000	0,002694	

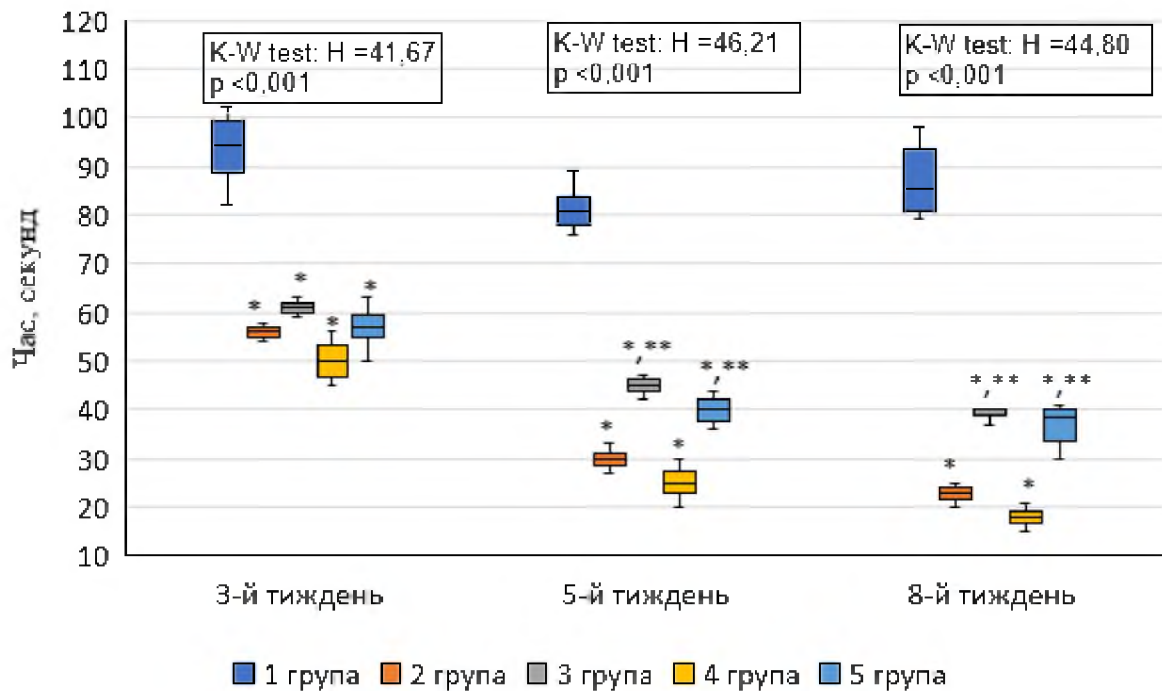


Рис. 3.4. Час перебування тварин у відкритому рукаві підведеного хрестоподібного лабіринту (анксіолітичний тест): 1 – контрольна група тварин, 2 група – модель ПНЯ без лікування, 3 група – моделювання ПНЯ та лікування кріоекстрактом плаценти парентерально, 4 група – моделювання ПНЯ та лікування введенням МСК інтраперитонеально, 5 група – моделювання ПНЯ та лікування введенням МСК інтраоваріально, * – статистично значущі відмінності від відповідного показника у тварин 1 контрольної групи ($p < 0,01$), ** – статистично значущі відмінності від відповідного показника 2 групи без лікування ($p < 0,01$).

Про це свідчить зменшення часу знаходження у відкритому рукаві лабіринту. Для мишей проявом тривоги є прагнення сховатися в закритому рукаві.

На п'ятий та восьмий тиждень спостереження тривожність тварин 2-ої групи залишалася значуще вище тривожності мишей контрольної групи. (табл.3.4, рис. 3.4).

Показники тривоги мишей 3-ої групи, які отримували лікування кріоекстрактом плаценти, та 5-ої групи, лікування яких проводилося адипозними МСК, введеними в яєчник, були значуще нижче відповідного показника з контрольної групи тварин, але більше за показники тварин 2-ої групи. (табл.3.4, рис. 3.4).

Утім, показники тварин з 4-ої групи, які отримували лікування МСК ЖТ, введеними інтраперитонеально, не відрізнялися від відповідних показників тварин 2-ої групи. (табл.3.4, рис. 3.4).

При дослідженні зоосоціальної поведінки підраховували час знаходження тварини в камері трьохкамерного тесту, у якій знаходиться інша тварина. Визначено, що протягом усього часу спостереження, з 3 до 8 тижнів у тварин 2-ої групи з моделлю ПНЯ показник зоосоціальної поведінки був значно нижче, ніж у тварин 3-ої, 4-ої та 5-ої груп, яким проводили лікування (табл 3.5, рис. 3.5).

Таблиця 3.5

**Динаміка зоосоціальної поведінки самиць
протягом 8 тижнів за Kruskal-Wallis (H-test)**

Depend.: 3-й тиждень	Multiple Comparisons p values (2-tailed); 3-й тиждень (Spreadsheet1)				
	Independent (grouping) variable: Група Kruskal-Wallis test: $H(4, N=50) = 45,22968$ $p = ,0000$				
	1гр	2гр	3гр	4гр	5гр
1гр		0,000000	0,060376	0,000052	0,751810
2гр	0,000000		0,007814	1,000000	0,000152
3гр	0,060376	0,007814		0,702900	1,000000
4гр	0,000052	1,000000	0,702900		0,054962
5гр	0,751810	0,000152	1,000000	0,054962	

Depend.: 5-й тиждень	Multiple Comparisons p values (2-tailed); 5-й тиждень (Spreadsheet1)				
	Independent (grouping) variable: Група Kruskal-Wallis test: $H(4, N=50) = 44,72080$ $p = ,0000$				
	1гр	2гр	3гр	4гр	5гр
1гр		0,000000	0,189297	0,000042	0,241410
2гр	0,000000		0,001514	1,000000	0,001041
3гр	0,189297	0,001514		0,241410	1,000000
4гр	0,000042	1,000000	0,241410		0,189297
5гр	0,241410	0,001041	1,000000	0,189297	

Depend.: 8-й тиждень	Multiple Comparisons p values (2-tailed); 8-й тиждень (Spreadsheet1)				
	Independent (grouping) variable: Група Kruskal-Wallis test: $H(4, N=50) = 44,53653$ $p = ,0000$				
	1гр	2гр	3гр	4гр	5гр
1гр		0,000000	1,000000	0,000128	0,087154
2гр	0,000000		0,000036	1,000000	0,010568
3гр	1,000000	0,000036		0,019448	1,000000
4гр	0,000128	1,000000	0,019448		0,816817
5гр	0,087154	0,010568	1,000000	0,816817	

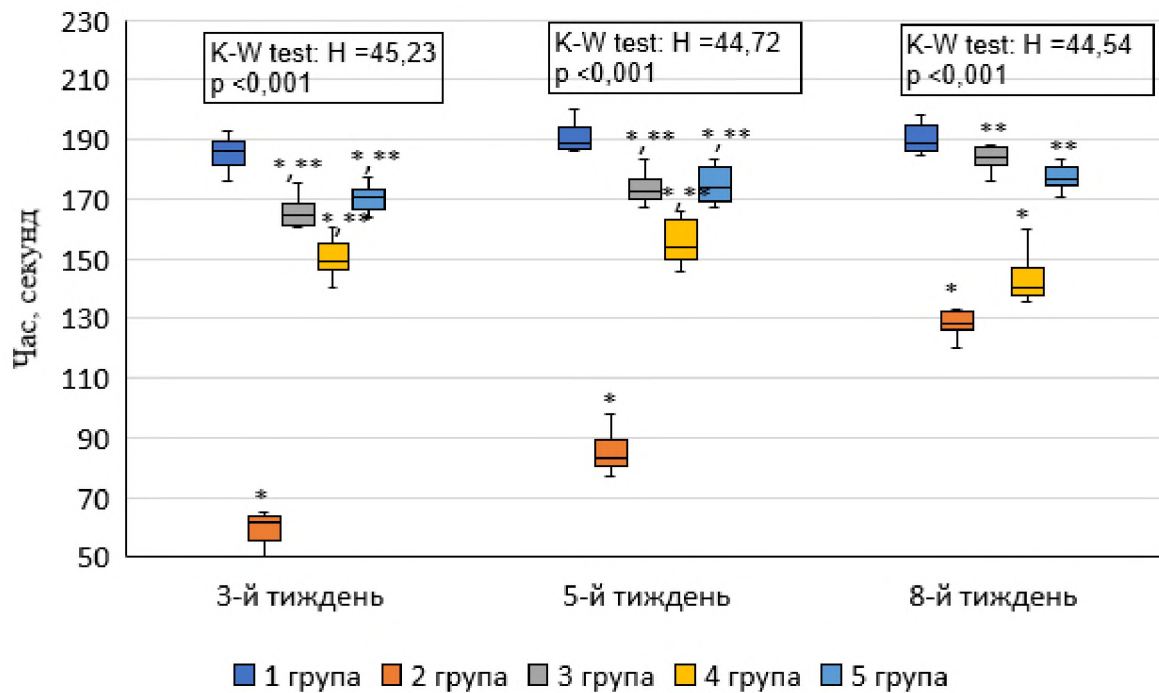


Рис. 3.5. Час перебування тварин у камері з іншою твариною (тест на зоосоціальну поведінку). Час перебування тварин у відкритому рукаві підведеного хрестоподібного лабіринту (анксиолітичний тест): 1 – контрольна група тварин, 2 група – модель ПНЯ без лікування, 3 група – моделювання ПНЯ та лікування кріоекстрактом плаценти парентерально, 4 група – моделювання ПНЯ та лікування введенням МСК інтраперитонеально, 5 група – моделювання ПНЯ та лікування введенням МСК інтраоваріально, * – статистично значущі відмінності від відповідного показника у тварин 1 контрольної групи ($p < 0,01$), ** – статистично значущі відмінності від відповідного показника 2 групи без лікування ($p < 0,01$).

Така зміна зоосоціальної поведінки, коли самиці менше часу проводили з іншою особою в трикамерному тесті порівняно з контрольною групою, свідчить про підвищення тривожності тварин у зв'язку зі стресом, викликаним впливом хіміотерапевтичних препаратів.

На 3-й ((Kruskal-Wallis test: $H = 45,23$; $p < 0,001$) та 5-й ((Kruskal-Wallis test: $H = 44,72$; $p < 0,001$) тижні спостереження час знаходження тварин 3-5 груп, яким проводили лікування, у камері з іншою твариною був значуще довший, ніж у 2 групі з моделлю без лікування, але нижчий, ніж у групі здорових тварин. На 8-ому тижні (Kruskal-Wallis test: $H = 44,54$; $p < 0,001$) зоосоціальна поведінка мишей 3-ої групи, які отримували кріоекстракт плаценти, 4-ої та 5-ої групи мишей, яким вводилися МСК ЖТ, значуще не відрізнялася від відповідних показників мишей контрольної групи, але відрізнялася від відповідних показників мишей 2-ої групи (без лікування). Причому в 4-ї групі ці показники відновлювалися гірше. Зазначені факти свідчать про підвищення тривожності тварин у зв'язку зі стресом, викликаним впливом хіміотерапевтичних препаратів, а також процедурою введення МСК ЖТ. Через 5 тижнів після моделювання ПНЯ спостерігалось підвищення тривожності тварин: найбільше – у групі мишей з моделлю ПНЯ без лікування, після лікування введенням МСК ЖТ тривожність збільшувалася меншою мірою (табл 3.5, рис. 3.5).

Застосування КП та МСК ЖТ інтраоваріально було найбільш ефективним для відновлення зоосоціальної поведінки.

Зоосоціальна поведінка тварин, які отримали лікування, відновилася до вихідного рівня через 5 тижнів; тварин без лікування, – тільки на 8-му тижні. Показник анксиолітичного тесту не досяг вихідного рівня в жодній з експериментальних груп, проте найменш критично тривожність тварин збільшувалася після лікування КП та інтраоваріальним введенням МСК ЖТ. Відомо, що миші в проестральному стані проводять більше часу на відкритих рукавах підведеного хрестоподібного лабіринту, ніж у діеструсі [Botis D 2019]. Таким чином, зменшення часу перебування тварин на відкритих

рукавах лабіринту після хіміотерапії логічно пов'язати з пригніченням естрогенпродукуючої функції яєчників і регуляторної системи репродукції в цілому. Цитостатична терапія має доведену нейротоксичність: викликає порушення когнітивних функцій (пам'яті, уваги, координації), які можуть зберігатися після припинення хіміотерапії та впливати на якість життя [189]. У групах тварин після лікування ми спостерігали лише тенденцію анксиолітичної дії МСК ЖТ на ЦНС мишей. На нашу думку, необхідний більш тривалий експеримент для спостереження відновлення поведінкових реакцій, що пов'язане з відновленням функцій ЦНС і відбувається повільно після нейротоксичного впливу хіміотерапії. Однак, показники поведінкових реакцій тварин після інтраоваріального введення МСК ЖТ порівняно з тваринами, яким вводили МСК ЖТ інтраперитонеально, поліпшувалися швидше, що можна пояснити більш ефективним відновленням функції яєчників при безпосередньому введенні МСК ЖТ у яєчник.

Резюме. Таким чином, проведене дослідження дозволяє відзначити, що моделювання ПНЯ застосуванням ХТП вірогідно погіршує загальний стан тварин (2 група), знижує вагу (на 15%), пригнічує поведінкові реакції, веде до посилення тривоги (на 41,4%), погіршує зоосоціальну поведінку (на 60,8%).

Доведено, що лікування КП прискорює нормалізацію ваги (на 4,3%), веде до зменшення тривоги (на 69,5%), покращує зоосоціальну поведінку (на 42,0%).

Було виявлено, що лікування тварин МСК ЖТ шляхом перитонеального введення прискорює нормалізацію ваги (на 4,8%), покращує зоосоціальну поведінку (на 10,0%), але не призводить до покращення показників анксиолітичної поведінки (стресу).

Показано, що лікування тварин МСК ЖТ шляхом інтраоваріального введення прискорює нормалізацію ваги (на 7,5%), покращує зоосоціальну поведінку (на 40%), веде до зменшення тривоги (на 60,87%).

Список праць, опублікованих за темою розділу дисертації:

1. Kozub MI, Skybina KP, Musatova IB, Prokopiuk OV, Gramatiuk SM, Tynnyka LM, et al. Comparison of therapeutic effects of different methods of administration of mezenchimal stem cells to mice with premature ovarian insufficiency. Проблеми ендокринної патології. 2021;2:35-9. doi: 10.21856/j-PEP.2021.2.05.
2. Скибина КП, Козуб НИ, Прокопюк ВЮ. Порівняльна характеристика терапевтичних ефектів кріоекстракта плаценти і мезенхімальних стовбурових клітин жирової тканини у лікуванні передчасної недостатності яєчників, викликаних хіміотерапією, в експерименті. Збірник наукових праць асоціації акушерів-гінекологів України. 2018;1(41):140-5. doi: 10.35278/2664-0767.1(41).2018.172562.

РОЗДІЛ 4

ВПЛИВ КЛІТИННОЇ ТА ПЛАЦЕНТАРНОЇ ТЕРАПІЇ НА ОРГАНИ СИСТЕМИ ДЕТОКСИКАЦІЇ САМИЦЬ МИШЕЙ В МОДЕЛІ ПЕРЕДЧАСНОЇ НЕДОСТАТНОСТІ ЯЄЧНИКІВ

Синдром передчасної недостатності яєчників як прояв їх гіпофункції, супроводжується, окрім аменореї, комплексом вегетосудинних, психоневрологічних та метаболічних порушень. Виявлена велика кількість факторів, що впливають на виникнення та розвиток синдрому ПНЯ, або передчасного виснаження оваріального пулу примордіальних фолікулів, але дотепер причини не визначені остаточно: це як ідіопатичні [159], генетичні [203], епігенетичні [198], так і метаболічні [61], мітохондріальні [118] та аутоімунні порушення [191], а також інфекції та токсичні речовини [Rudnicka E, 2018]. Однією з причин ПНЯ є хіміотерапія, дія якої викликає побічні ефекти, пов'язані з токсичним впливом на органи репродукції [124], органи системи детоксикації – печінку та нирки [46], а також на метаболізм у цілому [152].

В експериментальній моделі ПНЯ, індукованій застосуванням хіміотерапевтичних препаратів, досліджували органи детоксикації – печінку та нирки, які найперше піддаються згубному впливу хіміотерапевтичних речовин завдяки своїй функції детоксикації та виведення токсинів і продуктів їх метаболізму.

У цьому розділі представлені результати дослідження морфологічних змін в органах системи детоксикації лабораторних тварин у моделі хіміоіндукованої ПНЯ, а також після лікування введенням стовбурових клітин (МСК ЖТ) та кріоекстракту плаценти (КП).

4.1. Морфологічні зміни в печінці мишей в моделі ПНЯ та після застосування методів клітинної та плацентарної терапії

Основну роль у детоксикації відіграють органи виведення – печінка та нирки. Печінка є найбільшим паренхіматозним органом, що виконує численні функції, серед яких детоксикація токсинів, ліків, синтез білків і ферментів, факторів згортання крові, а також пряме виробництво гормонів і гепатокінів, метаболізм гормонів, включно з біотрансформацією естрогенів, обробка та перерозподіл метаболічного палива [153].

Замісна гормонотерапія (ЗГТ) [178], яка вважається на сьогодні найефективнішим методом лікування ПНЯ, потребує постійного прийому фармпрепаратів, що не забезпечує відновлення фертильності та має низку побічних ефектів, викликаючи патологічні зміни органів-мішеней, одним з яких є печінка [173]. При застосуванні гормонів для лікування ПНЯ, завдяки феномену «першого проходження через печінку», відбуваються значні метаболічні перетворення, у першу чергу ліпідного метаболізму [143].

Таким чином, актуальним є пошук більш безпечних методів лікування ПНЯ, які б, позитивно впливаючи на репродуктивну функцію, не порушували функцій інших важливих органів і систем. Наприклад, перспективними можуть бути недостатньо вивчені методи терапії ПНЯ із застосуванням стовбурових клітин, а також похідних плаценти.

Оскільки ПНЯ часто провокується хіміотерапією, яка також впливає на органи детоксикації, зокрема печінку [46, 75, 151], одним із завдань експериментальної роботи було дослідити морфологічні зміни в печінці мишей у моделі хіміоіндукованої ПНЯ та після застосування клітинної та плацентарної терапії, а саме: введення алогенних МСК ЖТ та ксеногенного КП.

4.1.1. Морфологічний опис препаратів печінки контрольної групи мишей

Гістологічне дослідження печінки 6-місячних самок мишей (група 1 – контроль, рис. 4.1) виявило морфологічну збереженість клітин та судин без ознак дегенерації, крововиливів та цирозу. Клітини не були морфологічно змінені, гіперхромні клітини були відсутні. У цілому гістологічна картина відповідала активному фізіологічному морфофункціональному стану тканини печінки.

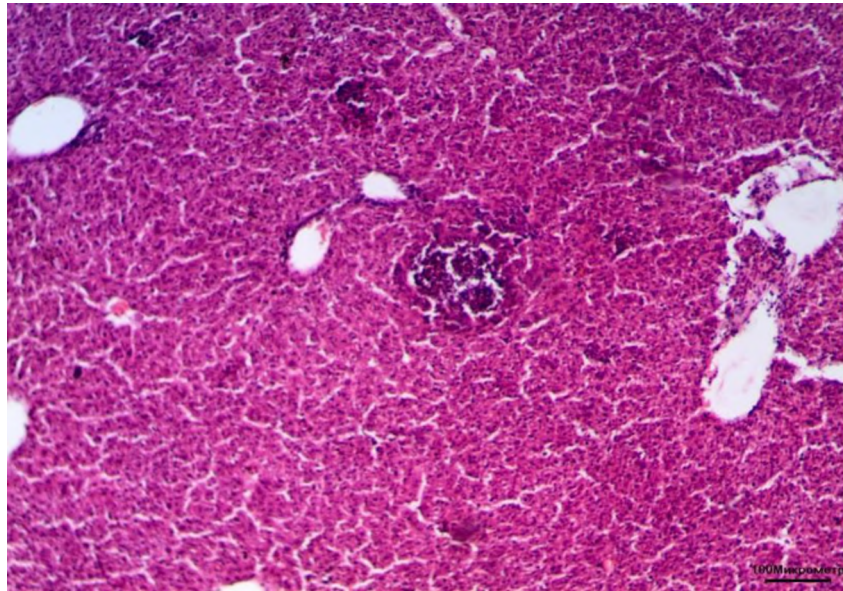


Рис. 4.1. Мікропрепарат печінки самиці миші. Контрольна група мишей (експериментальна група 1). Зabarвлення гематоксилином та еозином, $\times 200$. Масштабна лінійка 100 мкм.

4.1.2. Морфологічні зміни в печінці самиць мишей при моделюванні ПНЯ

Гістологічне дослідження печінки проводили через 4 та 8 тижнів після хіміотерапії. У печінці мишей через 4 тижні після хіміотерапії спостерігався набряк, помірне порушення балкової структури, неоднорідність, ознаки некрозу, холестеринова мікроемболія (рис.4.2).

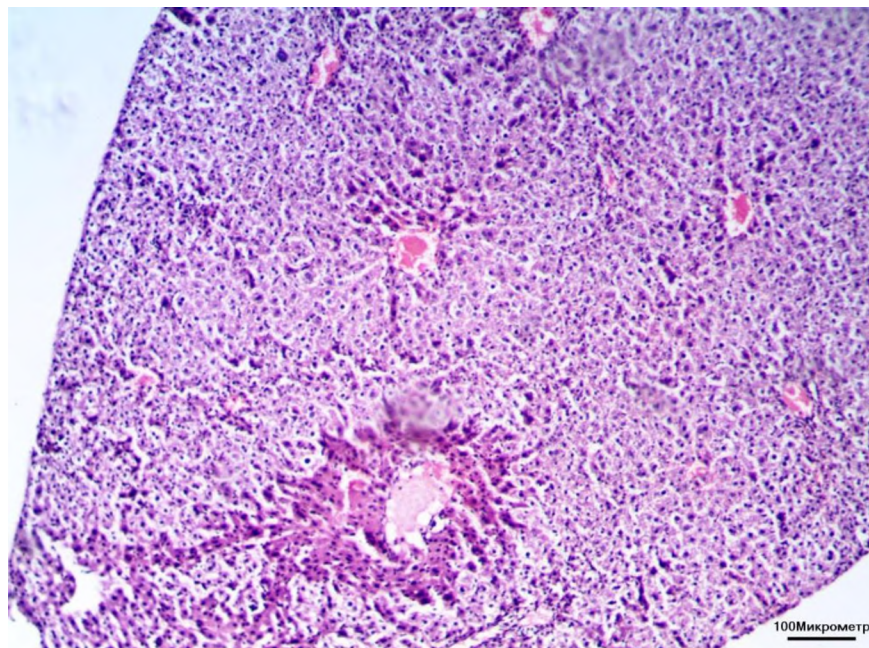


Рис. 4.2. Мікропрепарат печінки самиці миші через 4 тижні після моделювання ПНЯ (експериментальна група 2). Забарвлення гематоксилином та еозином, $\times 200$. Масштабна лінійка 100 мкм.

Через 8 тижнів після моделювання ПНЯ при гістологічному дослідженні у 2-ій групі мишей, що не отримували лікування, у черевній порожнині спостерігали збільшення жирової тканини. Морфологічні зміни відповідали проявам гострого медикаментозного ураження печінки з ознаками холестеринової мікроемболії та порушенням балкової структури. У печінці були виявлені вогнища цирозу.

4.1.3. Морфологічні зміни в печінці самиць мишей після лікування модельованої ПНЯ парентеральним введенням КП

У тварин із 3-ої експериментальної групи з модельованою ПНЯ, які отримували лікування парентеральним введенням кріоекстракту плаценти, через 4 тижні після початку лікування в печінці відзначався клітинний поліморфізм, розширення протоків, ознаки набряку при збереженій балковій структурі (рис. 4.3).

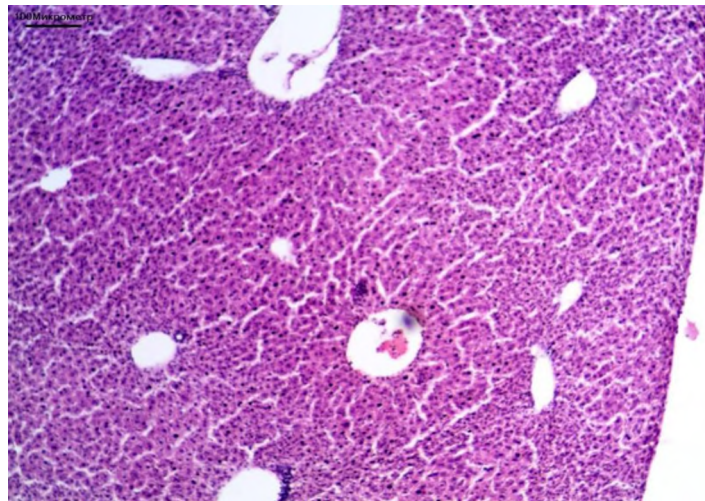


Рис. 4.3. Мікропрепарат печінки самиці миші через 4 тижні після лікування модельованої хіміоіндукованої ПНЯ парентеральним введенням КП (експериментальна група 3). Забарвлення гематоксиліном та еозином, $\times 200$. Масштабна лінійка 100 мкм.

4.1.4. Морфологічні зміни в печінці самиць мишей після лікування модельованої ПНЯ інтраперитонеальним введенням МСК ЖТ

Гістологічне дослідження мікропрепаратів печінки мишей із 4-ої експериментальної групи показало, що через 4 тижні після початку лікування модельованої ПНЯ введенням МСК ЖТ інтраперитонеально в печінці також відзначалося збереження балкової структури, спостерігалися клітинний поліморфізм, велика кількість гіперхромних ядер, підвищена неоднорідність, набряк (рис. 4.4).

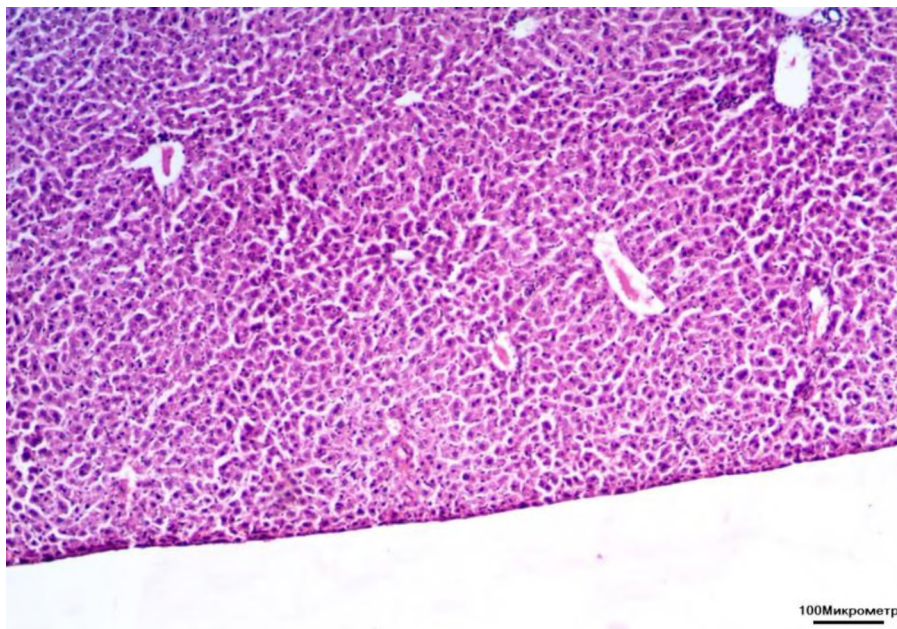


Рис. 4.4. Мікропрепарат печінки самиці миші через 4 тижні після початку лікування хіміоіндукованої ПНЯ за допомогою інтраперитонеального введення МСК ЖТ (експериментальна група 4). Зabarвлення гематоксиліном та еозином, $\times 200$. Масштабна лінійка 100 мкм.

4.1.5. Морфологічні зміни в печінці самиць мишей після лікування модельованої ПНЯ інтраовуляторним введенням МСК ЖТ

Мікропрепарати печінки мишей 5-ої експериментальної групи морфологічно незначно відрізнялися від таких, що було отримано для мишей 3-ої та 4-ої експериментальних груп, але після початку лікування модельованої ПНЯ введенням МСК ЖТ інтраовуляторно в печінці добре візуалізувалися окремі місця скупчення дрібних ядер, що може свідчити про інтенсивне ділення клітин. При цьому в печінці зберігалася балкова структура та спостерігався поліморфізм ядер. Ознак набряку не виявлено. Відзначалася морфологічна збереженість протоків та гістологічна картина, близька до такої у тварин контрольної групи (рис. 4.5).

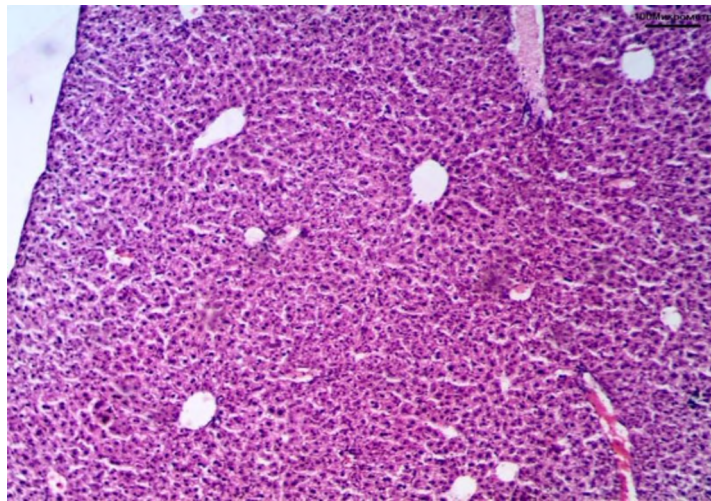


Рис. 4.5. Мікропрепарат печінки самиці миші через 4 тижні після початку лікування хіміоіндукованої ПНЯ за допомогою інтраовуляторного введення МСК ЖТ (експериментальна група 5). Забарвлення гематоксилином та еозином, $\times 200$. Масштабна лінійка 100 мкм.

ХТП викликають гепатоцелюлярне пошкодження через численні молекулярні шляхи, включаючи пряму печінкову токсичність, вроджену та адаптивну імунну відповідь [89]. Виявлено також загальні форми загибелі

гепатоцитів, пов'язані з активацією специфічних сигнальних шляхів [111]. Пряма печінкова токсичність виникає через накопичення активних форм кисню та мітохондріальну дисфункцію [151, 215], для корекції якої використовують препарати, що впливають на відновлення мітохондріальної функції, наприклад, коензим Q10 - ключовий кофактор у ланцюзі транспорту електронів, відомий антиоксидантною, протизапальною та антиапоптичною дією [49]. Ураховуючи позитивну дію МСК ЖТ на тканину печінки та метаболічну функцію в цілому, можливо припустити участь біологічно активних речовин, на які багаті МСК, у схожих механізмах відновлення.

4.2. Вплив клітинної та плацентарної терапії на морфологічні порушення в нирках мишей в моделі хіміоіндукованої ПНЯ

Згубний вплив ХТП на органи, що виконують функцію детоксикації, відомий та описаний у літературі [46, 146], однак, недостатньо вивчені терапевтичні ефекти МСК ЖТ та КП, які застосовуються при лікуванні ПНЯ, на нирки. Печінка та нирки, завдяки високій активності в метаболізмі, а також участі в детоксикації та екскреції токсичних речовин, зокрема лікарських препаратів, вразливі до розвитку токсичності. Тому хіміотерапевтичні препарати, створюючи токсичне навантаження на печінку й нирки, призводять до ураження цих органів, які можливо виявити за морфологічними змінами. Токсичний вплив моделювання ПНЯ за допомогою циклофосфаміда й бусульфана та можливість лікування порушень у нирках виявляли гістологічним дослідженням мікропрепаратів нирок самиць мишей усіх експериментальних груп у порівняльному аспекті.

4.2.1. Морфологічний опис препаратів нирки контрольної групи мишей

Гістологічне дослідження нирок самиць мишей контрольної групи (рис. 4.6) не виявило ознак дегенерації, тромбозу судин або набряку. Клітини були морфологічно збережені, гіперхромні клітини були відсутні. В області ниркових тілець – збережені клубочки та добре помітні щільні плями та клітини юкстагломерулярного комплексу. Дистальні та проксимальні каналці помірно розширені. Кровоносні судини збережені. У цілому гістологічна картина відповідала активному фізіологічному стану тканини нирки (рис. 4.6).

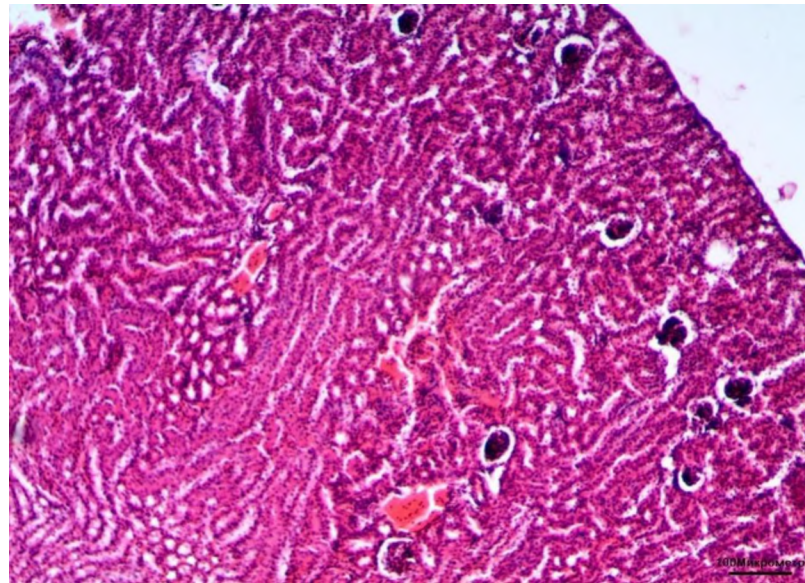


Рис. 4.6. Мікропрепарат нирки самиці миші контрольної групи. Забарвлення гематоксиліном та еозином, $\times 200$. Масштабна лінійка 100 мкм.

4.2.2. Морфологічні зміни в нирках самиць мишей при моделюванні хіміоіндукованої ПНЯ

Гістологічне дослідження нирок проводили через 4 та 8 тижнів після застосування хіміотерапії.

Морфологічні зміни в нирках у мишей з модельованою за допомогою хіміотерапевтичних препаратів ПНЯ мали ознаки тубулоінтерстиціального нефриту: спостерігався набряк кіркового та мозкового шарів, розширений фіброзом інтерстицій із спотворенням каналців, ознаки холестеринової мікроемболії. Спостерігалися зморщування клубочків, розширення порожнини ниркових тілець та збірних трубочок, в області більшості ниркових тілець не візуалізувалися клітини щільної плями та клітини ренін-юкстагломерулярного комплексу (рис. 4.7).

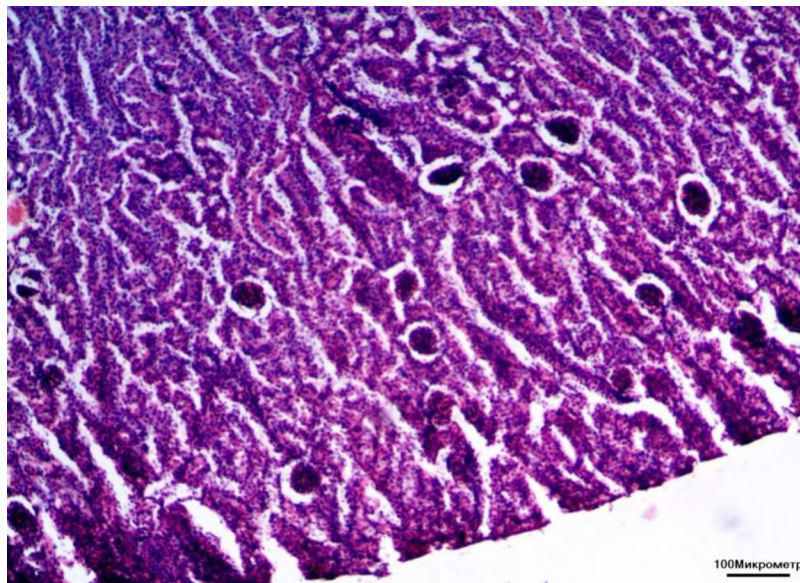


Рис. 4.7. Мікропрепарат нирки самиці миші через 4 тижні після моделювання хіміоіндукованої ПНЯ (експериментальна група 2). Забарвлення гематоксиліном та еозином, $\times 200$. Масштабна лінійка 100 мкм.

Тубулоінтерстиціальне ушкодження пов'язують з впливом ліків, зокрема хіміотерапевтичних засобів, які викликають ниркову токсичність,

тубулопатії, аномальні електроліт-гіпертонії та протеїнурії [115]. Тубулоінтерстиціальні хіміоіндуковані патологічні зміни в печінці та нирках часто взаємопов'язані та визначаються як гепаторенальний синдром [139].

Через 8 тижнів після моделювання ПНЯ при гістологічному дослідженні в нирках нелікованих мишей з 2-ої групи зморщування клубочків і набряк канальців зберігалися.

4.2.3. Морфологічні зміни в нирках самиць мишей після лікування модельованої ПНЯ парентеральним введенням КП

У тварин із 3-ої експериментальної групи з модельованою хіміоіндукованою моделлю ПНЯ, які отримували лікування парентеральним введенням кріоекстракту плаценти через 4 тижні після початку лікування в нирках відзначалося помірне зморщування клубочків, подекуди добре помітні щільні плями, набряк помірний, зі збереженою архітектонікою канальців (рис. 4.8).

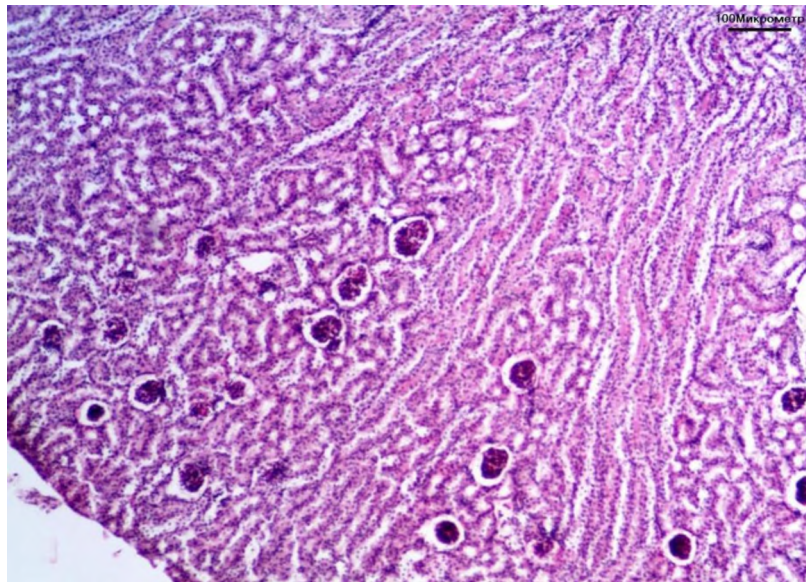


Рис. 4.8. Мікропрепарат нирки самиці миші через 4 тижні після лікування модельованої хіміоіндукованої ПНЯ парентеральним введенням КП (експериментальна група 3). Забарвлення гематоксиліном та еозином, $\times 200$. Масштабна лінійка 100 мкм.

4.2.4. Морфологічні зміни в нирках самиць мишей після лікування модельованої ПНЯ інтраперитонеальним введенням МСК ЖТ

Гістологічне дослідження мікропрепаратів нирок мишей із 4 експериментальної групи показало, що через 4 тижні після початку лікування модельованої ПНЯ введенням адипозних МСК інтраперитонеально в нирках відзначався набряк, розширення дистальних і проксимальних канальців, нерівність стінок кровоносних судин за рахунок здавлення їх розширеними оточуючими канальцями, ознаки холестеринової мікроемболії. Ниркові тільца мали клубочки з характерними щільними плямами в місці прилягання дистального канальця, але подекуди клубочки були деформовані (рис. 4.9).

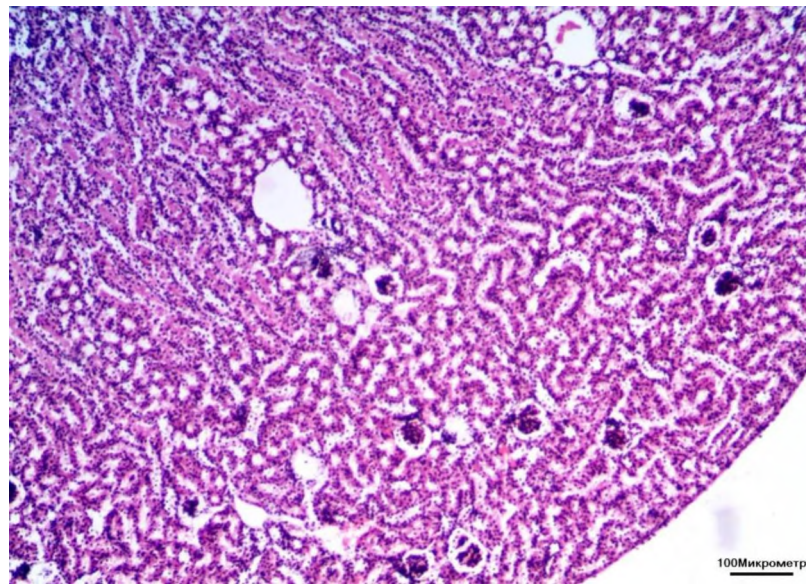


Рис. 4.9. Мікропрепарат нирки самиці миші через 4 тижні після початку лікування моделі ПНЯ за допомогою інтраперитонеального введення МСК ЖТ (експериментальна група 4). Забарвлення гематоксиліном та еозином, $\times 200$. Масштабна лінійка 100 мкм.

4.2.5. Морфологічні зміни в нирках самиць мишей після лікування модельованої ПНЯ інтраовуляторним введенням МСК ЖТ

Гістологічний препарат нирки самиці миші, яка отримувала терапію інтраовуляторним введенням МСК ЖТ, демонстрував судини з недеформованими стінками. Візуалізувалися неоднорідно розширені канальці, клубочки характерної форми зі збереженими пластинками щільної плями та клітинами юктагломерулярного комплексу. Паренхіматозний та мозковий шари нирки – зі збереженою архітектонікою (рис. 4.10).

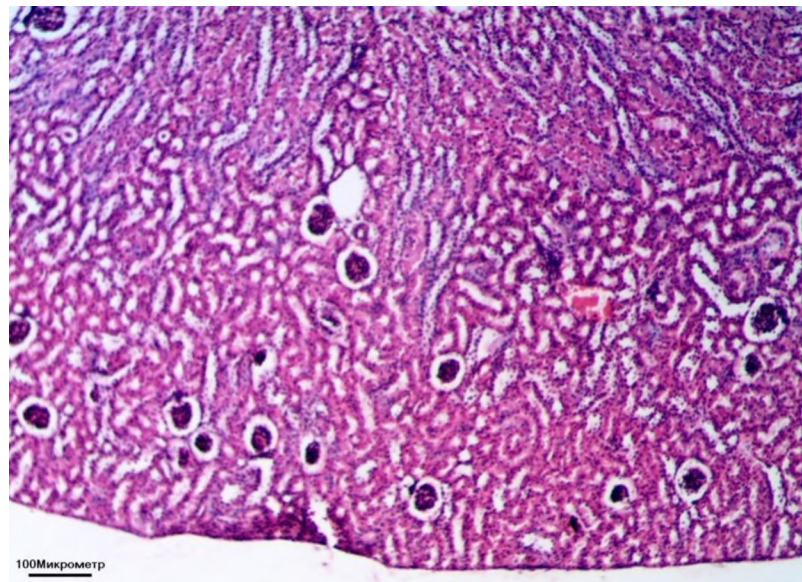


Рис. 4.10. Мікропрепарат нирки самиці миші через 4 тижні після початку лікування хіміоіндукованої ПНЯ за допомогою інтраовуляторного введення МСК ЖТ (експериментальна група 5). Забарвлення гематоксилином та еозином, $\times 200$. Масштабна лінійка 100 мкм.

Токсична дія ХТП на нирки пов'язана з тим, що ниркові канальці та проксимальний сегмент мають значну здатність до поглинання ліків через ендцитоз або завдяки транспортним білкам. Висока внутрішньоклітинна концентрація речовин, які потім піддаються інтенсивному метаболізму, призводить до утворення потенційно токсичних метаболітів і активних форм

кисню [146]. Оскільки дія деяких ХТП базується на запобіганні розростанню судин злоякісної пухлини, вони пригнічують ендотеліальний фактор росту судин, інгібування якого спричиняє характерні ознаки тубулоінтерстиціального пошкодження з внутрішньокапілярними тромбами, ендотеліозом та облітерованими капілярними петлями [87]. Ahmadian S. зі співавторами при лікуванні експериментальної ПНЯ в щурів введенням плазми головними терапевтичними чинниками також вважають експресію факторів росту судин та ін. факторів, які стимулюють ревазуляризацію в яєчниках, посилюють кровопостачання, прискорюючи процеси регенерації тканин [45]. Як показано раніше, введення МСК ЖТ можуть успішно застосовуватися в терапії хіміоіндукованої ПНЯ [92]. МСК ЖТ, імовірно, здійснюють паракринну дію на навколишні клітини, включно з локальними МСК, сприяючи швидкій регенерації тканин за рахунок ангиогенезу. Крім того, як повідомляють Хіе Q. зі співавторами, введення МСК мишам значно знижує експресію прозапальних факторів і генів, пов'язаних з фіброзом, у тканинах яєчників та матки та впливає на системну запальну відповідь [208].

Резюме. Морфологічні зміни печінки в мишей з модельованою за допомогою хіміотерапевтичних препаратів ПНЯ відповідали проявам гострого медикаментозного ураження з ознаками холестеринової мікроемболії, цирозу та порушенням балкової структури.

Гістологічне дослідження мікропрепаратів печінки мишей із 3-5-ої експериментальних груп показало, що лікування модельованої ПНЯ введенням тваринам МСК ЖТ та КП приводило до покращення морфологічної картини: у тварин з 3-ої та 4-ої груп (парентеральне введення КП та інтраперитонеальне введення МСК ЖТ, відповідно) у печінці відзначалося збереження балкової структури, спостерігалися клітинний поліморфізм та підвищена неоднорідність, набряк. Але інтраовуляторне введення МСК ЖТ мало суттєву відновлюючу дію на тканину печінки піддослідних тварин: на 8-му тижні після початку лікування спостерігалися

ознаки інтенсивного ділення клітин, відсутність набряку та холестеринової мікроемболії.

Морфологічні зміни в нирках у мишей з модельованою за допомогою ХТ ПНЯ мали ознаки тубулоінтерстиціального нефриту. Дослідження гістологічних препаратів нирок мишей з 3-ої групи через 4 тижні після початку лікування ПНЯ введенням КП показало наявність незначного набряку, зморщування окремих клубочків. Однак у мишей, які отримали терапію інтраперитонеальним введенням МСК ЖТ, структура нирок була збережена, проте спостерігалось зморщування окремих клубочків та сильний набряк. Гістологічне дослідження нирок мишей після лікування ПНЯ інтраовуляторним введенням МСК ЖТ патологічних змін не виявило.

Список праць, опублікованих за темою розділу дисертації:

1. Kozub MM, Prokopiuk VY, Skibina KP, Prokopiuk OV, Kozub NI. Comparison of various tissue and cell therapy approaches when restoring ovarian, hepatic and kidney's function after chemotherapy-induced ovarian failure. *Exp Oncol.* 2017;39(3):181-5.

РОЗДІЛ 5

ВПЛИВ КЛІТИННОЇ ТА ПЛАЦЕНТАРНОЇ ТЕРАПІЇ НА СТАТОВУ СИСТЕМУ САМИЦЬ МИШЕЙ В МОДЕЛІ ПЕРЕДЧАСНОЇ НЕДОСТАТНОСТІ ЯЄЧНИКІВ

Визначення головних причин синдрому виснаження яєчників як різновиду гіпофункції яєчників, дотепер є складною проблемою. Немає єдиної думки про те, чи первинно уражуються яєчники, або ж первинним є ураження центральних структур репродуктивної функції. Не виключається також одночасне ураження всіх структур репродуктивної системи одночасно. У науковій літературі приділено багато уваги розгляду патогенезу передчасної недостатності яєчників [91, 113, 192]. Однією з найпоширеніших причин розвитку захворювання є застосування хіміотерапії [179]. Цитостатична терапія, пригнічуючи функцію яєчників, істотно впливає на характер менструального циклу: у жінок молодше 25 років, які отримували в якості первинного лікування стандартну поліхіміотерапію з включенням алкілюючих препаратів, аменорея виникала у 28% випадків, у жінок старше 25 років – у 86% і у пацієток старше 40 років – у майже в 100% спостережень [66].

Сьогодні найефективнішим методом лікування ПНЯ вважається замісна гормонотерапія (ЗГТ) [178]. Однак вона має низку побічних ефектів, потребує постійного прийому фармпрепаратів, не забезпечує відновлення фертильності та корекції патологічних змін органів-мішеней [173]. Інноваційні стратегії лікування ПНЯ включають застосування різних типів стовбурових клітин [93, 181, 184], похідних плаценти [23], донорство ооцитів і активацію *in vitro* [121].

У розділі представлені результати порівняльного дослідження різних методів тканинної та плацентарної терапії у відновленні морфологічної

структури репродуктивних органів та статевої функції самиць мишей у моделі передчасної оваріальної недостатності.

5.1. Вплив клітинної та плацентарної терапії на естральний цикл та статеву активність самиць мишей

Вивчення естрального циклу показало, що в контрольній групі в усіх тварин спостерігався регулярний цикл (рис.5.1, група 1).

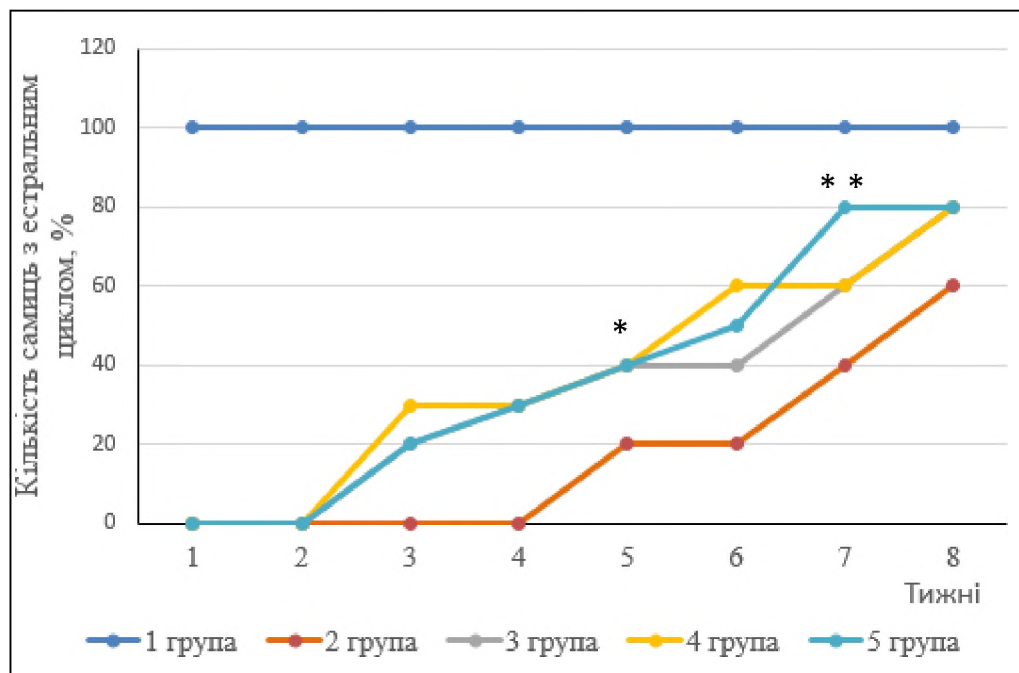


Рис. 5.1. Динаміка естрального циклу мишей після моделювання ПНЯ та лікування: 1 – контрольна група тварин, 2 група – модель ПНЯ без лікування, 3 група – моделювання ПНЯ та лікування криоекстрактом плаценти парентерально, 4 група – моделювання ПНЯ та лікування введенням МСК інтраперитонеально, 5 група – моделювання ПНЯ та лікування введенням МСК інтраоваріально; * – різниця статистично значуща відносно 2 групи ($p < 0,01$); ** – різниця статистично значуща відносно 3 та 4 групи ($p < 0,01$).

У мазках мишей після відтворення моделі ПНЯ (група 2) був відсутній поверхневий епітелій, циклічність з'являлася через 5 тижнів після

моделювання ПНЯ, причому регулярний 4-денний естральний цикл не відновлювався: спостерігалася періодична (від 3 до 8 днів) поява в мазку ороговілих клітин поверхневого епітелію, що свідчить про естрогенну насиченість організму. Через 8 тижнів естральні цикли спостерігалися в 60% мишей, що відповідає літературним даним для використаної моделі [207] (рис.5.1, група 2).

Лікування починали через 2 тижні після початку хіміотерапії, коли у всіх мишей спостерігалася відсутність естрального циклу. Кількість спарювань оцінювали за виявленням вагінальних пробок.

Естральний цикл після хіміотерапії та лікування методом парентерального введення КП з'явилися в 3 групі у 20% мишей на 3-й тиждень, у 40% – на 5-й тиждень, у 80% – на 8-й тиждень (рис.5.1, група 3).

Естральний цикл після хіміотерапії та лікування методом інтраперитонеального введення МСК ЖТ у групи з'явилися в 30% мишей на 3-й тиждень, у 40% – на 5-й тиждень, у 80% – на 8-й тиждень (рис.5.1, група 4).

У самиць, яким вводили МСК ЖТ інтраоваріально, естральний цикл у 20% мишей відновився на 3-й тиждень, у 40% – на 5 тиждень, а вже на 7-му тижні у 80% тварин (рис.5.1, група 5).

Вивчення статевої активності показало, що кількість ефективних спарювань самиць через 8 тижнів після моделювання ПНЯ склало 40% (рис. 5.2 група 2). Вагінальні пробки після хіміотерапії та лікування методом парентерального введення КП з'явилися в 3 групі у 20% мишей на 5-й тиждень, у 60% – на 8 тиждень. (рис.5.2, група 3).

Результати в 4-ій групі мишей були дещо краще, на 5-му тижні вагінальні пробки спостерігалися в 40% тварин, а на 8 тижні – у 80% (рис.5.2, група 4).

Найкращі результати показала 5-а група, в якій тварин лікували введенням МСК ЖТ інтраоваріально: уже на 5-му тижні вагінальні пробки

з'явилися в 40% самиць мишей, на 6-му тижні – у 60%, а на 8 тижні – у 80% (рис.5.2, група 5).

Таким чином, як клітинна, так і плацентарна терапія, мали позитивний вплив на відновлення естрального циклу та статевої активності мишей при лікуванні модельованої ПНЯ, однак введення МСК інтраоваріально виявилось більш ефективним.

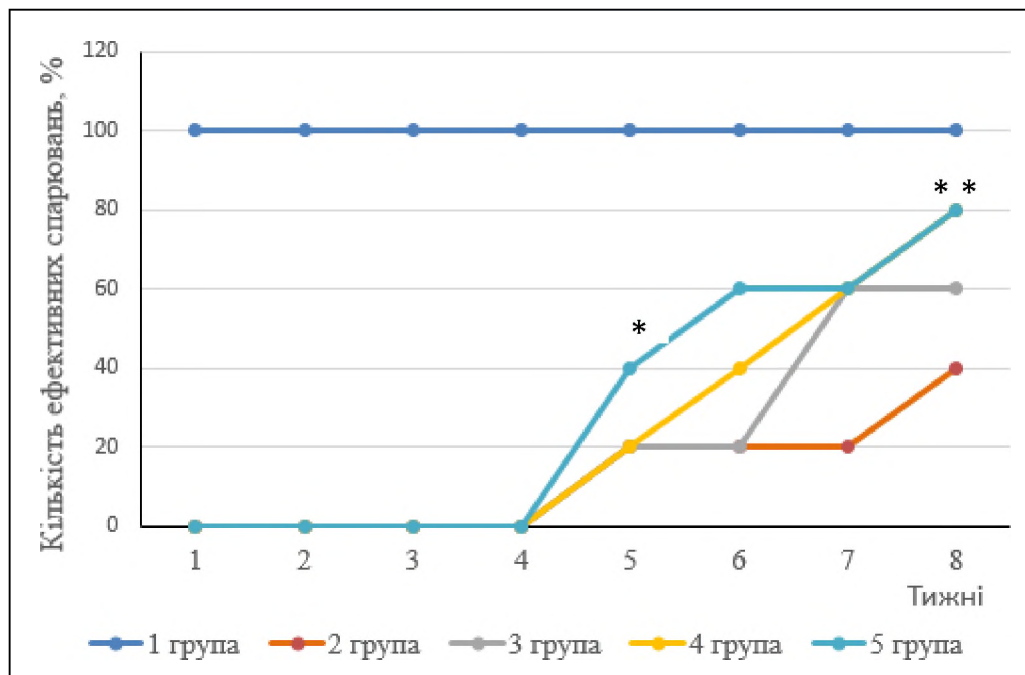


Рис. 5.2. Статева активність самиць мишей після моделювання ПНЯ та лікування: 1 група – контрольна, 2 група – модель ПНЯ без лікування, 3 група – моделювання ПНЯ та лікування кріоекстрактом плаценти парентерально, 4 група – моделювання ПНЯ та лікування введенням МСК інтраперитонеально, 5 група – моделювання ПНЯ та лікування введенням МСК інтраоваріально;

* – різниця статистично значуща відносно 2 групи ($p < 0,01$);

** – різниця статистично значуща відносно 3 та 4 групи ($p < 0,01$)

5.2. Вплив клітинної та плацентарної терапії на статеві органи самиць мишей в моделі ПНЯ

5.2.1. Морфологічні зміни в матках самиць мишей в моделі ПНЯ та після застосування методів клітинної та плацентарної терапії

При гістологічному дослідженні у тварин групи з моделлю ПНЯ без лікування спостерігали збільшення жирової тканини в черевній порожнині, витончення шарів і значну атрофію ендометрію маток на відміну від матки миші з контрольної групи (рис. 5.3, рис. 5.4).

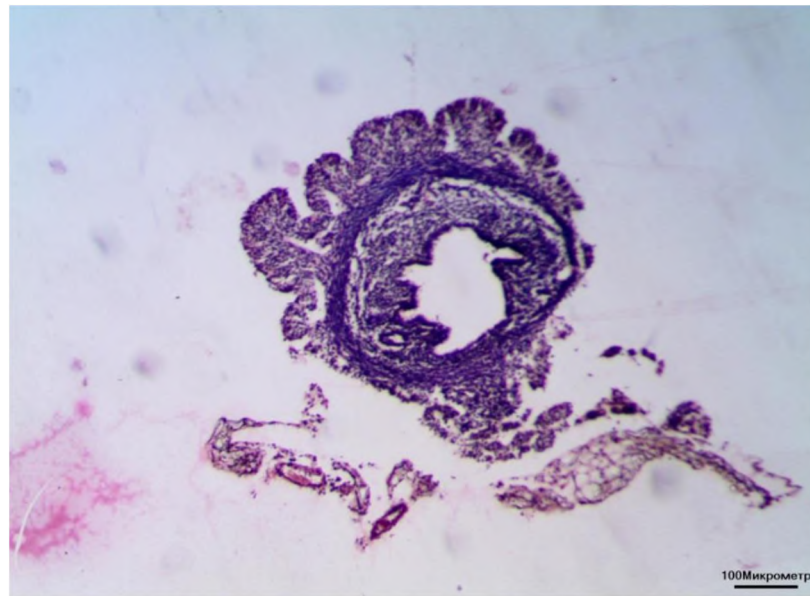


Рис. 5.3. Мікропрепарат матки миші через 8 тижнів після моделювання ПНЯ. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Масштабна лінійка 100 мкм.

На 8-му тижні експерименту при гістологічному дослідженні маток спостерігали атрофічні явища менш виражені, ніж на 4-му тижні після хіміотерапії, проте витончення шарів та атрофія ендометрію була значною. Очевидно, відновлення естрогенної насиченості організму в групі без лікування відбувається за рахунок жирової тканини, а не яєчників. Гістологічне дослідження маток тварин, яким проводили терапію кріоконсервованим екстрактом плаценти парентерально виявило незначну атрофію ендометрію, потовщення міометрію (рис. 5.5).

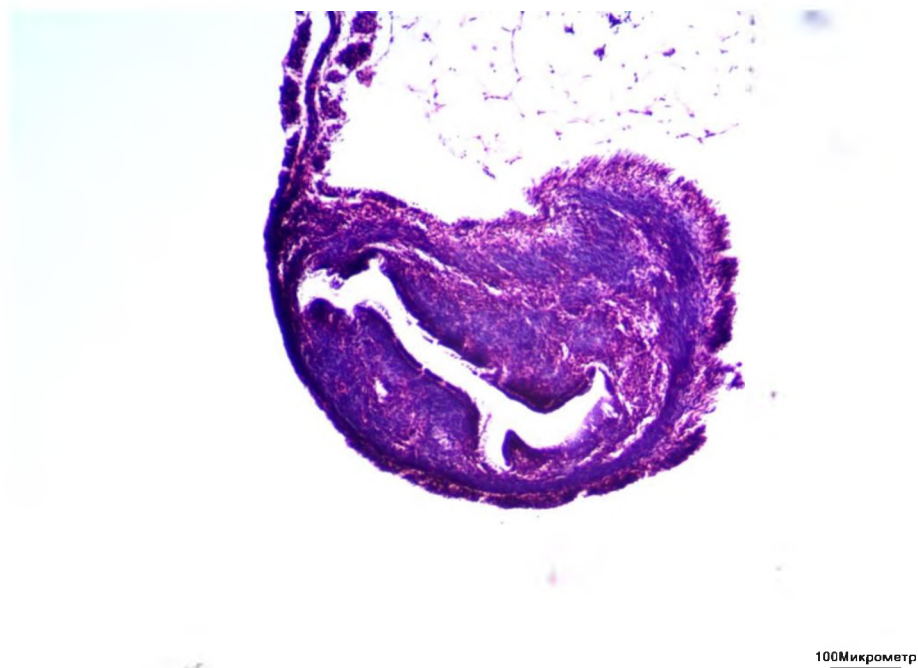


Рис.5.4. Мікропрепарат матки миші з контрольної групи. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Масштабна лінійка 100 мкм.

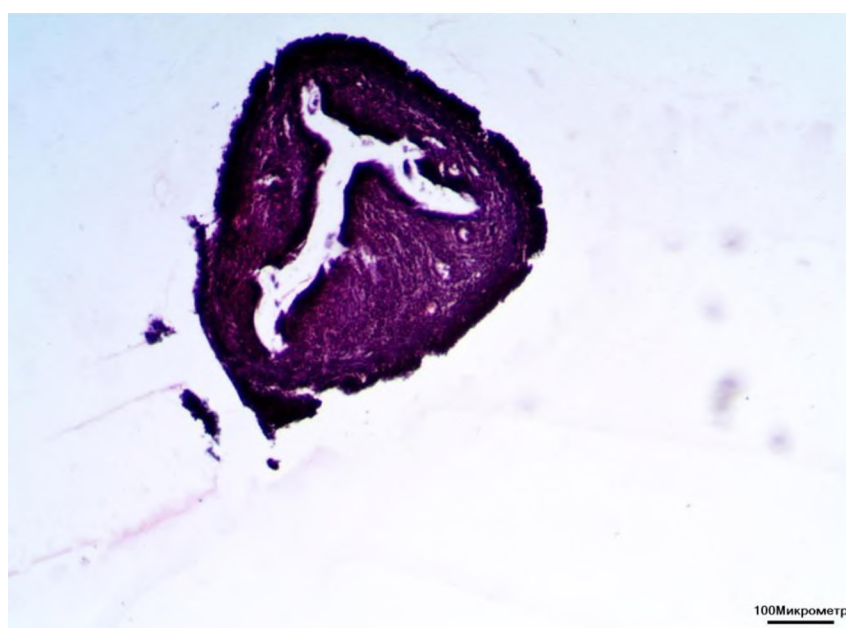


Рис. 5.5. Мікропрепарат матки миші через 8 тижнів після моделювання ПНЯ та лікування парентеральним введенням КП. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Масштабна лінійка 100 мкм.

У тварин, яких лікували введенням МСК ЖТ інтраперитонеально, матка була морфологічно збереженою, місцями спостерігалися витончення шарів, незначна атрофія ендометрію (рис. 5.6).

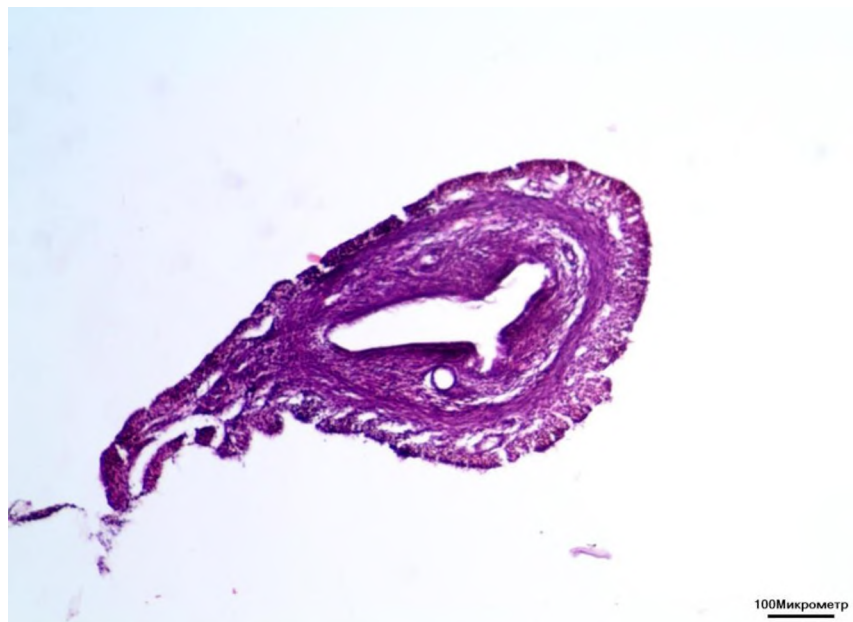


Рис. 5.6. Мікропрепарат матки миші через 8 тижнів після моделювання ПНЯ та лікування інтраперитонеальним введенням МСК ЖТ. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Масштабна лінійка 100 мкм.

У тварин, яких лікували введенням МСК ЖТ інтраоваріально, відзначалася морфологічна збереженість маток, місцями з незначною гіпоплазією ендометрію (рис. 5.7), але в цілому матка була близька до інтактної.

Таким чином, при дослідженні самиць мишей із груп, які отримували лікування як МСК ЖТ, так і КП, встановлено, що структура маток на 8-му тижні спостереження мало відрізнялася та була близька до нативної, усі шари та залози були добре виражені.

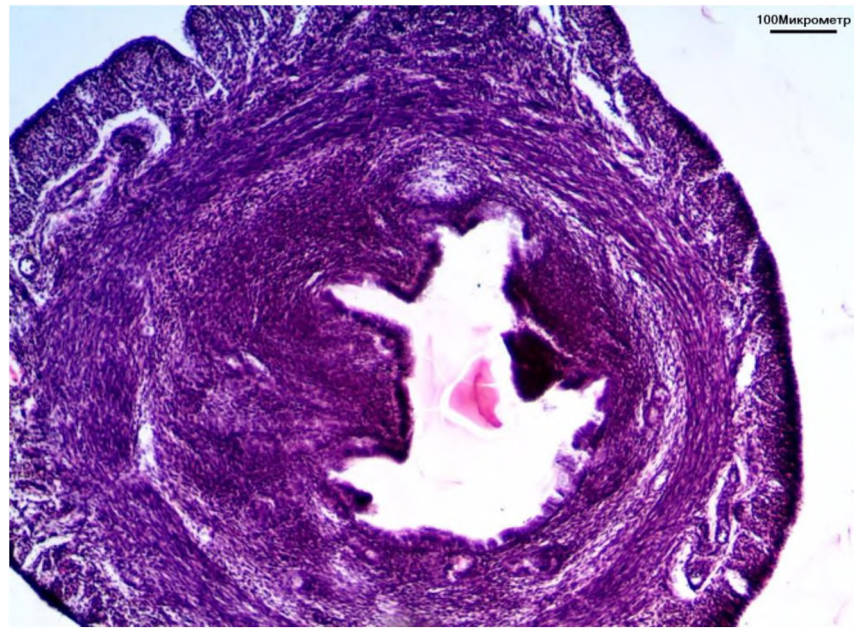


Рис. 5.7. Мікропрепарат матки миші через 8 тижнів після моделювання ПНЯ та лікування інтраовуляторним введенням МСК ЖТ. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Масштабна лінійка 100 мкм.

5.2.2 Морфологічні зміни в яєчниках самиць мишей в моделі ПНЯ та після застосування методів клітинної та плацентарної терапії

Гістопатологічне дослідження виявило успішну індукцію ПНЯ в мишей на 8-му тижні через зменшення розмірів яєчників, відсутність у них структурних елементів: жовтих тіл, примордіальних, первинних і вторинних фолікулів; строма була заповнена великими клітинами (рис. 5.8) порівняно з контрольними мишами (рис. 5.9).

При дослідженні яєчників самиць мишей, яким проводили терапію кріоконсервованим екстрактом плаценти, методом парентерального введення, у яєчниках типові структурні елементи також були відсутні, проте спостерігались утворення, схожі на фолікули – округлі ділянки, що містили великі клітини зі світлою цитоплазмою (рис. 5.10).

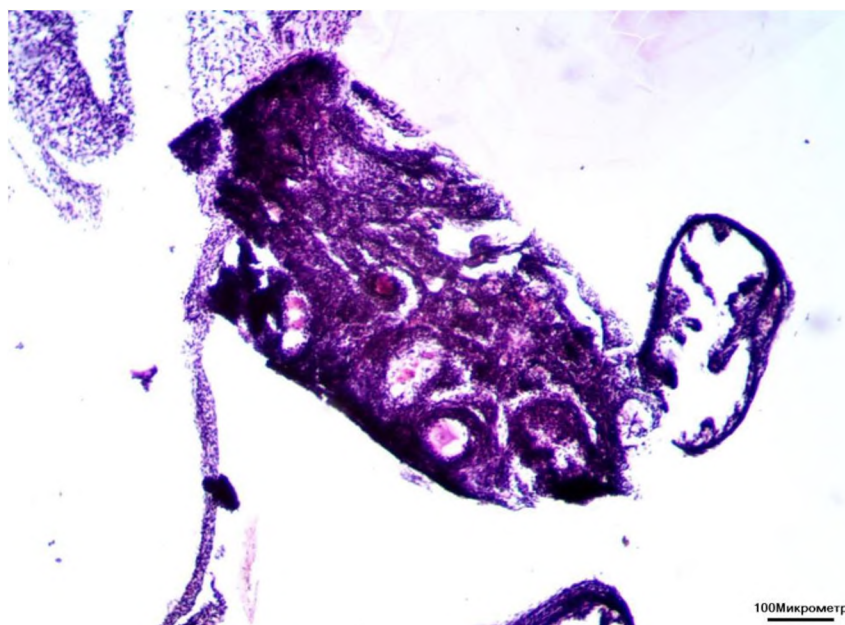


Рис. 5.8. Мікропрепарат яєчника миші через 8 тижнів після моделювання ПНЯ. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Масштабна лінійка 100 мкм.

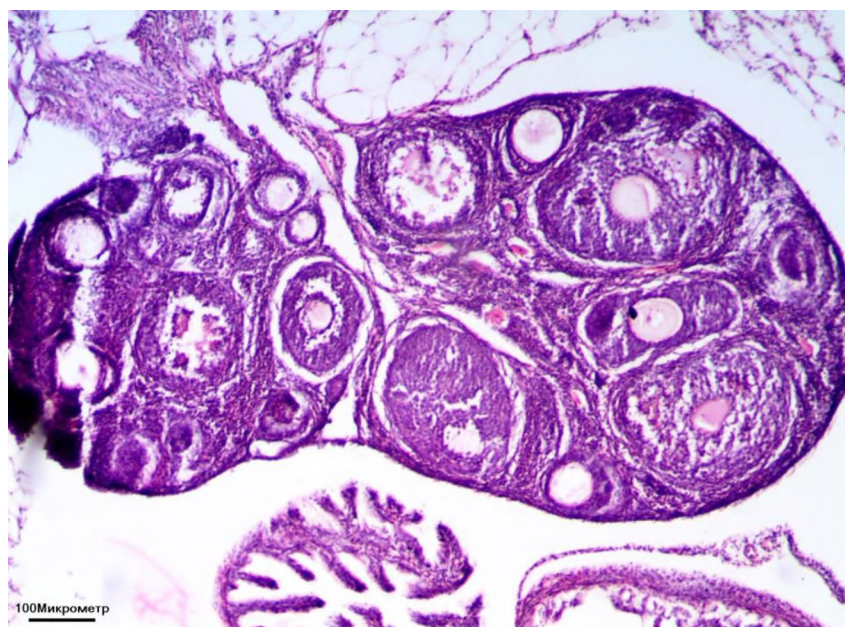


Рис. 5.9. Мікропрепарат яєчника миші з контрольної групи. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Масштабна лінійка 100 мкм.

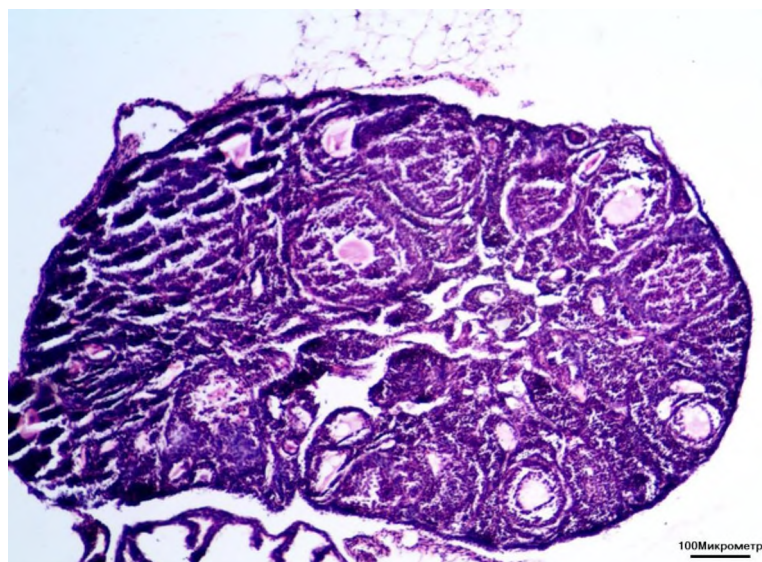


Рис. 5.10. Мікропрепарат яєчника миші через 8 тижнів після моделювання ПНЯ та лікування парентеральним введенням КП. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Масштабна лінійка 100 мкм.

У мишей, яких лікували введенням МСК ЖТ інтраперитонеально, у яєчниках відзначалися гіперплазія окремих клітин або груп клітин, поява структурних елементів: жовтих тіл, примордіальних і первинних фолікулів (рис. 5.11).

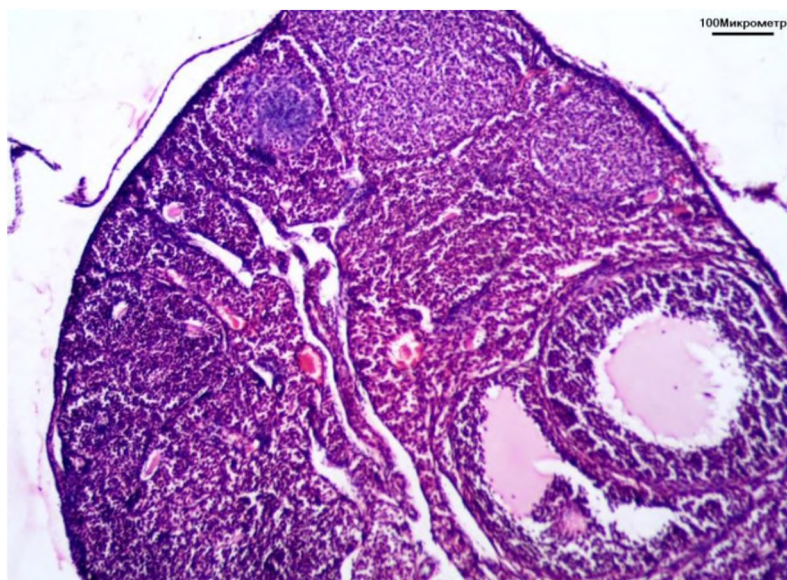


Рис. 5.11. Мікропрепарат яєчника миші через 8 тижнів після моделювання ПНЯ та лікування інтраперитонеальним введенням МСК ЖТ. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Масштабна лінійка 100 мкм.

інтраовуляторним введенням МСК ЖТ (5-а група) показало відновлення структурних елементів: жовтих тіл, примордіальних, первинних та поодиноких вторинних фолікулів (рис. 5.12), причому кількість первинних фолікулів була значно вищою, ніж після інтраперитонеального введення МСК.

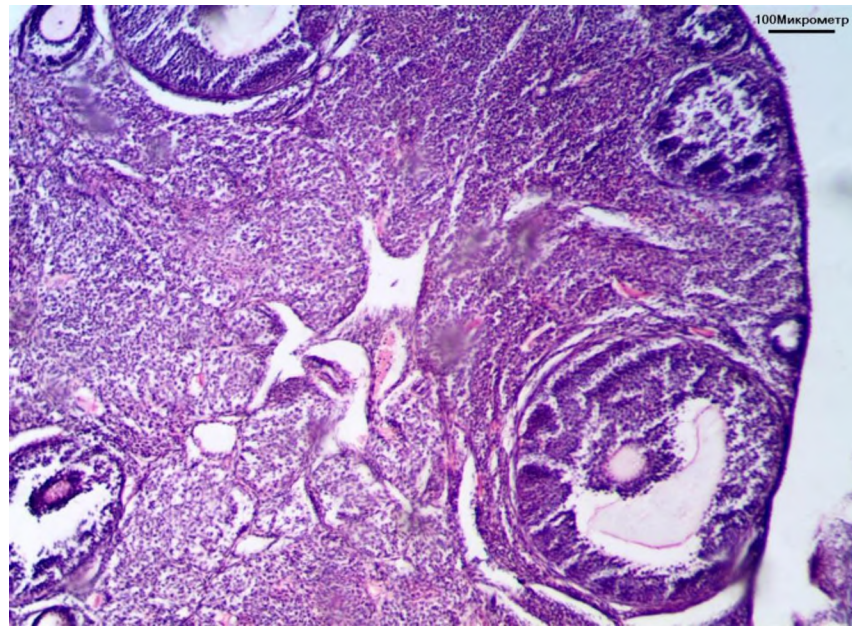


Рис.5.12. Мікропрепарат яєчника миші через 8 тижнів після моделювання ПНЯ та лікування інтраовуляторним введенням МСК ЖТ. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Масштабна лінійка 100 мкм.

Таким чином, після лікування хіміоіндукованої ПНЯ за допомогою клітинних та плацентарних біологічно активних похідних результати гістологічних досліджень статевих органів самиць мишей виявили відновлювальну дію на статеву систему самиць мишей. Також при застосування МСК ЖТ спостерігалися морфологічні зміни, які є ознакою відновлення структури: поява жовтих тіл, примордіальних та первинних фолікулів. А при інтраоваріальному введенні МСК ЖТ навіть поодиноких вторинних фолікулів.

Отримані результати можна пояснити, ураховуючи ревіталізуючі властивості МСК та КП, пов'язані, зокрема, з наявністю в них багатьох

біологічних чинників росту та сигнальних молекул, які позитивно впливають на відновлення клітинних ушкоджень та функцій, нормалізацію метаболізму.

Плацентарні похідні, до яких відноситься кріоконсервований екстракт плаценти, є джерелом пептидів, гомологічних гонадотропінам і лактогену, а також речовини, які мають властивості гормону росту. Крім цього, виділені β -ендорфіни, β -ліпопротеїди, α -меланоцитостимулюючий гормон, пептиди з імуностимулюючим ефектом і що стимулюють ріст м'яких тканин. Плацента багата ферментами: термостабільна плацентарна лужна фосфатаза бере участь у відновлювальних процесах і репаративній регенерації. Препарати, отримані з плаценти, сприяють формуванню нових структур і адекватній перебудові наявних тканин, особливо за допомогою плацентарних факторів росту різних класів та регулюванням процесів апоптозу. Поглинання плацентарними макрофагами апоптичних клітин призводить до пригнічення медіаторів запалення та індукції протизапальних цитокінів [23].

Застосування МСК обумовлене їх здатністю впливати на фолікулогенез, збільшуючи кількість антиапоптичних і трофічних білків і відновлюючи функцію яєчників через паракринний ефект на клітини яєчників [52, 141]. МСК мають імуномодулюючу дію, впливають на диференціацію клітин, стимулюють проліферацію клітин ендометрію та пригнічують гени фіброзу, таким чином позитивно діючи на регенерацію пошкоджених тканин [157]. МСК відіграють певну роль через самонаведення клітин, секрецію активних факторів і участь в імунній регуляції та, в порівнянні з ембріональними стовбуровими клітинами, мають менше етичних пересторог [66].

Таким чином, лікування модельованої ПНЯ із застосуванням МСК та КП має відновлювальну дію на статеву систему самиць мишей. Усі застосовані методи лікування позитивно впливали на естральний цикл та статеву активність, а також на морфологічну структуру яєчників та маток. Хоча повного відновлення фертильності самиць мишей після лікування ПНЯ за час спостереження не відбувалося, проте інтраоваріальний метод введення

МСК ЖТ забезпечував більш швидке відновлення морфофункціонального стану органів репродуктивної системи.

Резюме. При лікуванні передчасної недостатності яєчників введенням адипозних мезенхімальних стовбурових клітин відновлення оваріальної функції самиць мишей за даними, отриманими при вивченні естрального циклу та статевої поведінки, відбувалося одночасно з позитивними морфологічними змінами в матках та яєчниках, що є ознакою відновлення функцій цих органів.

Лікування мишей з індукованою хіміотерапією моделлю ПНЯ за допомогою МСК ЖТ та КП має різну, але порівнянну, ефективність у залежності від способу їх введення.

Більш повне та швидке відновлення морфологічної структури органів репродукції (яєчників та маток) при інтраоваріальному методі введення мезенхімальних стовбурових клітин, порівняно з інтраперитонеальним та парентеральним методами, може бути наслідком паракринного впливу мезенхімальних стовбурових клітин на клітини в місці введення.

Список праць, опублікованих за темою розділу дисертації:

1. Козуб ММ, Козуб МІ, Скибіна КП. Експериментальне обґрунтування застосування кріоекстракту плаценти у пацієнок з синдромом передчасної недостатності яєчників. Збірник наукових праць співробітників НМАПО ім. П.Л.Шупіка. 2016;27(1):117-23.

АНАЛІЗ ТА ОБГОВОРЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Передчасна недостатність яєчників (ПНЯ) – багатофакторний синдром, що супроводжується відсутністю регулярного менструального циклу, високою концентрацією гонадотропінів і низьким рівнем естрогенів у сироватці крові в жінок до 40 років [21, 51, 87, 98, 121, 130]. Розповсюдженість ПНЯ у дівчат підліткового віку складає 0,01%, а в жінок пропорційного віку: до 20 років – 1:10000, до 30 років – 1:1000, до 40 років 1 – %. Середній вік розвитку ПНЯ становить $26,8 \pm 1,6$ року [71, 78]. Розрізняють першу форму ПНЯ, яка відрізняється скороченням кількості або повною відсутністю фолікулів, етіологічними причинами якої є генетичні аномалії, ускладнення хіміотерапії, променевої терапії, ятрогенні причини (хірургічні операції на яєчниках); та другу форму, при якій кількість фолікулів не змінено, а здебільшого головною причиною ПНЯ є автоімунні хвороби, які ушкоджують зрілі фолікули, але залишають примордіальні фолікули інтактними [74, 99, 197].

Половина жінок із ПНЯ можуть мати овуляцію та нерегулярний цикл, однак вірогідність вагітності вкрай низька, відсоток не перевищує 5-10% [21]. Нестача головного жіночого гормону, естрогену, призводить до характерної симптоматики: припливів, гіпергідрозу, нестабільності нервової системи, зниження лібідо, ослаблення, сухості шкіри та слизової оболонки.

Синдром передчасної недостатності яєчників як прояв їх гіпофункції, супроводжується, окрім аменореї, комплексом вегетосудинних, психоневрологічних та метаболічних порушень.

Резерв яєчників оцінюється на 3-й день циклу визначенням рівнів антимюллерового гормону (АМГ), фолікулостимулюючого гормону (ФСГ), кількості антральних фолікулів, тесту на інгібін В та естрадіол (E2). ПНЯ характеризується підвищенням рівня ФСГ (ФСГ > 25 МО / л), зменшенням рівня E2 (< 20 пг/мл), значно зменшеним рівнем АМГ (< 1 нг/мл), зниженням рівня інгібіну В, а також низькою кількістю антральних фолікулів [96,137].

Також для оцінки оваріального резерву визначається рівень ФСГ, який теж може змінюватися залежно від циклу. Загально визнано, що рівень $ФСГ > 15$ МО / л є відхиленням від норми, а при $ФСГ > 20$ МО / л шанси завагітніти зводяться до мінімуму.

У лікуванні жінок з передчасною недостатністю яєчників використовують гормонозамісну терапію: оральні контрацептиви, естрогени, гонадотропіни [105, 188, 200]. Терапія трансдермальним естрадіолом у дозі 100 мкг щодня з додаванням прогестерону в циклічному режимі впродовж 10-12 днів кожного місяця має протекторну дію щодо розвитку гіперплазії та раку ендометрію. Однак, тривала гормонозамісна терапія має велику кількість побічних реакцій: збільшує ризик розвитку раку молочної залози, запускає індукцію ендотеліальної дисфункції, підвищуючи клітинну адгезію, що призводить до серцевих ускладнень, інсультів, інфарктів, артеріальних захворювань і венозних тромбоемболій, викликаючи патологічні зміни органів-мішеней, одним з яких є печінка [3]. При застосуванні гормонів для лікування ПНЯ, завдяки феномену «першого проходження через печінку», відбуваються значні метаболічні перетворення, у першу чергу ліпідного метаболізму [143, 173].

Через велику кількість ускладнень після застосування гормонозамісної терапії актуальним є питання щодо пошуку альтернативних методів лікування ПНЯ.

Найперспективніші серед них – це застосування плацентарних клітин і препаратів з плаценти та використання МСК різного походження [126, 216]. Препарати, отримані з плаценти, сприяють формуванню нових структур та ефективній реконструкції існуючих тканин, перш за все за рахунок плацентарних факторів росту різних класів та контролю процесів апоптозу. Плацентарні клітини активно продукують проапоптичні сигнали: TNF, LT, FasL, TRAIL, TWEAK, LIGHT, власне ініціюють та активують апоптоз [23].

Одним з успішних способів лікування ПНЯ є використання стовбурових клітин, що поліпшує функцію яєчників за рахунок збільшення експресії споріднених гормонів та запобігання апоптозу гранульозних клітин, що свідчить про їх терапевтичний потенціал [74, 81, 88, 93, 132, 136, 180, 186, 217].

Терапевтичний ефект МСК складається з двох основних елементів. Перший зв'язаний з їх замісною функцією – хоумінга. МСК здатні диференціюватися та замінювати пошкоджені клітини, вони вибірково репопулюють клітини в місця дефекту тканини чи органу та диференціюються *in vivo* імплантованих клітин під впливом місцевих сигналів.

Другий елемент терапевтичної дії МСК – їх здатність до паракринної дії – форма міжклітинного взаємозв'язку, при якому клітина передає сигнал сусідній клітині, який змінює її поведінку [53, 131, 158, 164]. Жирова тканина вважається доступним джерелом МСК.

МСК з жирової тканини людини (МСК ЖТ) отримують з підшкірної жирової тканини, видаленої під час операцій ліпосакції або абдомінопластики. У порівнянні з МСК кісткового мозку, МСК ЖТ мають вищі здатності до проліферації та самовідновлення й демонстрували вищу генетичну стабільність у довготривалій культурі [69, 93, 108, 171, 174].

Таким чином, актуальним завданням сучасної гінекології є пошук більш безпечних методів лікування ПНЯ, які б, позитивно впливаючи на репродуктивну функцію, не порушували функцій інших важливих органів і систем.

Мета дослідження – відновлення функції репродуктивних органів та органів детоксикації самиць мишей, поліпшення їх поведінкових реакцій в експериментальній моделі передчасної недостатності яєчників за допомогою кріоконсервованого екстракту плаценти та мезенхімальних стовбурових клітин жирової тканини.

Для досягнення мети були визначені такі завдання:

1. Вивчити вплив кріоконсервованого екстракту плаценти, введеного парентерально, на відновлення овуляторного циклу, статевої активності та морфологічної структури репродуктивних органів та органів детоксикації (печінки та нирок) самиць мишей лінії BALB-с з моделлю ПНЯ.
2. Вивчити вплив мезенхімальних стовбурових клітин жирової тканини, введених інтраперитонеально, на відновлення овуляторного циклу, статевої активності та морфологічної структури репродуктивних органів та органів детоксикації (печінки та нирок) самиць мишей лінії BALB-с з моделлю ПНЯ.
3. Вивчити вплив мезенхімальних стовбурових клітин жирової тканини, введених інтраовуляторно, на відновлення овуляторного циклу, статевої активності та морфологічної структури репродуктивних органів та органів детоксикації (печінки та нирок) самиць мишей лінії BALB-с з моделлю ПНЯ.
4. Вивчити вплив кріоконсервованого екстракту плаценти, введеного парентерально, мезенхімальних стовбурових клітин жирової тканини, введених інтраперитонеально та інтраовуляторно, на динаміку ваги та поведінкові реакції самиць мишей лінії BALB-с з моделлю ПНЯ.
5. Визначити доцільність використання кріоекстракту плаценти й мезенхімальних стовбурових клітин жирової тканини в комплексі заходів, спрямованих на ревіталізацію органів репродуктивної системи, органів детоксикації, а також на покращення якості життя при лікуванні ПНЯ.

Об'єкт дослідження – вплив методів клітинної та плацентарної терапії на фертильність самиць мишей лінії BALB-с з модельованою ПНЯ.

Предмет дослідження – морфологічні характеристики репродуктивних органів (матки та яєчників) та органів детоксикації (нирок та печінки) самиць

мишей лінії BALB-с з моделлю ПНЯ, їх овуляторний цикл, статеву активність, вагу та поведінку.

Відповідно поставленої мети та завданням дослідження було проведено експеримент на 50 самицях мишей лінії BALB/с середньою масою $20,1 \pm 1,2$ г у віці 6 місяців.

На 1 етапі реалізували вибір моделі та моделювання ПНЯ на лабораторних мишах. На 2 здійснювали терапію мишей з ПНЯ з використанням кріоекстракта плаценти введенням парентерально та стовбурових клітин жирової тканини введених інтраперитонеально та інтраоваріально. На 3 етапі оцінювали ревіталізуючу ефективність застосованих аlogenного клітинного та ксеногенного безклітинного біологічно активних препаратів за головними ефектами лікування ПНЯ (відновлення ваги, поведінкових реакцій, функції репродуктивних органів (матка, яєчники) та функції органів детоксикації (печінка, нирки) після впливу хіміотерапії – найпоширенішого чинника виникнення ПНЯ.

Тварини були розподілені на 5 груп по 10 мишей:

1-а (контрольна група) –самиці мишей лінії BALB/с;

2-а група – самиці мишей лінії BALB/с з моделлю ПНЯ без лікування;

3-я група –самиці мишей лінії BALB/с з моделлю ПНЯ та лікуванням за допомогою парентерального введення КП;

4-а група – самиці мишей лінії BALB/с з моделлю ПНЯ та лікуванням за допомогою інтраперитонеального введення МСК ЖТ;

5-а група - самиці мишей лінії BALB-с з моделлю ПНЯ та лікуванням за допомогою інтраоваріального введення МСК ЖТ.

Для моделювання хіміоіндукованої ПНЯ була обрана модель циклофосфамідіндукованої ПНЯ, описаної Xiao G.Y. зі співавторами [206] як найбільш відтворювана та найбільш розповсюджена за даними літератури. Принцип моделі засновано на пригніченні функції яєчників унаслідок хіміотерапії. Важливою перевагою моделі перед оваріоектомічними аналогами є залишення яєчників та можливість відновлення їх функції після

лікування. Модель супроводжується загальним токсичним впливом та навантаженням на органи детоксикації – печінку та нирки. Для відтворення моделі тваринам одноразово вводили циклофосфамід у дозі 200 мг/кг і бусульфан (у дозі 20 мг/кг).

Через 2 тижні після моделювання ПНЯ шляхом введення циклофосфаміду та бусульфану підтверджували за втратою ваги та результатами кольпоцитологічного дослідження (еструс/анеструс) та починали лікування. Через 4 тижні після хіміотерапії по 5 тварин з кожної групи виводили з експерименту, проводячи гістологічне дослідження препаратів органів репродукції – яєчників і маток та органів детоксикації – печінки і нирок. Через 8 тижнів усіх тварин усіх груп виводили з експерименту.

Кріоконсервований екстракт плаценти отримували методом, описаним [40] з плаценти людини, після операції кесарева розтину за умови інформованої згоди жінки. Мезенхімальні стовбурові клітини жирової тканини (МСК ЖТ) мишей отримували за методом Sun M. зі співавторами [173]. Жирову тканину отримували із черевної порожнини мишей лінії BALB/c віком 6-8 місяців.

Перед початком дослідження в усіх самиць досліджували естральний цикл протягом двох тижнів методом вагінальних мазків (кольпоцитології). До дослідження брали тільки самиць з регулярним естральним циклом. Для визначення статевої активності самиць мишей спарювали із самцями лінії BALB/c віком 6-8 місяців, які мали раніше нащадків, тобто були фертильними, у співвідношенні 3:1. Кожного ранку наявність спарювання реєстрували за наявністю вагінальних пробок, при наявності сумнівів досліджували вміст піхви під мікроскопом на наявність сперміїв. Зважування самиць мишей усіх досліджуваних груп проводили двічі на тиждень за допомогою лабораторних вагів.

Поведінкові реакції тварин оцінювали, використовуючи тести відкритого поля, анксиолітичний і зоосоціальний, що відображають пошукову

поведінку, ступінь тривожності та здатність тварин до зоосоціальної взаємодії, відповідно [104, 117, 193].

Морфологічне дослідження органів проводили після виведення тварин з експерименту. Досліджували: матку, яєчники, нирки та печінку.

За підсумками роботи можна відзначити, що моделювання ПНЯ застосуванням ХТП вірогідно погіршує загальний стан тварин (2 група), знижує вагу (на 15%), пригнічує поведінкові реакції, призводить до посилення тривоги (на 41,4%), погіршує зоосоціальну поведінку (на 60,8%).

Лікування КП (3 група) прискорює нормалізацію ваги (на 4.3%), веде до покращення показників анксиолітичної поведінки (на 69,5%), покращує зоосоціальну поведінку (на 42%).

Лікування тварин МСК ЖТ шляхом перитонеального введення (4 група) прискорює нормалізацію ваги (на 4.8%), покращує зоосоціальну поведінку (на 10%), але не призводить до покращення показників анксиолітичної поведінки.

Лікування тварин МСК ЖТ шляхом інтраоваріального введення (5 група) прискорює нормалізацію ваги (на 7,5%), покращує зоосоціальну поведінку (на 40%), веде до покращення показників анксиолітичної поведінки (на 60,87%).

У мазках мишей після відтворення моделі ПНЯ (група 2) був відсутній поверхневий епітелій, циклічність з'являлася через 5 тижнів після моделювання ПНЯ, при цьому регулярний 4-денний естральний цикл не відновлювався: спостерігалася періодична (від 3 до 8 днів) поява в мазку ороговілих клітин поверхневого епітелію, що свідчить про естрогенну насиченість організму. Через 8 тижнів естральні цикли спостерігалися в 60% мишей, що відповідає літературним даним для використаної моделі [13].

Лікування мишей 3,4,5 груп починали через 2 тижні після початку хіміотерапії, коли у всіх мишей спостерігалася відсутність естрального циклу.

Естральний цикл після хіміотерапії та лікування методом парентерального введення КП з'явилися в 3 групі в 20% мишей на 3-й тиждень, у 40% – на 5 тиждень, у 80% – на 8 тиждень.

Естральний цикл після хіміотерапії та лікування методом інтраперитонеального введення МСК ЖТ у 4 групи з'явилися в 30% мишей на 3-й тиждень, у 40% – на 5 тиждень, у 80% – на 8 тиждень.

У самиць, яким вводили МСК ЖТ інтраоваріально (5 група), естральний цикл у 20% мишей відновився на 3-й тиждень, у 40% на 5 тиждень, а вже на 7-му тижні у 80% тварин .

Вивчення статевої активності показало, що кількість ефективних спарювань самиць через 8 тижнів після моделювання ПНЯ склало 40%. Вагінальні пробки після хіміотерапії та лікування методом парентерального введення КП з'явилися в 3 групі у 20% мишей на 5-й тиждень, у 60% – на 8 тиждень.

Результати в 4-ій групі мишей були дещо краще, на 5-му тижні вагінальні пробки спостерігалися в 40% тварин, а на 8 тижні у – 80%.

Найкращі результати показала 5 група з введенням МСК ЖТ інтраоваріально: уже на 5-му тижні вагінальні пробки з'явилися в 40% самиць мишей, на 6-му тижні – у 60%, а на 8 тижні – у 80%.

При гістологічному дослідженні у 2 групі мишей на 4 тиждень після моделювання ПНЯ звертало на себе увагу зменшення маток, різка атрофія та витончення всіх верств. Яєчники були також зменшені, відзначалося зниження кількості первинних та повна відсутність вторинних фолікулів, атрофія, зморщування клітин. У нирках спостерігався набряк кіркового та мозкового шарів, зморщування клубочків. Морфологічні зміни в нирках мали ознаки тубулоінтерстиціального нефриту. У печінці спостерігався набряк та порушення балочної структури, відповідали проявам гострого медикаментозного ураження з ознаками холестеринової мікроемболії, цирозу та порушенням балкової структури.

Через 8 тижнів після моделювання ПНЯ – спостерігали збільшення жирової тканини в черевній порожнині. Яєчники були зменшені у розмірах, зазначалася відсутність структурних елементів: жовтих тіл, примордіальних, первинних та вторинних фолікулів; строма була заповнена великими клітинами. У матках спостерігали витончення шарів та значну атрофію ендометрію, проте менш виражені, ніж на 4-му тижні після хіміотерапії.

У нирках виявлено зморщування клубочків і набряк канальців, що зберігається, у печінці – вогнища цирозу, порушення балочної структури та ділянки поліморфізму ядер. Вочевидь, відновлення естрогенної насиченості організму групи без лікування відбувається за рахунок жирової тканини, а не яєчників.

Гістологічне дослідження мікропрепаратів мишей 3-ї групи показало незначну атрофію ендометрію, потовщення міометрію в матках, а в яєчниках – появу фолікулоподібних утворень. Тоді як у 4-ї групи виявлена незначна атрофія ендометрію в матках та появи структурних елементів в яєчниках: жовтих тіл, примордіальних та первинних фолікулів. При гістологічному дослідженні мишей 5-ї групи матка була близька до інтактною, а в яєчниках відзначалася поява значної кількості первинних фолікулів та поодиноких вторинних фолікулів.

При дослідженні печінки мишей 3,4,5 груп, яким проведено лікування модельованої ПНЯ введенням тваринам МСК ЖТ та КП, приводило до покращення морфологічної картини печінки: у тварин з 3-ої та 4-ої груп у печінці відзначалося збереження балкової структури, спостерігалися клітинний поліморфізм та підвищена неоднорідність, набряк. Але інтраоваріальне введення МСК ЖТ мало суттєву ревіталізуючу дію на тканину печінки піддослідних тварин: на 8-му тижні після початку лікування спостерігалися ознаки інтенсивного ділення клітин, відсутність набряку та холестеринової мікροемболії.

У нирках мишей 3,4 груп гістологічне дослідження показало наявність незначного набряку, зморщування окремих клубочків. Однак у мишей 5 групи структура нирок на 4 тижні була збережена, проте спостерігалось зморщування окремих клубочків та сильний набряк, а на 8 тижні – патологічних змін уже не було виявлено.

При лікуванні передчасної недостатності яєчників у мишей 4,5 груп введенням адипозних мезенхімальних стовбурових клітин відновлення оваріальної функції самиць мишей за даними, отриманими при вивченні естрального циклу та статевої поведінки, відбувалося одночасно з позитивними морфологічними змінами в матках та яєчниках, що є ознакою відновлення функцій цих органів.

Таким чином, результати дослідження ефективності клітинної та плацентарної терапії ПНЯ в експерименті доводять ревіталізуючі властивості КП та МСК ЖТ, які в майбутньому можуть бути використані для розробки нових і вдосконалення існуючих методів лікування ПНЯ та її ускладнень.

ВИСНОВКИ

1. Лікування модельованої ПНЯ парентеральним введенням КП відновлює естральний цикл у 80% мишей, статеву активність – у 60% тварин на 8-му тижні спостереження. Гістологічне дослідження показало, що в матці спостерігалася незначна атрофія ендометрію та гіперплазія міометрію, а в яєчниках відзначалася поява утворень, схожих на фолікули. У печінці – ознаки набряку при збереженій балковій структурі, в нирках відзначалися помірне зморщування клубочків та помірний набряк зі збереженою архітектонікою каналців.

2. Лікування модельованої ПНЯ застосуванням МСК ЖТ, введеними інтраперитонеально, відновлює естральний цикл у 80% мишей та статеву активність – у 80% тварин на 8-му тижні спостереження. В матці спостерігалася незначна атрофія ендометрію зі збереженою структурою міометрію, в яєчниках з'являлися структурні елементи: жовті тіла, примордіальні та первинні фолікули. У печінці – ознаки набряку при збереженій балковій структурі. В нирках відзначалися набряк та ознаки холестеринової мікροемболії зі збереженою архітектонікою каналців.

3. Лікування модельованої ПНЯ застосуванням МСК ЖТ, введеними інтраоваріально, відновлює естральний цикл у 80% мишей на 7-му тижні, а статеву активність у 80% мишей - на 8-му тижні спостереження. Морфологічно матка була близька до інтактної, а в яєчниках відзначалося відновлення структурних елементів: жовтих тіл, примордіальних, первинних та поява вторинних фолікулів. У печінці зберігалася балкова структура, без ознак набряку, а в нирках гістологічна картина була близькою до інтактної.

4. Лікування тварин за допомогою КП та МСК дозволяє вірогідно покращити поведінкові реакції та нормалізувати вагу. Встановлено, що лікування введенням КП парентерально покращує показники анксіолітичної

поведінки (на 69,5%) та зоосоціальної поведінки (на 42,0%). Лікування тварин МСК ЖТ, введеними інтраперитонеально, покращує зоосоціальну поведінку (на 10%), але не призводить до покращення показників анксіолітичної поведінки. Встановлено, що лікування тварин МСК ЖТ шляхом інтраоваріального введення покращує зоосоціальну поведінку (на 40%) та анксіолітичну поведінку (на 60,9%).

5. Проведене експериментальне дослідження встановило високу ефективність застосування КП та МСК ЖТ в ревіталізації репродуктивних органів та органів детоксикації, та покращенні поведінкових реакцій у експериментальних тварин, що стало підґрунтям для клінічного застосування досліджених методів терапії в жінок з ПНЯ і буде сприяти покращенню показників їх фертильності та якості життя.

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. Використання для лікування ПНЯ парентерального введення КП, інтраперитонеального та інтраоваріального введення МСК ЖТ є перспективними, патогенетично обґрунтованими методами лікування для відновлення репродуктивної функції та покращення функціонування органів детоксикації, позитивного впливу на поведінку, що підвищує якість життя.

2. Виявлені ефекти терапевтичної дії КП та МСК жирової тканини можуть використовуватися в розробці нових і вдосконалення існуючих методів лікування ПНЯ та її ускладнень.

3. Удосконалення алгоритму лікувальних заходів після хіміотерапії повинно включати використання КП та МСК ЖТ, ефекти яких спрямовані на одночасне відновлення функціонування репродуктивних органів та органів детоксикації, та поведінкових реакцій, що буде сприяти зменшенню наслідків хіміотерапії, запобігатиме ускладненням та підвищуватиме якість життя пацієнтів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Бутко АЮ, Вороненко ДВ. Ретроспективний аналіз наукових публікацій фармацевтичного журналу за 1959-2022 рр. щодо проблеми репродуктивного здоров'я жінок. Український журнал військової медицини. 2022;3(3):150-7. doi: [10.46847/ujmm.2022.4\(3\)-134](https://doi.org/10.46847/ujmm.2022.4(3)-134).
2. Венцківська ІБ, Загородня ОС, Наритник ТТ. Раннє припинення менструальної функції: сучасні погляди на патогенез і наслідки. Репродуктивна ендокринологія. 2019;4(48):8-12. doi: [10.18370/2309-4117.2018.48.8-12](https://doi.org/10.18370/2309-4117.2018.48.8-12).
3. Веропотвелян ПН, Соломкіна АЮ, Веропотвелян МП, Гламазда МІ, Пивнев МС. Серцево-судинні захворювання і передчасна недостатність яєчників. Здоров'я жінки. 2016;1:127-31.
4. Гладких ФВ, Чиж МО. Характеристика механізмів протизапальної дії кріоконсервованого екстракту плаценти та диклофенаку натрію за їх нарізного введення. Сучасні медичні технології. 2021;3(50):41-7. doi: [10.34287/ММТ.3\(50\).2021.8](https://doi.org/10.34287/ММТ.3(50).2021.8).
5. Годованець О, Гальчук К, Муринюк Т, Саука Е. Мезенхімальні стовбурові клітини одонтогенного походження: перспективи та можливості регенеративної медицини. Вісник стоматології. 2021;16(3):33-40. doi: [10.35220/2078-8916-2021-41-3.6](https://doi.org/10.35220/2078-8916-2021-41-3.6).
6. Горбатюк ОГ, Шатковская АС, Григоренко АП, Васьків ОВ, Бец Ю, Кустовская ІН, та ін. Особливості порушень репродуктивного здоров'я жінок, що пов'язані з тривалими стресовими ситуаціями. Запорізький медичний журнал. 2019;6(117):764-70. doi: [10.14739/2310-1210.2019.6.186465](https://doi.org/10.14739/2310-1210.2019.6.186465).
7. Горбатюк О, Григоренко А, Шатковська А, Васьків О, Герич О, Петраш А. Особливості гормонального гомеостазу жінок з функціональною гіпоталамічною аменореєю та передчасною

- недостатністю яєчників, спричинених посттравматичним стресовим розладом. Репродуктивне здоров'я жінки. 2023;3:65-72. doi: [10.30841/2708-8731.3.2023.283324](https://doi.org/10.30841/2708-8731.3.2023.283324).
8. Грабовий ОМ, Невмержицька НМ, Яременко ЛМ, Костинський ГБ, Демидчук АС, Кондаурова ГЮ. Мезенхімальні стовбурові клітини: різноманітність. Pathologia. 2023;20(1):76-84. doi: [10.14739/2310-1237.2023.1.272938](https://doi.org/10.14739/2310-1237.2023.1.272938).
 9. Градиль ОГ, Грищенко ОВ, Пасиешвили НМ, Лазуренко ВВ, Карпенко ВГ. Современные аспекты менеджмента пациенток с синдромом преждевременного истощения яичников. Репродуктивна ендокринологія. 2019;49:58-61. doi: [10.18370/2309-4117.2019.49.58-61](https://doi.org/10.18370/2309-4117.2019.49.58-61).
 10. Григор'єва ОА, Тополенко ТА, Ковальчук КС. Особливості формування примордіальних фолікулів у яєчниках потомства щурів після внутрішньоутробного впливу прогестерону. В: Мат. Всеукр. наук. практ. конф. «Trends in science and practice of today»; Запоріжжя: ЗДМУ; 2021, с. 65-6.
 11. Грищенко ВИ, Юрченко ТН, ред. Плацента: криоконсервирование, структура, свойства, перспективы клинического применения. Харьков: СПД ФЛ Бровин АВ; 2011. 292 с.
 12. Грищенко МГ. Патогенетичні основи вдосконалення допоміжних репродуктивних технологій у жінок, які перенесли хронічні запальні захворювання органів малого таза [автореферат]. Харків: ХДМУ; 2011. 36 с.
 13. Дем'янцева ЮВ. Вплив алогенних стовбурових клітин на зміни синовіальної рідини в колінному суглобі кролів в умовах експериментального остеоартрозу. Scientific Progress & Innovations. 2020;2:202-9. doi: [10.31210/visnyk2020.02.25](https://doi.org/10.31210/visnyk2020.02.25).
 14. Дубоссарская ЗМ, Дубоссарская ЮА. Проблемы репродуктивного старения женщин и необходимость протективной anti-aging терапии. Медичні аспекти здоров'я жінки. 2019;7:5-9.

15. Дубоссарська ЗМ. Диференційні підходи до діагностики та можливої реабілітації хворих з передчасною недостатністю яєчників (глінічна лекція). Збірник наукових праць Асоціації акушерів-гінекологів України. 2022;2:17-20. doi: [10.35278/2664-0767.2\(50\).2023.274975](https://doi.org/10.35278/2664-0767.2(50).2023.274975).
16. Загричук ОМ, Палій ІР, Довгалюк АІ, Крамар СБ, Лавренчук ГЙ. Цитогенетичне дослідження мезенхімальних стовбурових клітин із пуповини щурів, культивованих in vitro. Вісник медичних і біологічних досліджень. 2022;1:39-44. doi: [10.11603/bmbr.2706-6290.2022.1.12970](https://doi.org/10.11603/bmbr.2706-6290.2022.1.12970)
17. Козира, О С, Медведєв МВ. Сучасний погляд на етіологію, патогенез та можливості діагностики патології ендометрія як причини безпліддя (огляд літератури). Актуальні питання педіатрії, акушерства та гінекології. 2022;1:80-6. doi: [10.11603/24116-4944.2021.1.12360](https://doi.org/10.11603/24116-4944.2021.1.12360).
18. Козуб ММ, Козуб МІ, Петренко ОЮ, Сокол МП. Біореабілітація в акушерстві та гінекології. Навчальний посібник для самостійної роботи слухачів. Харків: ХМАПО, 2020. 53 с.
19. Козуб ММ, Козуб МІ, Скибіна КП. Експериментальне обґрунтування застосування кріоекстракту плаценти у пацієнок з синдромом передчасної недостатності яєчників. Збірник наукових праць співробітників НМАПО ім. П.Л.Шупіка. 2016;27(1):117-23.
20. Козуб ММ, Ладна ІД, Козуб МІ, винахідники; ХМАПО та ТОВ «Інститут новітніх медичних технологій», патентовласники. Спосіб відновлення рецепторів ендометрія у пацієнок, що перенесли запальні захворювання матки. Патент України на корисну модель №109874. 2016 Вер 12.
21. Козуб МН, Скибіна КП, Козуб НИ, Прокопюк ВЮ. Реалии и перспективы использования клеточной и тканевой терапии в лечении преждевременной недостаточности яичников (обзор литературы). Збірник наукових праць асоціації акушерів-гінекологів України. 2017;1:70-5.

22. Козуб НИ, Скибина КП, Козуб МН. Экспериментальное обоснование и первый опыт клинического применения криоэкстракта плаценты для лечения синдрома преждевременной недостаточности яичников. В: Мат. XII межд. конф. «Актуальные вопросы акушерства, гинекологии и перинатологии»; 2016 Май 12; Судак:ТОК «Судак»; 2016, с. 28-9.
23. Козуб НИ, Козуб МН, Безбородая ДВ, Рыженко ЮВ. Использование криоэкстракта плаценты для лечения заболеваний и возрастных изменений организма человека. Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісник української медичної стоматологічної академії. 2015;4:319-24.
24. Лук'янова ЄМ, Павлова ОО, Губіна-Вакулік ГІ, Горбач ТВ. Вплив введення мезенхімальних стовбурових клітин на структуру та функцію нейропіля великих півкуль головного мозку щурів з експериментальною нітритіндукованою деменцією. Фізіологічний журнал. 2022;5:51-9. doi: [10.15407/fz68.05.051](https://doi.org/10.15407/fz68.05.051).
25. Надашкевич О, Макагонов І, Вергун А, Кіт З, Вергун О, Олексюк О. Неплідний шлюб: порівняльна оцінка діагностичної інформативності рентгенівської гістеросальпінгографії та ехогістеросальпінгоскопії у жінок пізнього фертильного віку. Перспективи та інновації науки. 2023;12(30):1000-13. doi: [10.52058/2786-4952-2023-12\(30\)-1000-1013](https://doi.org/10.52058/2786-4952-2023-12(30)-1000-1013).
26. Оренчук ІВ, Бойчук ОГ. Стан репродуктивної системи у жінок пізнього репродуктивного віку із вторинним непліддям після гістероскопічної метропластики. Актуальні питання педіатрії, акушерства та гінекології. 2022;2:94-7. doi: [10.11603/24116-4944.2021.2.12762](https://doi.org/10.11603/24116-4944.2021.2.12762).
27. Прокопюк В Ю, Пасієшвілі НМ, Прокопюк ОВ, Карпенко ВГ, Логінова ОО. Вплив кріоконсервованих експлантів плаценти на прояви ускладнень після операціях на матці в експерименті. Вісник проблем біології і медицини. 2019; 2(2):151-5. doi: [10.29254/2077-4214-2019-2-2-151-151-155](https://doi.org/10.29254/2077-4214-2019-2-2-151-151-155).

28. Прокопюк ВЮ, Шевченко НА, Фалько ОВ, Мусатова ИБ, Лазуренко ВВ, Тищенко АН и др. Криоконсервированные экспланты плаценты увеличивают продолжительность жизни мышей-самцов и изменяют показатели выживаемости мышей-самок. Проблемы криобиологии и криомедицины. 2017;27(2):143-50.
29. Прокопюк ОС. Криоконсервування плаценти та визначення механізмів її впливу на організм реципієнтів пізнього онтогенезу [автореферат]. Харків: Інститут проблем криобіології і криомедицини Національної академії наук України; 2014. 36 с.
30. Сивак ЛА, Лялькін СА, Мартинюк ОМ, Досенко ІВ, Верьовкіна НО, Тарасенко ТЄ, та ін. Збереження фертильності у пацієнтів з раком грудної залози. Клінічна онкологія. 2018;1(29):65-8.
31. Слободянюк ОВ. та ін. Порушення метаболізму при проведенні хіміотерапевтичного лікування. В: 17th Intern. scien. pract. conf. «System analysis and intelligent systems for management»; 2023 May 2-5; Ankara, Turkey: International Science Group; 2023. p. 179.
32. Стефанов ОВ, редактор. Доклінічні дослідження лікарських засобів: Метод. рекомендації. Київ: Авіцена; 2001. 528 с.
33. 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.
34. Тронько МД, Ковзун ОІ, Пушкарьов ВМ. Застосування стовбурових клітин в ендокринології: проблеми і перспективи. Ендокринологія. 2021;26(4):376-95. doi: [10.31793/1680-1466.2021.26-4.376](https://doi.org/10.31793/1680-1466.2021.26-4.376).
35. Тронько МД, Пушкарьов ВМ, Ковзун ОІ, Соколова ЛК, Пушкарьов ВВ. Мезенхімальні стовбурові клітини - головний ресурс клітинної терапії. Використання для лікування цукрового діабету. Ендокринологія. 2022;27(3):214-35. doi: [10.31793/1680-1466.2022.27-3.214](https://doi.org/10.31793/1680-1466.2022.27-3.214).
36. Фармацевтична енциклопедія. Лабораторні тварини [Internet]. URL: <https://www.pharmencyclopedia.com.ua>.

37. Хміль МС, Хміль-Досвальд АС, Хміль СВ. Синдром полікістозних яєчників як чинник ендокринного безпліддя. Вісник медичних і біологічних досліджень. 2019;2:77-83. doi: [10.11603/bmbr.2706-6290.2019.2.10607](https://doi.org/10.11603/bmbr.2706-6290.2019.2.10607).
38. Хміль СВ, Денефіль ОВ, Терлецька НЮ, Майорова ОЮ. Низький овуляторний резерв: причини виникнення, питання та відповіді. Актуальні питання педіатрії, акушерства та гінекології. 2020;2:167-72. doi: [10.11603/24116-4944.2020.2.11858](https://doi.org/10.11603/24116-4944.2020.2.11858).
39. Хміль МС, Хміль СВ. Оцінка ефективності контрольованої оваріальної стимуляції за довгим протоколом у жінок із безпліддям на фоні синдрому полікістозних яєчників. Актуальні питання педіатрії, акушерства та гінекології. 2019;2:143-8. doi: [10.11603/24116-4944.2019.2.10934](https://doi.org/10.11603/24116-4944.2019.2.10934).
40. Шевченко НО, Сомова КВ, Воліна ВВ, Прокопюк ВЮ, Прокопюк ОС. Динаміка активності та тривалості функціонування кріоконсервованого кріоекстракту, клітин та фрагментів плаценти в організмі експериментальних тварин. Морфологія. 2016;10(2):93-8. doi: [10.26641/1997-9665.2016.2.93-98](https://doi.org/10.26641/1997-9665.2016.2.93-98)
41. Шепітько КВ. Морфометрична характеристика стінки клубової кишки при введенні кріоконсервованої плаценти на тлі гострого асептичного запалення черевної порожнини у щурів. Світ медицини та біології. 2014; 3(45):158-161.
42. Юзько ВО. Особливості допоміжних репродуктивних технологій у пацієнток із безпліддям, пов'язаним з відсутністю овуляції [дисертація]. Чернівці: Буков. держ. мед. ун-т; 2023. 149 с.
43. Abd-Allah SH, Shalaby SM, Pasha HF, El-Shal AS, Raafat N, Shabrawy SM, et al. Mechanistic action of mesenchymal stem cell injection in the treatment of chemically induced ovarian failure in rabbits. Cytotherapy. 2013;15(1):64-75. doi: [10.1016/j.jcyt.2012.08.001](https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2012.08.001).

44. Abraham K, Londhe V, Sebastian T, Paul T, Kekre A. Impact of premature ovarian insufficiency on cardiovascular health. *Int J Reprod Contracept Obstet Gynecol.* 2018;7(9):3837-42. doi: [10.18203/2320-1770.ijrcog20183804](https://doi.org/10.18203/2320-1770.ijrcog20183804).
45. Ahmadian S, Sheshpari S, Pazhang M, Bedate AM, Beheshti R, Abbasi MM, et al. Intra-ovarian injection of platelet-rich plasma into ovarian tissue promoted rejuvenation in the rat model of premature ovarian insufficiency and restored ovulation rate via angiogenesis modulation. *Reprod Biol Endocrinol.* 2020;18(1):78. doi: [10.1186/s12958-020-00638-4](https://doi.org/10.1186/s12958-020-00638-4).
46. Ahmadian S, Sheshpari S, Mahdipour M, Pazhang M, Tsai PJ, Nouri M, et al. Toxic effects of VCD on kidneys and liver tissues: a histopathological and biochemical study. *BMC Res Notes.* 2019;12(1):446. doi: [10.1186/s13104-019-4490-y](https://doi.org/10.1186/s13104-019-4490-y).
47. Alawadhi F, Du H, Cakmak H, Taylor HS. Bone marrow-derived stem cell (BMDSC) transplantation improves fertility in a murine model of Asherman's syndrome. *PLoS One.* 2014;9(5):e96662-6. doi: [10.1371/journal.pone.0096662](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096662).
48. Altaner C, Altaneroova V, Cihova M, Hunakova L, Kaiserova K, Klepanec A, et al. Characterization of mesenchymal stem cells of "no-options" patients with critical limb ischemia treated by autologous bone marrow mononuclear cells. *PLoS One.* 2013;8(9):e73722. doi: [10.1371/journal.pone.0073722](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073722).
49. Ashkani Esfahani S, Esmaeilzadeh E, Bagheri F, Emami Y, Farjam M. The effect of co-enzyme q10 on acute liver damage in rats, a biochemical and pathological study. *Hepat Mon.* 2013;13(8):e13685. doi: [10.5812/hepatmon.13685](https://doi.org/10.5812/hepatmon.13685).
50. Atilgan R, Kuloğlu T, Boztosun A, Orak U, Baspınar M, Can B, et al. Investigation of the effects of unilateral total salpingectomy on ovarian proliferating cell nuclear antigen and follicular reserve: experimental study.

- Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol. 2015;188:56-60. doi: [10.1016/j.ejogrb.2015.02.028](https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2015.02.028).
51. Badawy A, Sobh MA, Ahdy M, Abdelhafez MS. Bone marrow mesenchymal stem cell repair of cyclophosphamide-induced ovarian insufficiency in a mouse model. *Int J Womens Health*. 2017;9:441-7. doi: [10.2147/IJWH.S134074](https://doi.org/10.2147/IJWH.S134074).
 52. Bahrehbar K, Rezazadeh Valojerdi M, Esfandiari F, Fathi R, Hassani SN, Baharvand H. Human embryonic stem cell-derived mesenchymal stem cells improved premature ovarian failure. *World J Stem Cells*. 2020;12(8):857-78. doi: [10.4252/wjsc.v12.i8.857](https://doi.org/10.4252/wjsc.v12.i8.857).
 53. Barry FP, Murphy JM. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004;36(4):568-84. doi: [10.1016/j.biocel.2003.11.001](https://doi.org/10.1016/j.biocel.2003.11.001).
 54. Bellipanni G, Bianchi P, Pierpaoli W, Bulian D, Ilyia E. Effects of melatonin in perimenopausal and menopausal women: a randomized and placebo controlled study. *Exp Gerontol*. 2001;36(2):297-310. doi: [10.1016/s0531-5565\(00\)00217-5](https://doi.org/10.1016/s0531-5565(00)00217-5).
 55. Berebichez-Fridman R, Montero-Olvera PR. Sources and Clinical Applications of Mesenchymal Stem Cells: State-of-the-art review. *Sultan Qaboos Univ Med J*. 2018;18(3):e264-77. doi: [10.18295/squmj.2018.18.03.002](https://doi.org/10.18295/squmj.2018.18.03.002).
 56. Besikcioglu HE, Saribas GS, Ozogul C, Tiryaki M, Kilic S, Pınarlı FA, et al. Determination of the effects of bone marrow derived mesenchymal stem cells and ovarian stromal stem cells on follicular maturation in cyclophosphamide induced ovarian failure in rats. *Taiwan J Obstet Gynecol*. 2019;58(1):53-9. doi: [10.1016/j.tjog.2018.11.010](https://doi.org/10.1016/j.tjog.2018.11.010).
 57. Heifets BD, Salgado JS, Taylor MD, Hoerbelt P, Cardozo Pinto DF, Steinberg EE, et al. Distinct neural mechanisms for the prosocial and rewarding properties of MDMA. *Sci Transl Med*. 2019;11(522):eaaw6435. doi: [10.1126/scitranslmed.aaw6435](https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaw6435).

58. Buccafusco JJ, editor. *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience*. 2nd. ed. Boca Raton: CRC Press, LLC; 2009. 343 p.
59. Caburet S, Todeschini AL, Petrillo C, Martini E, Farran ND, Legois B, et al. A truncating MEIOB mutation responsible for familial primary ovarian insufficiency abolishes its interaction with its partner SPATA22 and their recruitment to DNA double-strand breaks. *EBioMedicine*. 2019;42:524-31. doi: [10.1016/j.ebiom.2019.03.075](https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.03.075).
60. Cagliani J, Grande D, Molmenti EP, Miller EJ, Rilo HLR. Immunomodulation by Mesenchymal Stromal Cells and Their Clinical Applications. *J Stem Cell Regen Biol*. 2017;3(2). doi: [10.15436/2471-0598.17.022](https://doi.org/10.15436/2471-0598.17.022).
61. Cai WY, Luo X, Wu W, Song J, Xie NN, Duan C, et al. Metabolic differences in women with premature ovarian insufficiency: a systematic review and meta-analysis. *J Ovarian Res*. 2022;15(1):109. doi: [10.1186/s13048-022-01041-w](https://doi.org/10.1186/s13048-022-01041-w).
62. Cao Y, Sun H, Zhu H, Zhu X, Tang X, Yan G, et al. Allogeneic cell therapy using umbilical cord MSCs on collagen scaffolds for patients with recurrent uterine adhesion: a phase I clinical trial. *Stem Cell Res Ther*. 2018;9(1):192. doi: [10.1186/s13287-018-0904-3](https://doi.org/10.1186/s13287-018-0904-3).
63. Carsote M, Valea A. Premature ovarian failure of autoimmune causes. *J Gynecol Neonatal Biol*. 2015;1(1):14-5.
64. Cervelló I, Gil-Sanchis C, Santamaría X, Cabanillas S, Díaz A, Faus A, et al. Human CD133(+) bone marrow-derived stem cells promote endometrial proliferation in a murine model of Asherman syndrome. *Fertil Steril*. 2015;104(6):1552-60.e1-3. doi: [10.1016/j.fertnstert.2015.08.032](https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.08.032).
65. Chand AL, Harrison CA, Shelling AN. Inhibin and premature ovarian failure. *Hum Reprod Update*. 2010;16(1):39-50. doi: [10.1093/humupd/dmp031](https://doi.org/10.1093/humupd/dmp031).

66. Chang Z, Zhu H, Zhou X, Zhang Y, Jiang B, Li S, et al. Mesenchymal Stem Cells in Preclinical Infertility Cytotherapy: A Retrospective Review. *Stem Cells Int.* 2021;2021:8882368. doi: [10.1155/2021/8882368](https://doi.org/10.1155/2021/8882368).
67. Chen L, Guo L, Chen F, Xie Y, Zhang H, Quan P, et al. Transplantation of menstrual blood-derived mesenchymal stem cells (MbMSCs) promotes the regeneration of mechanical injured endometrium. *Am J Transl Res.* 2020;12(9):4941-54.
68. Cheng HY, Ghetu N, Wallace CG, Wei FC, Liao SK. The Impact Of Mesenchymal Stem Cell Source On Proliferation, Differentiation, Immunomodulation And Therapeutic Efficacy. *J Stem Cell Res Ther.* 2014;4:10. doi: [10.4172/2157-7633.1000237](https://doi.org/10.4172/2157-7633.1000237).
69. Choudhery MS, Badowski M, Muise A, Pierce J, Harris DT. Donor age negatively impacts adipose tissue-derived mesenchymal stem cell expansion and differentiation. *J Transl Med.* 2014;12:8. doi: [10.1186/1479-5876-12-8](https://doi.org/10.1186/1479-5876-12-8).
70. Committee Opinion No. 605. American College of Obstetricians and Gynecologists. *Obstet Gynecol* 2014;123:193-7. doi: [10.1097/01.AOG.0000451757.51964.98](https://doi.org/10.1097/01.AOG.0000451757.51964.98).
71. Cordts EB, Christofolini DM, Dos Santos AA, Bianco B, Barbosa CP. Genetic aspects of premature ovarian failure: a literature review. *Arch Gynecol Obstet.* 2011;283(3):635-43. doi: [10.1007/s00404-010-1815-4](https://doi.org/10.1007/s00404-010-1815-4).
72. Court AC, Le-Gatt A, Luz-Crawford P, Parra E, Aliaga-Tobar V, Bátiz LF, et al. Mitochondrial transfer from MSCs to T cells induces Treg differentiation and restricts inflammatory response. *EMBO Rep.* 2020;21(2):e48052. doi: [10.15252/embr.201948052](https://doi.org/10.15252/embr.201948052).
73. Curinha A, Oliveira Braz S, Pereira-Castro I, Cruz A, Moreira A. Implications of polyadenylation in health and disease. *Nucleus.* 2014;5(6):508-19. doi: [10.4161/nucl.36360](https://doi.org/10.4161/nucl.36360).
74. Haibo L, Hong L. Pathogenesis and stem cell therapy for premature ovarian failure. *OA Stem Cells.* 2014;2:4.

75. De Bruyn T, Chatterjee S, Fattah S, Keemink J, Nicolai J, Augustijns P, et al. Sandwich-cultured hepatocytes: utility for in vitro exploration of hepatobiliary drug disposition and drug-induced hepatotoxicity. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2013;9(5):589-616. doi: [10.1517/17425255.2013.773973](https://doi.org/10.1517/17425255.2013.773973).
76. Ramalho de Carvalho B, Gomes Sobrinho DB, Vieira AD, Resende MP, Barbosa AC, Silva AA, et al. Ovarian reserve assessment for infertility investigation. *ISRN Obstet Gynecol.* 2012;2012:576385. doi: [10.5402/2012/576385](https://doi.org/10.5402/2012/576385).
77. Deroux A, Dumestre-Perard C, Dunand-Faure C, Bouillet L, Hoffmann P. Female Infertility and Serum Auto-antibodies: a Systematic Review. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2017;53(1):78-86. doi: [10.1007/s12016-016-8586-z](https://doi.org/10.1007/s12016-016-8586-z).
78. Ding C, Li H, Wang Y, Wang F, Wu H, Chen R, et al. Different therapeutic effects of cells derived from human amniotic membrane on premature ovarian aging depend on distinct cellular biological characteristics. *Stem Cell Res Ther.* 2017;8(1):173. doi: [10.1186/s13287-017-0613-3](https://doi.org/10.1186/s13287-017-0613-3).
79. Ding C, Zou Q, Wang F, Wu H, Chen R, Lv J, et al. Human amniotic mesenchymal stem cells improve ovarian function in natural aging through secreting hepatocyte growth factor and epidermal growth factor. *Stem Cell Res Ther.* 2018;9(1):55. doi: [10.1186/s13287-018-0781-9](https://doi.org/10.1186/s13287-018-0781-9).
80. Ding L, Yan G, Wang B, Xu L, Gu Y, Ru T, et al. Transplantation of UC-MSCs on collagen scaffold activates follicles in dormant ovaries of POF patients with long history of infertility. *Sci China Life Sci.* 2018;61(12):1554-65. doi: [10.1007/s11427-017-9272-2](https://doi.org/10.1007/s11427-017-9272-2).
81. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006;8(4):315-7. doi: [10.1080/14653240600855905](https://doi.org/10.1080/14653240600855905).
82. Domnina A, Novikova P, Obidina J, Fridlyanskaya I, Alekseenko L, Kozhukharova I, et al. Human mesenchymal stem cells in spheroids improve

- fertility in model animals with damaged endometrium. *Stem Cell Res Ther.* 2018;9(1):50. doi: [10.1186/s13287-018-0801-9](https://doi.org/10.1186/s13287-018-0801-9).
83. Dragojević-Dikić S, Vasiljević M, Nikolić B, Pazin V, Tasić L, Jurisić A, et al. Premature ovarian failure: immunological aspects and therapeutic strategies. *Vojnosanit Pregl.* 2013;70(11):1051-5. doi: [10.2298/vsp1311051d](https://doi.org/10.2298/vsp1311051d).
 84. Ebrahimi M, Akbari Asbagh F. Pathogenesis and causes of premature ovarian failure: an update. *Int J Fertil Steril.* 2011;5(2):54-65.
 85. Edessy M, Hosni HN, Shady Y, Waf Y, Bakr S, Kamel M. Autologous stem cells therapy, the first baby of idiopathic premature ovarian failure. *Acta Medica International.* 2016;3(1):19-23.
 86. Elfayomy AK, Almasry SM, El-Tarhouny SA, Eldomiaty MA. Human umbilical cord blood-mesenchymal stem cells transplantation renovates the ovarian surface epithelium in a rat model of premature ovarian failure: Possible direct and indirect effects. *Tissue Cell.* 2016;48(4):370-82. doi: [10.1016/j.tice.2016.05.001](https://doi.org/10.1016/j.tice.2016.05.001).
 87. Eremina V, Jefferson JA, Kowalewska J, Hochster H, Haas M, Weisstuch J, et al. VEGF inhibition and renal thrombotic microangiopathy. *N Engl J Med.* 2008;358(11):1129-36. doi: [10.1056/NEJMoa0707330](https://doi.org/10.1056/NEJMoa0707330).
 88. Esfandyari S, Chugh RM, Park HS, Hobeika E, Ulin M, Al-Hendy A. Mesenchymal Stem Cells as a Bio Organ for Treatment of Female Infertility. *Cells.* 2020;9(10):2253. doi: [10.3390/cells9102253](https://doi.org/10.3390/cells9102253).
 89. European Association for the Study of the Liver; Clinical Practice Guideline Panel: Chair; Panel members; EASL Governing Board representative: EASL Clinical Practice Guidelines: Drug-induced liver injury. *J Hepatol.* 2019;70(6):1222-61. doi: [10.1016/j.jhep.2019.02.014](https://doi.org/10.1016/j.jhep.2019.02.014).
 90. Fan D, Wu S, Ye S, Wang W, Guo X, Liu Z. Umbilical cord mesenchyme stem cell local intramuscular injection for treatment of uterine niche: Protocol for a prospective, randomized, double-blinded, placebo-controlled

- clinical trial. *Medicine (Baltimore)*. 2017;96(44):e8480. doi: [10.1097/MD.00000000000008480](https://doi.org/10.1097/MD.00000000000008480).
91. Fenton AJ. Premature ovarian insufficiency: Pathogenesis and management. *J Midlife Health*. 2015;6(4):147-53. doi: [10.4103/0976-7800.172292](https://doi.org/10.4103/0976-7800.172292).
 92. Fouad AA, Jresat I. Hepatoprotective effect of coenzyme Q10 in rats with acetaminophen toxicity. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2012;33(2):158-67. doi: [10.1016/j.etap.2011.12.011](https://doi.org/10.1016/j.etap.2011.12.011).
 93. Fu YX, Ji J, Shan F, Li J, Hu R. Human mesenchymal stem cell treatment of premature ovarian failure: new challenges and opportunities. *Stem Cell Res Ther*. 2021;12(1):161. doi: [10.1186/s13287-021-02212-0](https://doi.org/10.1186/s13287-021-02212-0).
 94. Gao L, Huang Z, Lin H, Tian Y, Li P, Lin S. Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells (BMSCs) Restore Functional Endometrium in the Rat Model for Severe Asherman Syndrome. *Reprod Sci*. 2019;26(3):436-44. doi: [10.1177/1933719118799201](https://doi.org/10.1177/1933719118799201).
 95. Ramadori G, Cameron S. Effects of systemic chemotherapy on the liver. *Ann Hepatol*. 2010;9(2):133-43.
 96. Gleicher N, Kim A, Weghofer A, Barad DH. Toward a better understanding of functional ovarian reserve: AMH (AMHo) and FSH (FSHo) hormone ratios per retrieved oocyte. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97(3):995-1004. doi: [10.1210/jc.2011-2403](https://doi.org/10.1210/jc.2011-2403).
 97. Gobbi A, Fishman M. Platelet-rich Plasma and Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells in Sports Medicine. *Sports Med Arthrosc Rev*. 2016;24(2):69-73. doi: [10.1097/JSA.0000000000000105](https://doi.org/10.1097/JSA.0000000000000105).
 98. Guo T, Zhao S, Zhao S, Chen M, Li G, Jiao X, et al. Mutations in MSH5 in primary ovarian insufficiency. *Hum Mol Genet*. 2017;26(8):1452-7. doi: [10.1093/hmg/ddx044](https://doi.org/10.1093/hmg/ddx044).
 99. Gupta S, Lodha P, Karthick MS, Tandulwadkar SR. Role of Autologous Bone Marrow-Derived Stem Cell Therapy for Follicular Recruitment in Premature Ovarian Insufficiency: Review of Literature and a Case Report of World's First Baby with Ovarian Autologous Stem Cell Therapy in a

- Perimenopausal Woman of Age 45 Year. *J Hum Reprod Sci.* 2018;11(2):125-30. doi: [10.4103/jhrs.JHRS_57_18](https://doi.org/10.4103/jhrs.JHRS_57_18).
100. Gustin SLF, Wang G, Baker VM, Latham G, Sebastiano V. Use of human-derived stem cells to create a novel, in vitro model designed to explore FMR1 CGG repeat instability amongst female premutation carriers. *J Assist Reprod Genet.* 2018;35(8):1443-55. doi: [10.1007/s10815-018-1237-y](https://doi.org/10.1007/s10815-018-1237-y).
101. Häfner SJ. Bargain with the tooth fairy - The savings accounts for dental stem cells. *Biomed J.* 2020;43(2):99-106. doi: [10.1016/j.bj.2020.04.001](https://doi.org/10.1016/j.bj.2020.04.001).
102. Han F, Wang J, Ding L, Hu Y, Li W, Yuan Z, et al. Tissue Engineering and Regenerative Medicine: Achievements, Future, and Sustainability in Asia. *Front Bioeng Biotechnol.* 2020;8:83. doi: [10.3389/fbioe.2020.00083](https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00083).
103. He WB, Du J, Yang XW, Li W, Tang WL, Dai C, et al. Novel inactivating mutations in the FSH receptor cause premature ovarian insufficiency with resistant ovary syndrome. *Reprod Biomed Online.* 2019;38(3):397-406. doi: [10.1016/j.rbmo.2018.11.011](https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2018.11.011).
104. Himanshu; Dharmila, Sarkar D; Nutan. A Review of Behavioral Tests to Evaluate Different Types of Anxiety and Anti-anxiety Effects. *Clin Psychopharmacol Neurosci.* 2020;18(3):341-51. doi: [10.9758/cpn.2020.18.3.341](https://doi.org/10.9758/cpn.2020.18.3.341).
105. Holmberg L, Iversen OE, Rudenstam CM, Hammar M, Kumpulainen E, Jaskiewicz J, et al. Increased risk of recurrence after hormone replacement therapy in breast cancer survivors. *J Natl Cancer Inst.* 2008;100(7):475-82. doi: [10.1093/jnci/djn058](https://doi.org/10.1093/jnci/djn058).
106. Hsueh AJ, He J. Gonadotropins and their receptors: coevolution, genetic variants, receptor imaging, and functional antagonists. *Biol Reprod.* 2018;99(1):3-12. doi: [10.1093/biolre/i0y012](https://doi.org/10.1093/biolre/i0y012).
107. Hsueh AJ, Kawamura K, Cheng Y, Fauser BC. Intraovarian control of early folliculogenesis. *Endocr Rev.* 2015;36(1):1-24. doi: [10.1210/er.2014-1020](https://doi.org/10.1210/er.2014-1020).
108. Huang B, Lu J, Ding C, Zou Q, Wang W, Li H. Exosomes derived from human adipose mesenchymal stem cells improve ovary function of

- premature ovarian insufficiency by targeting SMAD. *Stem Cell Res Ther.* 2018;9(1):216. doi: [10.1186/s13287-018-0953-7](https://doi.org/10.1186/s13287-018-0953-7).
109. Huang Q, Liu B, Jiang R, Liao S, Wei Z, Bi Y, Liu X, Deng R, Jin Y, Tan Y, Yang Y, Qin A. G-CSF-mobilized peripheral blood mononuclear cells combined with platelet-rich plasma accelerate restoration of ovarian function in cyclophosphamide-induced POI rats. *Biol Reprod.* 2019;101(1):91-101. doi: [10.1093/biolre/ioz077](https://doi.org/10.1093/biolre/ioz077).
110. Huang Y, Lv Y, Qi T, et al. Metabolic profile of women with premature ovarian insufficiency compared with that of age-matched healthy controls. *Maturitas.* 2021;148:33-39. doi: [10.1016/j.maturitas.2021.04.003](https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2021.04.003).
111. Iorga A, Dara L, Kaplowitz N. Drug-induced liver injury: cascade of events leading to cell death, apoptosis or necrosis. *Int J Mol Sci.* 2017;18(5):1018. doi: [10.3390/ijms18051018](https://doi.org/10.3390/ijms18051018).
112. Jalalie L, Rezaie MJ, Jalili A, Rezaee MA, Vahabzadeh Z, Rahmani MR, et al. Distribution of the CM-Dil-Labeled Human Umbilical Cord Vein Mesenchymal Stem Cells Migrated to the Cyclophosphamide-Injured Ovaries in C57BL/6 Mice. *Iran Biomed J.* 2019;23(3):200-8. doi: [10.29252/23.3.200](https://doi.org/10.29252/23.3.200).
113. Jankowska K. Premature ovarian failure. *Prz Menopauzalny.* 2017;16(2):51-6. doi: [10.5114/pm.2017.68592](https://doi.org/10.5114/pm.2017.68592).
114. Jensen AK, Rechnitzer C, Macklon KT, Ifversen MR, Birkebæk N, Clausen N, et al. Cryopreservation of ovarian tissue for fertility preservation in a large cohort of young girls: focus on pubertal development. *Hum Reprod.* 2017;32(1):154-64. doi: [10.1093/humrep/dew273](https://doi.org/10.1093/humrep/dew273).
115. Joyce E, Glasner P, Ranganathan S, Swiatecka-Urban A. Tubulointerstitial nephritis: diagnosis, treatment, and monitoring. *Pediatr Nephrol.* 2017;32(4):577-87. doi: [10.1007/s00467-016-3394-5](https://doi.org/10.1007/s00467-016-3394-5).
116. Jungari SB, Chauhan BG. Prevalence and Determinants of Premature Menopause among Indian Women: Issues and Challenges Ahead. *Health Soc Work.* 2017;42(2):79-86. doi: [10.1093/hsw/hlx010](https://doi.org/10.1093/hsw/hlx010).

117. Kaidanovich-Beilin O, Lipina T, Vukobradovic I, Roder J, Woodgett JR. Assessment of social interaction behaviors. *J Vis Exp.* 2011;(48):2473. doi: [10.3791/2473](https://doi.org/10.3791/2473).
118. Kakinuma K, Kakinuma T. Analysis of oxidative stress and antioxidative potential in premature ovarian insufficiency. *World J Clin Cases.* 2023;11(12):2684-93. doi: [10.12998/wjcc.v11.i12.2684](https://doi.org/10.12998/wjcc.v11.i12.2684).
119. Kalantaridou SN, Naka KK, Papanikolaou E, Kazakos N, Kravariti M, Calis KA, et al. Impaired endothelial function in young women with premature ovarian failure: normalization with hormone therapy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(8):3907-13. doi: [10.1210/jc.2004-0015](https://doi.org/10.1210/jc.2004-0015).
120. Karahuseyinoglu S, Cinar O, Kilic E, Kara F, Akay GG, Demiralp DO, et al. Biology of stem cells in human umbilical cord stroma: in situ and in vitro surveys. *Stem Cells.* 2007;25(2):319-31. doi: [10.1634/stemcells.2006-0286](https://doi.org/10.1634/stemcells.2006-0286).
121. Karska P, Matonog A, Sieradzka P, Kowalczyk K, Madej P. Fresh insight into premature ovarian insufficiency. *Ginekol Pol.* 2021;92(7):518-24. doi: [10.5603/GP.a2021.0111](https://doi.org/10.5603/GP.a2021.0111).
122. Kawamura K, Kawamura N, Hsueh AJ. Activation of dormant follicles: a new treatment for premature ovarian failure? *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2016;28(3):217-22. doi: [10.1097/GCO.0000000000000268](https://doi.org/10.1097/GCO.0000000000000268).
123. Kawamura K, Cheng Y, Suzuki N, Deguchi M, Sato Y, Takae S, et al. Hippo signaling disruption and Akt stimulation of ovarian follicles for infertility treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(43):17474-9. doi: [10.1073/pnas.1312830110](https://doi.org/10.1073/pnas.1312830110).
124. Kenney LB, Laufer MR, Grant FD, Grier H, Diller L. High risk of infertility and long term gonadal damage in males treated with high dose cyclophosphamide for sarcoma during childhood. *Cancer.* 2001;91(3):613-21. doi: [10.1002/1097-0142\(20010201\)91:3<613::aid-cncr1042>3.0.co;2-r](https://doi.org/10.1002/1097-0142(20010201)91:3<613::aid-cncr1042>3.0.co;2-r).
125. Kozub MI, Skybina KP, Musatova IB, Prokopiuk OV, Gramatiuk SM, Tynnyka LM, et al. Comparison of therapeutic effects of different methods of administration of mezenchimal stem cells to mice with premature ovarian

- insufficiency. *Problems of Endocrine Pathology*. 2021;76(2):35-40. doi: [10.21856/j-PEP.2021.2.05](https://doi.org/10.21856/j-PEP.2021.2.05).
126. Kozub MM, Prokopiuk VY, Skibina KP, Prokopiuk OV, Kozub NI. Comparison of various tissue and cell therapy approaches when restoring ovarian, hepatic and kidney's function after chemotherapy-induced ovarian failure. *Exp Oncol*. 2017;39(3):181-5.
127. Kumar N, Manesh I. Premature ovarian insufficiency: Aetiology and long-term consequences. *Women's Health Open J*. 2017;3(2):45-58. doi: [10.17140/WHOJ-3-121](https://doi.org/10.17140/WHOJ-3-121).
128. Lai D, Wang F, Yao X, Zhang Q, Wu X, Xiang C. Human endometrial mesenchymal stem cells restore ovarian function through improving the renewal of germline stem cells in a mouse model of premature ovarian failure. *J Transl Med*. 2015;13:155. doi: [10.1186/s12967-015-0516-y](https://doi.org/10.1186/s12967-015-0516-y).
129. Lee WS, Lee JJ, Liao AT, Kao CL, Wang SL. Association between weight change during initial chemotherapy and clinical outcome in dogs with multicentric lymphoma. *Vet Comp Oncol*. 2021;19(1):53-60. doi: [10.1111/vco.12637](https://doi.org/10.1111/vco.12637).
130. Li J, Mao Q, He J, She H, Zhang Z, Yin C. Human umbilical cord mesenchymal stem cells improve the reserve function of perimenopausal ovary via a paracrine mechanism. *Stem Cell Res Ther*. 2017;8(1):55. doi: [10.1186/s13287-017-0514-5](https://doi.org/10.1186/s13287-017-0514-5).
131. Li M, Xie L, Li Y, Liu J, Nie G, Yang H. Synergistic effect of Huyang Yangkun Formula and embryonic stem cells on 4-vinylcyclohexene diepoxide induced premature ovarian insufficiency in mice. *Chin Med*. 2020;15:83. doi: [10.1186/s13020-020-00362-6](https://doi.org/10.1186/s13020-020-00362-6).
132. Ling L, Feng X, Wei T, Wang Y, Wang Y, Zhang W, et al. Effects of low-intensity pulsed ultrasound (LIPUS)-pretreated human amnion-derived mesenchymal stem cell (hAD-MSC) transplantation on primary ovarian insufficiency in rats. *Stem Cell Res Ther*. 2017;8(1):283. doi: [10.1186/s13287-017-0739-3](https://doi.org/10.1186/s13287-017-0739-3).

133. Liu Y, Tal R, Pluchino N, Mamillapalli R, Taylor HS. Systemic administration of bone marrow-derived cells leads to better uterine engraftment than use of uterine-derived cells or local injection. *J Cell Mol Med.* 2018;22(1):67-76. doi: [10.1111/jcmm.13294](https://doi.org/10.1111/jcmm.13294).
134. Lu CY, Chen YA, Syu SH, Lu HE, Ho HN, Chen HF. Generation of induced pluripotent stem cell line-NTUHi001-A from a premature ovarian failure patient with Turner's syndrome mosaicism. *Stem Cell Res.* 2019;37:101422. doi: [10.1016/j.scr.2019.101422](https://doi.org/10.1016/j.scr.2019.101422).
135. Manshadi MD, Navid S, Hoshino Y, Daneshi E, Noory P, Abbasi M. The effects of human menstrual blood stem cells-derived granulosa cells on ovarian follicle formation in a rat model of premature ovarian failure. *Microsc Res Tech.* 2019;82(6):635-42. doi: [10.1002/jemt.23120](https://doi.org/10.1002/jemt.23120).
136. Meng X, Ichim TE, Zhong J, Rogers A, Yin Z, Jackson J, et al. Endometrial regenerative cells: a novel stem cell population. *J Transl Med.* 2007;5:57. doi: [10.1186/1479-5876-5-57](https://doi.org/10.1186/1479-5876-5-57).
137. Mohamed SA, Shalaby S, Brakta S, Elam L, Elsharoud A, Al-Hendy A. Umbilical Cord Blood Mesenchymal Stem Cells as an Infertility Treatment for Chemotherapy Induced Premature Ovarian Insufficiency. *Biomedicines.* 2019;7(1):7. doi: [10.3390/biomedicines7010007](https://doi.org/10.3390/biomedicines7010007).
138. Mohamed SA, Shalaby SM, Abdelaziz M, Brakta S, Hill WD, Ismail N, et al. Human Mesenchymal Stem Cells Partially Reverse Infertility in Chemotherapy-Induced Ovarian Failure. *Reprod Sci.* 2018;25(1):51-63. doi: [10.1177/1933719117699705](https://doi.org/10.1177/1933719117699705).
139. Moledina DG, Perazella MA. Treatment of Drug-Induced Acute Tubulointerstitial Nephritis: The Search for Better Evidence. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2018;13(12):1785-7. doi: [10.2215/CJN.12001018](https://doi.org/10.2215/CJN.12001018).
140. Monsef F, Artimani T, Alizadeh Z, Ramazani M, Solgi G, Yavangi M, et al. Comparison of the regenerative effects of bone marrow/adipose-derived stem cells in the Asherman model following local or systemic

- administration.. *J Assist Reprod Genet.* 2020;37(8):1861-8. doi: [10.1007/s10815-020-01856-w](https://doi.org/10.1007/s10815-020-01856-w).
141. Na J, Kim GJ. Recent trends in stem cell therapy for premature ovarian insufficiency and its therapeutic potential: a review. *J Ovarian Res.* 2020;13(1):74. doi: [10.1186/s13048-020-00671-2](https://doi.org/10.1186/s13048-020-00671-2).
142. Ulug P, Oner G. Evaluation of the effects of single or multiple dose methotrexate administration, salpingectomy on ovarian reserve of rat with the measurement of anti-Müllerian hormone (AMH) levels and histological analysis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2014;181:205-9. doi: [10.1016/j.ejogrb.2014.07.011](https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2014.07.011).
143. Palmisano BT, Zhu L, Stafford JM. Role of Estrogens in the Regulation of Liver Lipid Metabolism. *Adv Exp Med Biol.* 2017;1043:227-56. doi: [10.1007/978-3-319-70178-3_12](https://doi.org/10.1007/978-3-319-70178-3_12).
144. Nagori CB, Panchal SY, Patel H. Endometrial regeneration using autologous adult stem cells followed by conception by in vitro fertilization in a patient of severe Asherman's syndrome. *J Hum Reprod Sci.* 2011;4(1):43-8. doi: [10.4103/0974-1208.82360](https://doi.org/10.4103/0974-1208.82360).
145. Peng T, Lv C, Tan H, Huang J, He H, Wang Y, et al. Novel PMM2 missense mutation in a Chinese family with non-syndromic premature ovarian insufficiency. *J Assist Reprod Genet.* 2020;37(2):443-50. doi: [10.1007/s10815-019-01675-8](https://doi.org/10.1007/s10815-019-01675-8).
146. Perazella MA. Renal vulnerability to drug toxicity. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2009;4(7):1275-83. doi: [10.2215/CJN.02050309](https://doi.org/10.2215/CJN.02050309).
147. Pouresmaeili F, Fazeli Z. Premature ovarian failure: a critical condition in the reproductive potential with various genetic causes. *Int J Fertil Steril.* 2014;8(1):1-12.
148. Qin Y, Jiao X, Simpson JL, Chen ZJ. Genetics of primary ovarian insufficiency: new developments and opportunities. *Hum Reprod Update.* 2015;21(6):787-808. doi: [10.1093/humupd/dmv036](https://doi.org/10.1093/humupd/dmv036).

149. Qin Y, Jiao X, Simpson JL, Chen ZJ. Genetics of primary ovarian insufficiency: new developments and opportunities. *Hum Reprod Update*. 2015;21(6):787-808. doi: [10.1093/humupd/dmv036](https://doi.org/10.1093/humupd/dmv036).
150. Raciborska A, Bilaska K, Filipp E, Drabko K, Rogowska E, Chaber R, et al. Ovarian function in female survivors after multimodal Ewing sarcoma therapy. *Pediatr Blood Cancer*. 2015;62(2):341-5. doi: [10.1002/pbc.25304](https://doi.org/10.1002/pbc.25304).
151. Ramachandran A, Jaeschke H. Oxidative stress and acute hepatic injury. *Curr Opin Toxicol*. 2018;7:17-21. doi: [10.1016/j.cotox.2017.10.011](https://doi.org/10.1016/j.cotox.2017.10.011).
152. Clark RA, Mostoufi-Moab S, Yasui Y, Vu NK, Sklar CA, Motan T, et al. Predicting acute ovarian failure in female survivors of childhood cancer: a cohort study in the Childhood Cancer Survivor Study (CCSS) and the St Jude Lifetime Cohort (SJLIFE). *Lancet Oncol*. 2020;21(3):436-45. doi: [10.1016/S1470-2045\(19\)30818-6](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(19)30818-6).
153. Rhyu J, Yu R. Newly discovered endocrine functions of the liver. *World J Hepatol*. 2021;13(11):1611-1628. doi: [10.4254/wjh.v13.i11.1611](https://doi.org/10.4254/wjh.v13.i11.1611).
154. Ross R. Atherosclerosis - an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999;340(2):115-26. doi: [10.1056/NEJM199901143400207](https://doi.org/10.1056/NEJM199901143400207).
155. Ross PJ, Ashley S, Norton A, Priest K, Waters JS, Eisen T, et al. Do patients with weight loss have a worse outcome when undergoing chemotherapy for lung cancers? *Br J Cancer*. 2004;90(10):1905-11. doi: [10.1038/sj.bjc.6601781](https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6601781).
156. Rudnicka E, Kruszewska J, Klicka K, Kowalczyk J, Grymowicz M, Skórska J, et al. Premature ovarian insufficiency - aetiopathology, epidemiology, and diagnostic evaluation. *Prz Menopauzalny*. 2018;17(3):105-8. doi: [10.5114/pm.2018.78550](https://doi.org/10.5114/pm.2018.78550).
157. Rungsiwiwut R, Virutamasen P, Pruksananonda K. Mesenchymal stem cells for restoring endometrial function: An infertility perspective. *Reprod Med Biol*. 2020;20(1):13-19. doi: [10.1002/rmb2.12339](https://doi.org/10.1002/rmb2.12339).
158. Santamaria X, Cabanillas S, Cervelló I, Arbona C, Raga F, Ferro J, et al. Autologous cell therapy with CD133+ bone marrow-derived stem cells for

- refractory Asherman's syndrome and endometrial atrophy: a pilot cohort study. *Hum Reprod.* 2016;31(5):1087-96. doi: [10.1093/humrep/dew042](https://doi.org/10.1093/humrep/dew042).
159. Sassarini J, Lumsden MA, Critchley HO. Sex hormone replacement in ovarian failure - new treatment concepts. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2015;29(1):105-14. doi: [10.1016/j.beem.2014.09.010](https://doi.org/10.1016/j.beem.2014.09.010).
160. Seibenhener ML, Wooten MC. Use of the Open Field Maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice. *J Vis Exp.* 2015;96:e52434. doi: [10.3791/52434](https://doi.org/10.3791/52434).
161. Shelling AN. Premature ovarian failure. *Reproduction.* 2010;140(5):633-41. doi: [10.1530/REP-09-0567](https://doi.org/10.1530/REP-09-0567).
162. Sherman SL, Curnow EC, Easley CA, Jin P, Hukema RK, Tejada MI, et al. Use of model systems to understand the etiology of fragile X-associated primary ovarian insufficiency (FXPOI). *J Neurodev Disord.* 2014;6(1):26. doi: [10.1186/1866-1955-6-26](https://doi.org/10.1186/1866-1955-6-26).
163. Shi Q, Gao J, Jiang Y, Sun B, Lu W, Su M, et al. Differentiation of human umbilical cord Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells into endometrial cells. *Stem Cell Res Ther.* 2017 Nov;8(1):246. doi: [10.1186/s13287-017-0700-5](https://doi.org/10.1186/s13287-017-0700-5).
164. Shi Y, Wang Y, Li Q, Liu K, Hou J, Shao C, et al. Immunoregulatory mechanisms of mesenchymal stem and stromal cells in inflammatory diseases. *Nat Rev Nephrol.* 2018;14(8):493-507. doi: [10.1038/s41581-018-0023-5](https://doi.org/10.1038/s41581-018-0023-5).
165. Singh N, Mohanty S, Seth T, Shankar M, Bhaskaran S, Dharmendra S. Autologous stem cell transplantation in refractory Asherman's syndrome: A novel cell based therapy. *J Hum Reprod Sci.* 2014;7(2):93-8. doi: [10.4103/0974-1208.138864](https://doi.org/10.4103/0974-1208.138864).
166. Skybina KP, Musatova IB, Kozub MI. Application of mesenchymal stem cells of adipose tissue for restoration of sexual function and behavior in the ovarian failure model. In: I conf. scien. et pratiq. intern. «Debats scientifiques et orientations prospectives du developpement scientifique»;

- 2021 Feb 5; Vinnytsia-Paris: Plateforme scientifique européenne & La Fedeltà; 2021, p. 47-48. doi: [10.36074/logos-05.02.2021.v6.14](https://doi.org/10.36074/logos-05.02.2021.v6.14).
167. Skybina KP, Prokopyuk VY, Kozub NI, Kozub MN. Placental cryoextract rescue ovarian function of mice with premature ovarian failure induced by chemotherapy. In: 24th Intern. med. stud. conf. (IMSC)»; 2016 Apr 14-16; Cracow, Poland; 2016, p. 5.
168. Song D, Zhong Y, Qian C, Zou Q, Ou J, Shi Y, et al. Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Therapy in Cyclophosphamide-Induced Premature Ovarian Failure Rat Model. *Biomed Res Int.* 2016;2016:2517514. doi: [10.1155/2016/2517514](https://doi.org/10.1155/2016/2517514).
169. Squillaro T, Peluso G, Galderisi U. Clinical Trials With Mesenchymal Stem Cells: An Update. *Cell Transplant.* 2016;25(5):829-48. doi: [10.3727/096368915X689622](https://doi.org/10.3727/096368915X689622).
170. Streuli I, Fraisse T, Ibecheole V, Moix I, Morris MA, de Ziegler D. Intermediate and premutation FMR1 alleles in women with occult primary ovarian insufficiency. *Fertil Steril.* 2009;92(2):464-70. doi: [10.1016/j.fertnstert.2008.07.007](https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.07.007).
171. Su J, Ding L, Cheng J, Yang J, Li X, Yan G, et al. Transplantation of adipose-derived stem cells combined with collagen scaffolds restores ovarian function in a rat model of premature ovarian insufficiency. *Hum Reprod.* 2016;31(5):1075-86. doi: [10.1093/humrep/dew041](https://doi.org/10.1093/humrep/dew041).
172. Suardi GAM, Haddad LA. FMRP ribonucleoprotein complexes and RNA homeostasis. *Adv Genet.* 2020;105:95-136. doi: [10.1016/bs.adgen.2020.01.001](https://doi.org/10.1016/bs.adgen.2020.01.001).
173. Sun M, Wang S, Li Y, Yu L, Gu F, Wang C, Yao Y. Adipose-derived stem cells improved mouse ovary function after chemotherapy-induced ovary failure. *Stem Cell Res Ther.* 2013;4(4):80. doi: [10.1186/scrt231](https://doi.org/10.1186/scrt231).
174. Takehara Y, Yabuuchi A, Ezoe K, Kuroda T, Yamadera R, Sano C, et al. The restorative effects of adipose-derived mesenchymal stem cells on damaged ovarian function. *Lab Invest.* 2013;93(2):181-93. doi: [10.1038/labinvest.2012.167](https://doi.org/10.1038/labinvest.2012.167).

175. Tan J, Li P, Wang Q, Li Y, Li X, Zhao D, et al. Autologous menstrual blood-derived stromal cells transplantation for severe Asherman's syndrome. *Hum Reprod.* 2016 Dec;31(12):2723-2729. doi: [10.1093/humrep/dew235](https://doi.org/10.1093/humrep/dew235).
176. Taylor HS. Endometrial cells derived from donor stem cells in bone marrow transplant recipients. *JAMA.* 2004;292(1):81-5. doi: [10.1001/jama.292.1.81](https://doi.org/10.1001/jama.292.1.81).
177. Terraciano P, Garcez T, Ayres L, Durlì I, Baggio M, Kuhl CP, et al. Cell therapy for chemically induced ovarian failure in mice. *Stem Cells Int.* 2014;2014:720753. doi: [10.1155/2014/720753](https://doi.org/10.1155/2014/720753).
178. Tong Y, Cheng N, Jiang X, Wang K, Wang F, Lin X, et al. The trends and hotspots in premature ovarian insufficiency therapy from 2000 to 2022. *Int J Environ Res Public Health.* 2022;19(18):11728. doi: [10.3390/ijerph191811728](https://doi.org/10.3390/ijerph191811728).
179. Torrealday S, Pal L. Premature Menopause. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2015;44(3):543-57. doi: [10.1016/j.ecl.2015.05.004](https://doi.org/10.1016/j.ecl.2015.05.004).
180. Trounson A, McDonald C. Stem Cell Therapies in Clinical Trials: Progress and Challenges. *Cell Stem Cell.* 2015;17(1):11-22. doi: [10.1016/j.stem.2015.06.007](https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.06.007).
181. Ulin M, Cetin E, Hobeika E, Chugh RM, Park HS, Esfandyari S, et al. Human Mesenchymal Stem Cell Therapy and Other Novel Treatment Approaches for Premature Ovarian Insufficiency. *Reprod Sci.* 2021;28(6):1688-96. doi: [10.1007/s43032-021-00528-z](https://doi.org/10.1007/s43032-021-00528-z).
182. Ullah I, Subbarao RB, Rho GJ. Human mesenchymal stem cells - current trends and future prospective. *Biosci Rep.* 2015;35(2):e00191. doi: [10.1042/BSR20150025](https://doi.org/10.1042/BSR20150025).
183. Ulmann G, Jouinot A, Tlemsani C, Curis E, Kousignian I, Neveux N, et al. Lean Body Mass and Endocrine Status But Not Age Are Determinants of Resting Energy Expenditure in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer. *Ann Nutr Metab.* 2019;75(4):223-30. doi: [10.1159/000504874](https://doi.org/10.1159/000504874).
184. Umer A, Khan N, Greene DL, Habiba UE, Shamim S, Khayam AU. The Therapeutic Potential of Human Umbilical Cord Derived Mesenchymal

- Stem Cells for the Treatment of Premature Ovarian Failure. *Stem Cell Rev Rep.* 2023;19(3):651-66. doi: [10.1007/s12015-022-10493-y](https://doi.org/10.1007/s12015-022-10493-y).
185. Van Soom T, El Bakkali S, Gebruers N, Verbelen H, Tjalma W, van Breda E. The effects of chemotherapy on energy metabolic aspects in cancer patients: A systematic review. *Clin Nutr.* 2020;39(6):1863-77. doi: [10.1016/j.clnu.2019.07.028](https://doi.org/10.1016/j.clnu.2019.07.028).
186. Vanni VS, Viganò P, Papaleo E, Mangili G, Candiani M, Giorgione V, et al. Advances in improving fertility in women through stem cell-based clinical platforms. *Expert Opin Biol Ther.* 2017;17:585-93. doi: [10.1080/14712598.2017.1305352](https://doi.org/10.1080/14712598.2017.1305352).
187. Varon R, Demuth I, Chrzanowska KH. Nijmegen Breakage Syndrome. 1999 May 17 [updated 2022 Aug 18]. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJH, Stephens K, et al, editors. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2020.
188. Vermeulen RFM, Korse CM, Kenter GG, Brood-van Zanten MMA, Beurden MV. Safety of hormone replacement therapy following risk-reducing salpingo-oophorectomy: systematic review of literature and guidelines. *Climacteric.* 2019;22(4):352-60. doi: [10.1080/13697137.2019.1582622](https://doi.org/10.1080/13697137.2019.1582622).
189. Vichaya EG, Chiu GS, Krukowski K, Lacourt TE, Kavelaars A, Dantzer R, et al. Mechanisms of chemotherapy-induced behavioral toxicities. *Front Neurosci.* 2015;9:131. doi: [10.3389/fnins.2015.00131](https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00131).
190. Viridis A, Ghiadoni L, Pinto S, Lombardo M, Petraglia F, Gennazzani A, et al. Mechanisms responsible for endothelial dysfunction associated with acute estrogen deprivation in normotensive women. *Circulation.* 2000;101(19):2258-63. doi: [10.1161/01.cir.101.19.2258](https://doi.org/10.1161/01.cir.101.19.2258).
191. Vujović S, Ivović M, Tancić-Gajić M, Marina L, Barać M, Arizanović Z, et al. Premature ovarian failure. *Srp Arh Celok Lek.* 2012;140(11-12):806-11.
192. Vujovic S. Aetiology of premature ovarian failure. *Menopause Int.* 2009;15(2):72-5. doi: [10.1258/mi.2009.009020](https://doi.org/10.1258/mi.2009.009020).

193. Walf AA, Frye CA. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protoc.* 2007;2(2):322-8. doi: [10.1038/nprot.2007.44](https://doi.org/10.1038/nprot.2007.44).
194. Wang J, Ju B, Pan C, Gu Y, Zhang Y, Sun L, et al. Application of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells in the Treatment of Intrauterine Adhesions in Rats. *Cell Physiol Biochem.* 2016;39(4):1553-60. doi: [10.1159/000447857](https://doi.org/10.1159/000447857).
195. Sun M, Wang S, Li Y, Yu L, Gu F, Wang C, Yao Y. Adipose-derived stem cells improved mouse ovary function after chemotherapy-induced ovary failure. *Stem Cell Res Ther.* 2013;4(4):80. doi: [10.1186/scrt231](https://doi.org/10.1186/scrt231).
196. Wang Q, Barad DH, Darmon SK, Kushnir VA, Wu YG, Lazzaroni-Tealdi E, et al. Reduced RNA expression of the FMR1 gene in women with low (CGGn<26) repeats. *PLoS One.* 2018;13(12):e0209309. doi: [10.1371/journal.pone.0209309](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209309).
197. Wang S, Yu L, Sun M, Mu S, Wang C, Wang D, et al. The therapeutic potential of umbilical cord mesenchymal stem cells in mice premature ovarian failure. *Biomed Res Int.* 2013;2013:690491. doi: [10.1155/2013/690491](https://doi.org/10.1155/2013/690491).
198. Wang X, Zhang X, Dang Y, Li D, Lu G, Chan WY, et al. Long noncoding RNA HCP5 participates in premature ovarian insufficiency by transcriptionally regulating MSH5 and DNA damage repair via YB1. *Nucleic Acids Res.* 2020;48(8):4480-91. doi: [10.1093/nar/gkaa127](https://doi.org/10.1093/nar/gkaa127).
199. Wang Z, Wang Y, Yang T, Li J, Yang X. Study of the reparative effects of menstrual-derived stem cells on premature ovarian failure in mice. *Stem Cell Res Ther.* 2017;8(1):11. doi: [10.1186/s13287-016-0458-1](https://doi.org/10.1186/s13287-016-0458-1).
200. European Society for Human Reproduction and Embryology (ESHRE) Guideline Group on POI; Webber L, Davies M, Anderson R, Bartlett J, Braat D, et al. ESHRE Guideline: management of women with premature ovarian insufficiency. *Hum Reprod.* 2016;31(5):926-37. doi: [10.1093/humrep/dew027](https://doi.org/10.1093/humrep/dew027).

201. Wei B, Huang C, Zhao M, Li P, Gao X, Kong J, et al. Effect of Mesenchymal Stem Cells and Platelet-Rich Plasma on the Bone Healing of Ovariectomized Rats. *Stem Cells Int.* 2016;2016:9458396. doi: [10.1155/2016/9458396](https://doi.org/10.1155/2016/9458396).
202. Wei X, Yang X, Han ZP, Qu FF, Shao L, Shi YF. Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy. *Acta Pharmacol Sin.* 2013;34(6):747-54. doi: [10.1038/aps.2013.50](https://doi.org/10.1038/aps.2013.50).
203. Welt CK. Primary ovarian insufficiency: a more accurate term for premature ovarian failure. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2008;68(4):499-509. doi: [10.1111/j.1365-2265.2007.03073.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.2007.03073.x).
204. Wu X, Cai H, Kallianpur A, Li H, Yang G, Gao J, et al. Impact of premature ovarian failure on mortality and morbidity among Chinese women. *PLoS One.* 2014;9(3):e89597. doi: [10.1371/journal.pone.0089597](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089597).
205. Xiao GY, Cheng CC, Chiang YS, Cheng WT, Liu IH, Wu SC. Exosomal miR-10a derived from amniotic fluid stem cells preserves ovarian follicles after chemotherapy. *Sci Rep.* 2016;6:23120. doi: [10.1038/srep23120](https://doi.org/10.1038/srep23120).
206. Xiao GY, Liu IH, Cheng CC, Chang CC, Lee YH, Cheng WT, et al. Amniotic fluid stem cells prevent follicle atresia and rescue fertility of mice with premature ovarian failure induced by chemotherapy. *PLoS One.* 2014;9(9):e106538. doi: [10.1371/journal.pone.0106538](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106538).
207. Xiao WJ, He WB, Zhang YX, Meng LL, Lu GX, Lin G, et al. In-Frame Variants in STAG3 Gene Cause Premature Ovarian Insufficiency. *Front Genet.* 2019;10:1016. doi: [10.3389/fgene.2019.01016](https://doi.org/10.3389/fgene.2019.01016).
208. Xie Q, Xiong X, Xiao N, He K, Chen M, Peng J, et al. Mesenchymal Stem Cells Alleviate DHEA-Induced Polycystic Ovary Syndrome (PCOS) by Inhibiting Inflammation in Mice. *Stem Cells Int.* 2019;2019:9782373. doi: [10.1155/2019/9782373](https://doi.org/10.1155/2019/9782373).
209. Xin L, Lin X, Pan Y, Zheng X, Shi L, Zhang Y, et al. A collagen scaffold loaded with human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells

- facilitates endometrial regeneration and restores fertility. *Acta Biomater.* 2019;92:160-71. doi: [10.1016/j.actbio.2019.05.012](https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.05.012).
210. Xu L, Ding L, Wang L, Cao Y, Zhu H, Lu J, et al. Umbilical cord-derived mesenchymal stem cells on scaffolds facilitate collagen degradation via upregulation of MMP-9 in rat uterine scars. *Stem Cell Res Ther.* 2017;8(1):84. doi: [10.1186/s13287-017-0535-0](https://doi.org/10.1186/s13287-017-0535-0).
211. Yang S, Ding S, He S, He L, Gao K, Peng S, Shuai C. Differentiation of primordial germ cells from premature ovarian insufficiency-derived induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Res Ther.* 2019;10(1):156. doi: [10.1186/s13287-019-1261-6](https://doi.org/10.1186/s13287-019-1261-6).
212. Yang X, Zhang M, Zhang Y, Li W, Yang B. Mesenchymal stem cells derived from Wharton jelly of the human umbilical cord ameliorate damage to human endometrial stromal cells. *Fertil Steril.* 2011;96(4):1029-36. doi: [10.1016/j.fertnstert.2011.07.005](https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.07.005).
213. Yang XW, He WB, Gong F, Li W, Li XR, Zhong CG, et al. Novel FOXL2 mutations cause blepharophimosis-ptosis-epicanthus inversus syndrome with premature ovarian insufficiency. *Mol Genet Genomic Med.* 2018;6(2):261-7. doi: [10.1002/mgg3.366](https://doi.org/10.1002/mgg3.366).
214. Yang Y, Lei L, Wang S, Sheng X, Yan G, Xu L, et al. Transplantation of umbilical cord-derived mesenchymal stem cells on a collagen scaffold improves ovarian function in a premature ovarian failure model of mice. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2019;55(4):302-11. doi: [10.1007/s11626-019-00337-4](https://doi.org/10.1007/s11626-019-00337-4).
215. Ye H, Nelson LJ, Gómez Del Moral M, Martínez-Naves E, Cubero FJ. Dissecting the molecular pathophysiology of drug-induced liver injury. *World J Gastroenterol.* 2018;24(13):1373-85. doi: [10.3748/wjg.v24.i13.1373](https://doi.org/10.3748/wjg.v24.i13.1373).
216. Zhang BF, Yu L, Liu Y, Zhao XK, Zhu LL, Cheng ML, et al. Human Placental Extracts Improve Ovarian Function by Reducing Follicular Atresia in Mice With CTX-Induced Premature Ovarian Failure. *J Mol Biomark Diagn.* 2018;9:373. doi: [10.4172/2155-9929.1000373](https://doi.org/10.4172/2155-9929.1000373).

217. Zhang C. The Roles of Different Stem Cells in Premature Ovarian Failure. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2020;15(6):473-481. doi: [10.2174/1574888X14666190314123006](https://doi.org/10.2174/1574888X14666190314123006).
218. Zhang L, Li Y, Guan CY, Tian S, Lv XD, Li JH, et al. Therapeutic effect of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells on injured rat endometrium during its chronic phase. *Stem Cell Res Ther.* 2018;9(1):36. doi: [10.1186/s13287-018-0777-5](https://doi.org/10.1186/s13287-018-0777-5).
219. Zhang S, Li P, Yuan Z, Tan J. Platelet-rich plasma improves therapeutic effects of menstrual blood-derived stromal cells in rat model of intrauterine adhesion. *Stem Cell Res Ther.* 2019;10(1):61. doi: [10.1186/s13287-019-1155-7](https://doi.org/10.1186/s13287-019-1155-7).
220. Zhao YX, Chen SR, Su PP, Huang FH, Shi YC, Shi QY, et al. Using Mesenchymal Stem Cells to Treat Female Infertility: An Update on Female Reproductive Diseases. *Stem Cells Int.* 2019;2019:9071720. doi: [10.1155/2019/9071720](https://doi.org/10.1155/2019/9071720).
221. Zheng SX, Wang J, Wang XL, Ali A, Wu LM, Liu YS. Feasibility analysis of treating severe intrauterine adhesions by transplanting menstrual blood-derived stem cells. *Int J Mol Med.* 2018;41(4):2201-12. doi: [10.3892/ijmm.2018.3415](https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3415).
222. Zhu SF, Hu HB, Xu HY, Fu XF, Peng DX, Su WY, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation restores damaged ovaries. *J Cell Mol Med.* 2015;19(9):2108-17. doi: [10.1111/jcmm.12571](https://doi.org/10.1111/jcmm.12571).

СПИСОК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Наукові праці, у яких відображено основні результати дисертаційного дослідження:

1. Kozub MM, Prokopiuk VY, Skibina KP, Prokopiuk OV, Kozub NI. Comparison of various tissue and cell therapy approaches when restoring ovarian, hepatic and kidney's function after chemotherapy-induced ovarian failure. *Exp Oncol.* 2017;39(3):181-5. *(Дисертантом особисто систематизовано отримані результати, написані основні розділи статті).*
2. Kozub MI, Skybina KP, Musatova IB, Prokopiuk OV, Gramatiuk SM, Tynnyuka LM, et al. Comparison of therapeutic effects of different methods of administration of mezenchimal stem cells to mice with premature ovarian insufficiency. *Проблеми ендокринної патології.* 2021;2:35-9. doi: 10.21856/j-PER.2021.2.05. *(Дисертантом особисто написані основні розділи статті, підготовлено текст статті до друку).*
3. Козуб ММ, Козуб МІ, Скибіна КП. Експериментальне обґрунтування застосування кріоекстракту плаценти у пацієток з синдромом передчасної недостатності яєчників. *Збірник наукових праць співробітників НМАПО ім. П.Л.Шупіка.* 2016;27(1):117-23. *(Дисертантом здійснено набір клінічного матеріалу, проаналізовані отримані результати, оформлено статтю до друку).*
4. Козуб МН, Скибіна КП, Козуб НІ, Прокопюк ВЮ. Реалии и перспективы использования клеточной и тканевой терапии в лечении преждевременной недостаточности яичников (обзор литературы). *Збірник наукових праць асоціації акушерів-гінекологів України.* 2017;1(35):70-5.

(Дисертантом особисто проаналізовано літературні джерела та підготовлено текст статті).

5. Скибіна КП, Козуб НИ, Прокопюк ВЮ. Порівняльна характеристика терапевтичних ефектів кріоекстракта плаценти і мезенхімальних стовбурових клітин жирової тканини у лікуванні передчасної недостатності яєчників, викликаних хіміотерапією, в експерименті. Збірник наукових праць асоціації акушерів-гінекологів України. 2018;1(41):140-5. doi: 10.35278/2664-0767.1(41).2018.172562.

(Дисертантом особисто проаналізовано ефективність застосованих лікувальних методів, систематизовано отримані результати, написані основні розділи статті).

6. Козуб МІ, Граматюк СМ, Гирман ЛІ, Ольховська ВМ, Скибіна КП. Шляхи підвищення ефективності лікування пацієток з ендометріюїдними кістами яєчників репродуктивного віку (огляд літератури). Збірник наукових праць асоціації акушерів-гінекологів України. 2019;1:43-51. doi: 10.35278/2664-0767.1(43).2019.178055. *(Дисертантом особисто проаналізовано літературні джерела та підготовлено текст статті).*

Наукові праці, що засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

1. Skybina KP, Prokopyuk VY, Kozub NI, Kozub MN. Placental cryoextract rescue ovarian function of mice with premature ovarian failure induced by chemotherapy. In: 24th Intern. med. stud. conf. (IMSC)»; 2016 Apr 14-16; Cracow, Poland; 2016, p. 5.
2. Skybina KP, Chub OV, Prokopyuk VYu, Shevchenko MV. Placental factors protects neural cells from glutamate-induced toxicity. In: XXIII Intern. scien. pract. conf. young scien. and student «Topical Issues Of New Drugs Development»; 2016 Apr 21; Kharkiv: NUPh; 2016, p. 82.
3. Прокопюк ВЮ, Скибіна КП, Прокопюк АВ, Козуб МН. Экстракт плаценты ускоряет восстановление половой и репродуктивной функции

- после химиотерапии в эксперименте (пилотное исследование). В: Мат. XIII З'їзд онкол. та радіол. України; 2016 Трав 26-28; Київ, 2016, с.159.
4. Скибіна КП. Порівняльна оцінка тканинної та клітинної терапії у лікуванні передчасної недостатності яєчників в експерименті. В: Мат. наук.-практ. конф. мол. вчен. з міжн. участю «Медицина ХХІ століття»; 2019 Лис 29; Харків: ХМАПО; 2019, с.69.
 5. Skybina KP, Musatova IB, Kozub MI. Application of mesenchymal stem cells of adipose tissue for restoration of sexual function and behavior in the ovarian failure model. In: I conf. scien. et pratiq. intern. «Debats scientifiques et orientations prospectives du developpement scientifique»; 2021 Feb 5; Vinnytsia-Paris: Plateforme scientifique européenne & La Fedeltà; 2021, p.47-48. doi: 10.36074/logos-05.02.2021.v6.14.
 6. Прокопюк ВЮ, Скибіна КП, Козуб НИ, Мусатова ИБ, Шевченко МВ, Прокопюк ОС. Экспериментальное изучение возможностей клеточной и тканевой терапии в реабилитации после химиотерапии. В: Всеукр. наук.-практ. internet-конф. «Фізіологія, валеологія, медицина: сучасний стан та перспективи розвитку»; 2021 Квіт 6; Харків: НФаУ; 2021, с.114.
 7. Prokopiuk VYu, Shevchenko MV, Musatova IB, Skybina KP, Prokopiuk OS, Kozub MI. Optimization of conditions for subnormothermic and hypothermic treatment of mscs as biomaterial for experimental medicine. In: Intern. med. conf. «Biomedical perspectives III»; 2021 Oct 26-28; Sumy: Medical Institute of Sumy State University; 2021, p. 86.
 8. Скибіна КП. Стан печінки та нирок у тварин з передчасною недостатністю яєчників. В: Збірник мат. ХХ наук.-практ. студ. конф. «Uzhgorod medical students conference»; 2023 Квіт 26-28; Ужгород: УжНУ; 2023, с. 48.

***Наукові праці, що додатково відображають
наукові результати дисертації:***

1. Козуб ММ, Пасієшвілі НМ, Скибіна КП, Прокопюк ОВ, Прокопюк ВЮ, винахідники; Інститут проблем кріобіології і кріомедицини Національної академії наук України, патентовласник. Спосіб лікування передчасної недостатності яєчників. Патент України на корисну модель № 107968. 2016 Чер 24.
2. Козуб МІ, Прокопюк ВЮ, Скибіна КП, винахідники; Харківська академія післядипломної освіти, патентовласник. Спосіб лікування передчасної недостатності яєчників в експерименті. Патент України на корисну модель № 115706. 2017 Квіт 25.

ДОДАТОК Б

ЗАТВЕРДЖУЮ

Директор КНП Міського клінічного
пологового будинку № 2 ХМР імені М. Х. Гельферіха
І.В.Ананьєва

«06» 11 2023 р.

АКТ ПРО ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Найменування пропозиції: відновлення репродуктивної функції у жінок з передчасною недостатністю яєчників з використанням кріоекстракта плаценти

2. Ким і коли запропонований:
Скибіною Ксенією Павлівною аспірантом кафедри акушерства та гінекології №3 Харківського національного медичного університету.

3. Джерело інформації:
Патент на корисну модель. Козуб М.М. Пасієшвілі Н.М., Скибіна К.П., Прокопюк О.В., Прокопюк В.Ю.-«Спосіб лікування передчасної недостатності яєчників», Номер патенту: 107968 Опубліковано: 24.06.2016, МПК: А61Р 15/08, А61К 35/50

4. Де і коли введено:
Державний заклад «КНП Міський клінічний пологовий будинок № 2 ХМР імені М. Х. Гельферіха» – в практичну діяльність гінекологічного відділення.

5. Результати застосування методу
за період 06.2021 р. – 12.2022 р. введено в роботу гінекологічного відділення Державного закладу «КНП Міський клінічний пологовий будинок № 2 ХМР імені М. Х. Гельферіха».

6. Ефективність введено за критеріями, висловленими в джерелі інформації.

Введення використання кріоекстракту плаценти, у відновленні репродуктивної функції у пацієнок з передчасною недостатністю яєчників сприяє нормалізації оваріального циклу та підвищенню якості життя жінок.

7. Зауваження, пропозиції – зауважень немає.

Відповідальний за введення
зав гінекологічного відділення
Вдовиченко С.М.

«06» 11 2023 р.

ЗАТВЕРДЖУЮ

Директор КНП Міського клінічного
пологового будинку № 2 ХМР імені М. Х. Гельферіха
І.В.Ананьєва

«06» 11 2023 р.

АКТ ПРО ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції:** відновлення репродуктивної функції у жінок з передчасною недостатністю яєчників з використанням мезенхімальних стовбурових клітин, виділених із жирової тканини
2. **Ким і коли запропонований:**
Скибіною Ксенією Павлівною аспірантом кафедри акушерства та гінекології №3 Харківського національного медичного університету.
3. **Джерело інформації:**
Патент на корисну модель № 115706, Україна, МПК А61К 35/54. Спосіб лікування передчасної недостатності яєчників в експерименті / Козуб Микола Іванович (UA); Прокопюк Володимир Юрійович (UA); Скибіна Ксенія Павлівна (UA); заявник та патентовласник Харківська медична академія післядипломної освіти. –З № u 201611162; заявл. 07.11.16; опубл. 25.04.17., бюл. № 8/2017.
4. **Де і коли введено:**
Державний заклад «КНП Міський клінічний пологовий будинок № 2 ХМР імені М. Х. Гельферіха» – в практичну діяльність гінекологічного відділення.
5. **Результати застосування методу**
за період 06.2021 р. – 12.2022 р. введено в роботу гінекологічного відділення Державного закладу «КНП Міський клінічний пологовий будинок № 2 ХМР імені М. Х. Гельферіха».
6. **Ефективність впровадження за критеріями, висловленими в джерелі інформації.**
Впровадження використання мезенхімальних стовбурових клітин, виділених із жирової тканини у відновленні репродуктивної функції у пацієнок з передчасною недостатністю яєчників сприяє нормалізації оваріального циклу та підвищенню якості життя жінок.
7. **Зауваження, пропозиції** – зауважень немає.

Відповідальний за впровадження
Зав. гінекологічного відділення
Вдовиченко С.М.

«06» 11 2023 р.

Онлайн сервіс створення та перевірки кваліфікованого та удосконаленого електронного підпису

ПРОТОКОЛ

створення та перевірки кваліфікованого та удосконаленого електронного підпису

Дата та час: 19:26:55 18.12.2023

Назва файлу з підписом: Скибіна Ксенія дисертація .pdf.p7s

Розмір файлу з підписом: 4.5 МБ

Перевірені файли:

Назва файлу без підпису: Скибіна Ксенія дисертація .pdf

Розмір файлу без підпису: 4.4 МБ

Результат перевірки підпису: Підпис створено та перевірено успішно. Цілісність даних підтверджено

Підписувач: Скибіна Ксенія Павлівна

П.І.Б.: Скибіна Ксенія Павлівна

Країна: Україна

РНОКПП: 3409813889

Час підпису (підтверджено кваліфікованою позначкою часу для підпису від Надавача): 20:26:50 18.12.2023

Сертифікат виданий: "Дія". Кваліфікований надавач електронних довірчих послуг

Серійний номер: 382367105294AF9704000000EF94180033AAS101

Тип носія особистого ключа: ЗНКІ криптомодуль ІТ Гряда-301

Алгоритм підпису: ДСТУ-4145

Тип підпису: Кваліфікований

Тип контейнера: Підпис та дані в CMS-файлі (CAAdES)

Формат підпису: З повними даними ЦСК для перевірки (CAAdES-X Long)

Сертифікат: Кваліфікований

Онлайн сервіс створення та перевірки кваліфікованого та удосконаленого електронного підпису

ПРОТОКОЛ

створення та перевірки кваліфікованого та удосконаленого електронного підпису

Дата та час: 19:26:55 18.12.2023

Назва файлу з підписом: Скибіна Ксенія дисертація .pdf.p7s

Розмір файлу з підписом: 4.5 МБ

Перевірені файли:

Назва файлу без підпису: Скибіна Ксенія дисертація .pdf

Розмір файлу без підпису: 4.4 МБ

Результат перевірки підпису: Підпис створено та перевірено успішно. Цілісність даних підтверджено

Підписувач: Скибіна Ксенія Павлівна

П.І.Б.: Скибіна Ксенія Павлівна

Країна: Україна

РНОКПП: 3409813889

Час підпису (підтверджено кваліфікованою позначкою часу для підпису від Надавача): 20:26:50 18.12.2023

Сертифікат виданий: "Дія". Кваліфікований надавач електронних довірчих послуг

Серійний номер: 382367105294AF9704000000EF94180033AAC101

Тип носія особистого ключа: ЗНКІ криптомодуль ІІТ Гряда-301

Алгоритм підпису: ДСТУ-4145

Тип підпису: Кваліфікований

Тип контейнера: Підпис та дані в CMS-файлі (CAdES)

Формат підпису: З повними даними ЦСК для перевірки (CAdES-X Long)

Сертифікат: Кваліфікований