

Корекція інволютивних змін репродуктивної системи самиць старих щурів імплантацією кріоконсервованих фрагментів плаценти

В.Ю. Прокопюк¹, О.С. Прокопюк¹, І.Б. Мусатова¹, І.В. Сорокіна²,
О.О. Логінова³, К.В. Сомова⁴

¹Інститут проблем кріобіології та кріомедицини НАН України;

²Харківський національний медичний університет МОЗ України;

³Харківська медична академія післядипломної освіти МОЗ України;

⁴Харківський національний університет ім. В.П.Каразіна; e-mail: o.s.prokopiuk@gmail.com

Експериментально дослідили вплив імплантації кріоконсервованих фрагментів плаценти людини (КФП) на статеву систему і репродуктивну функцію самиць щурів, що старіють. Виявлено збільшення числа зростаючих і зрілих фолікулів удівчі, жовтих тіл – в 1,8 раза порівняно зі старими хібнооперованими самицями. Спостерігалось зниження апоптотичного індексу клітинних елементів яєчників, оптичної щільності світіння колагену IV типу та збільшення інтенсивності світіння ендотеліоцитів, що експресують рецептори до ендотеліну-1. Після імплантації КФП матки за ваговими коефіцієнтами були подібні до таких у молодих самиць. У самиць основної дослідної групи знижувалася оптична щільність флуоресценції дезоксирибонуклеотидів в ядрах епітеліоцитів та підвищувалася оптична щільність флуоресценції рибонуклеопротеїдів у цитоплазмі клітин маток, що є ознакою підвищення їх функціональної активності, порівняно зі старими хібнооперованими самицями. Таким чином, імплантація КФП відновлює тканини репродуктивної системи самиць щурів, що старіють, але без відновлення репродуктивної функції.

Ключові слова: пізній онтогенез; інволютивні зміни; кріоконсервовані фрагменти плаценти; щури; репродуктивна система.

ВСТУП

Сучасна демографічна ситуація в розвинених країнах світу характеризується суттєвим збільшенням населення старшого віку [1]. У віковій структурі населення України частка осіб передстарого працездатного віку (50-64 років) і старшого працездатного віку (понад 65 років) перевищує 35 %, а у гендерній – переважають жінки, особливо в старшій віковій групі (до 70%). Хоча тривалість їх життя порівняно з чоловіками є більшою, проте захворюваність серед жіночого населення старшого віку різко зростає, а якість життя і соціалізація погіршується [2-4]. Природне бажання людей похилого віку продовжити життя, зберегти працездатність, фізичну, творчу і сексуальну активність, репродук-

тивну функцію та зменшити захворюваність і важкість перебігу хвороб, пов'язаних зі старінням, зумовлює розвиток нових медичних технологій у геріатрії. Тому проблема створення геропротекторів – лікувально-профілактичних засобів, здатних підвищувати можливості організму запобігати патологічному та прискореному старінню, не втрачає актуальності і потребує нових підходів до вирішення.

Старіння – це складний процес перебування та адаптації організму до обмежених функціональних можливостей, а також прогресуючого в зв'язку з цим зниження якості життя. Особливістю функціонування жіночого організму в період пізнього онтогенезу є критичне зниження вмісту жіночих статевих

гормонів, які в репродуктивному віці забезпечують протекторну дію на серцево-судинну систему, обмін речовин, гомеостаз у цілому, що призводить до швидкого розвитку сенильно-інволютивних змін. Існуючі профілактично-терапевтичні програми корекції геріатричної патології є мультикомпонентними, їх фармакологічна складова представлена багатьма класами лікарських препаратів, застосування яких часто призводить до ускладнень від фармакологічної агресії [5-7]. Водночас недостатня ефективність існуючих геропротекторів зумовлює активний пошук природних комплексних біорегуляторів, спрямованих на відновлення порушених з віком функцій організму [8-10].

У сучасній регенеративній медицині біопрепаратами, які мають максимально поліомодальну і ефективну біологічну дію, визначено біооб'єкти плацентарного походження [11-13]. Їх дія зумовлена генетичною програмою і властивостями плаценти як структури, що забезпечує розвиток організму, біозахист від ушкоджуючих факторів, а також відновлення і функціонування організму у цілому. Терапія з використанням клітин, тканин чи есенціальних сполук плаценти в геріатричній практиці є доцільною з патогенетичної точки зору, але потребує збереження їх природного складу і активності, що наразі можуть забезпечити кріобіотехнології [14-16]. Застосування плацентарних біопрепаратів з потужною біологічною дією, котра онтогенетично відповідає моменту народження, пацієнтам похилого віку, у яких діапазон функціональних можливостей обмежений, а чутливість до біологічних агентів змінена, потребує ретельного наукового обґрунтування, визначення механізмів дії та принципів безпечного використання.

Метою нашого дослідження було встановлення впливу імплантації кріоконсервованих фрагментів плаценти людини (КФП) на статеву систему і репродуктивну функцію самиць щурів у період пізнього онтогенезу.

МЕТОДИКА

Плаценту отримували з інформованої згоди жінки після операції кесарів розтин. Фрагменти розміром 1,0×0,5×0,5 см відокремлювали від плаценти з наступним їх низькотемпературним консервуванням за раніше описаним методом [17] та зберігали за -196°C. Безпосередньо перед імплантацією КФП розморожували на водяній бані при +40°C до появи рідкої фази.

Старим (18 міс) самицям щурів лінії WAG проводили імплантацію КФП (розріз до 1,0 см) під шкіру в паравертебральну ділянку над стегном під місцевою анестезією з використанням 1,0 мл 0,25%-го розчину новокаїну, після чого розріз зашивали. Дозу імплантованих КФП (70 мг) розраховували з урахуванням активності метаболізму дослідних тварин [18]. Основну дослідну групу (3-тя група) склали самиці з імплантованими КФП. Групами порівняння були хібнооперовані старі (18-місячні) самиці щурів (2-га група негативного контролю), котрим проводили аналогічний розріз шкіри з наступним його зашиванням, але без імплантації КФП, та інтактні молоді (5-місячні) самиці щурів (1-ша група позитивного контролю). До кожної групи входило по 20 тварин. Всі роботи виконували з дотриманням правил асептики і антисептики. Досліди проведено на самицях щурів, яких утримували на стандартному раціоні віварію Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України з дотриманням „Загальних етичних принципів експериментів на тваринах”, схвалених І Національним конгресом з біоетики (Київ, 2001), положень «Європейської Конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986).

Протягом 2 міс спостерігали за поведінкою (активність, рухливість, спарювання) і зовнішнім виглядом тварин, наявністю екстрального циклу, після чого виводили їх із експерименту. Проводили макроскопічну оцінку яєчників і маток, визначали

їх масові коефіцієнти (відносно маси тіла), морфологічну будову з підрахунком кількості генеративних елементів у яєчниках та визначенням морфометричних показників маток. Гістологічні дослідження виконували за стандартними протоколами [19], використовуючи для забарвлення препаратів яєчників і маток гематоксилін, еозин та пікрофуксин за ван Гізоном. Зображення отримували, використовуючи тринокулярний мікроскоп з фото/відео виходом XSP-139TP („JNOEC”, Японія-Китай), цифрову камеру („Sigeta CMOS 3100”, Китай) та програмне забезпечення TourView 3.7.

Гістохімічними методами в органах репродуктивної системи досліджували потенціал генетичної детермінації реакцією Фельгена-Россенбека на дезоксирибонуклеотиди, білоксинтетичної функції – реакцією Браше на рибонуклеопротейди [20]. Імуногістохімічне дослідження проводили на парафінових зрізах товщиною 5–6 мкм методами Кунса-Бросмана з використанням моноклональних антитіл (МКА) до ендотеліну-1, колагену IV типу та CD 95 (для визначення апоптотично змінених клітин; Novocastra Laboratories Ltd.) [21]. Оптичну щільність флуоресценції ендотеліну-1 і колагену IV типу в судинах яєчників самиць щурів визначали за методикою Губіної-Вакулик зі співавт. [22]. Морфометричні дослідження проводили за допомогою

люмінесцентного мікроскопа «Axioskop 40» («Carl Zeiss», Німеччина).

Статистичну обробку результатів здійснювали методом парних порівнянь з використанням критерію t Стьюдента та програмного забезпечення Past V. 3.15.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

При візуальному огляді молоді самиці щурів мали щільний хутряний покрив, не мали видимих ознак хвороб та відзначалися активною поведінкою. За результатами вагінальних мазків в усіх самиць спостерігався 4–5-добовий регулярний естральний цикл. Після спарювання з самцями вони завагітніли та народили здоровий приплід. Макроскопічне дослідження яєчників молодих самиць показало, що їх форма була округлою, білочна оболонка – тонкою або трохи потовщеною, іноді виявлялося більш значне потовщення. Поверхня яєчників була дрібнозернистою, на розрізі тканина яєчників мала сірувато-рожевий колір, нерідко спостерігалися дрібні або середніх розмірів порожнини округлої форми, наповнені прозорою або бурю рідиною. Вагові коефіцієнти яєчників у середньому становили $0,043 \pm 0,0041$ (табл. 1). При мікроскопічному дослідженні в яєчниках виявлялися усі типові генеративні елементи на різних стадіях розвитку (рисунки I, а),

Таблиця 1. Кількість генеративних елементів та вагові коефіцієнти яєчників ($M \pm m$)

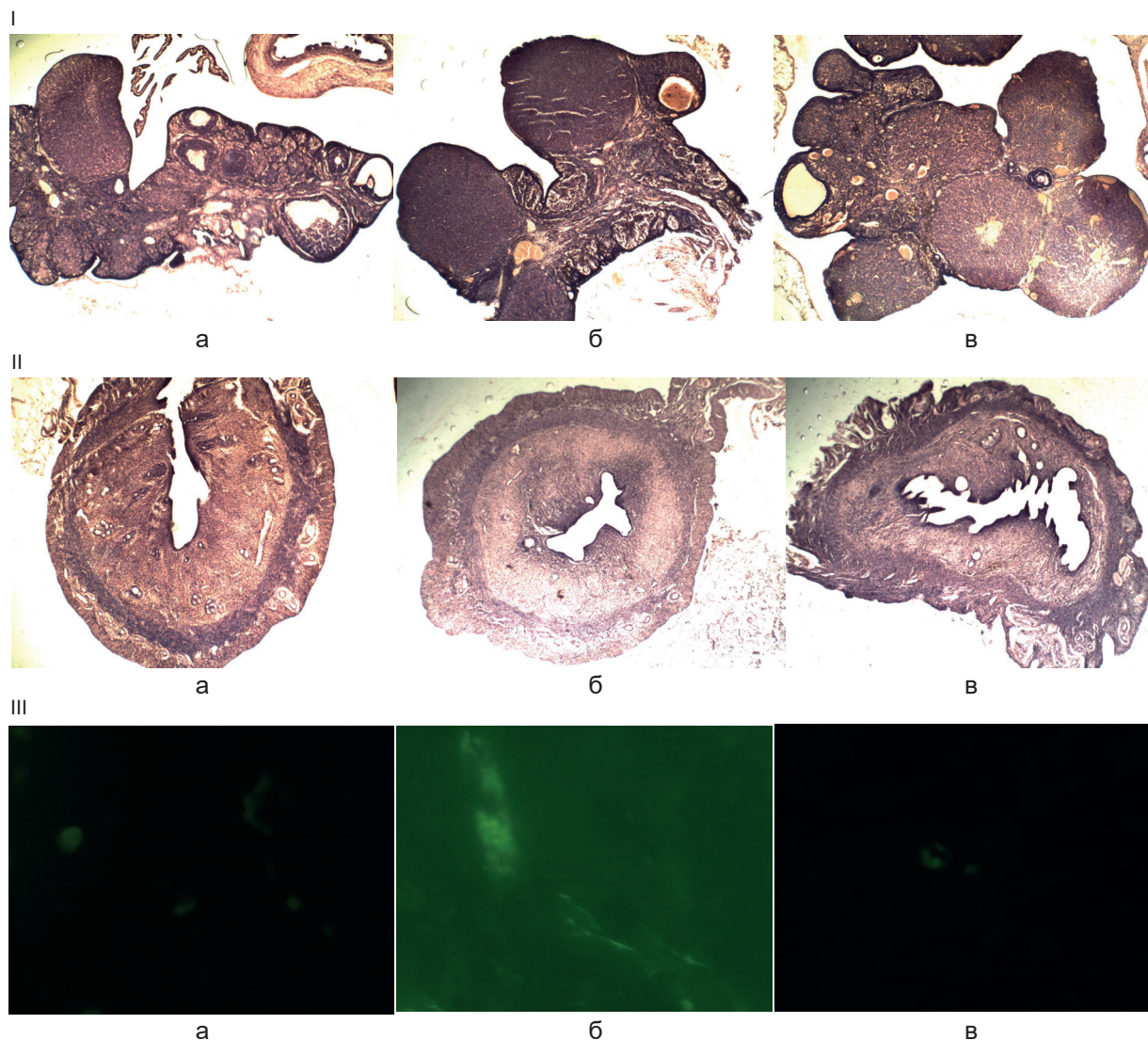
Показники	Молоді самиці (група 1)	Старі хибнооперовані самиці (група 2)	Старі самиці з імплантованими кріоконсервованими фрагментами плаценти людини (група 3)
Примордіальні фолікули	$851,5 \pm 56,8$	$212,4 \pm 28,3^*$	$223,1 \pm 32,1^*$
Фолікули, які ростуть	$52,3 \pm 1,3$	$21,2 \pm 2,1^*$	$42,2 \pm 3,5^{*,**}$
Зрілі фолікули	$6,1 \pm 1,2$	$2,3 \pm 0,3^*$	$5,1 \pm 0,5^{*,**}$
Атретичні фолікули	$853,5 \pm 61,1$	$1383 \pm 125,2^*$	$1311,5 \pm 98,4^*$
Жовті тіла	$8,7 \pm 0,6$	$4,2 \pm 1,5^*$	$7,5 \pm 0,8^{**}$
Загальна кількість генеративних елементів	$1777,2 \pm 123,1$	$1621,2 \pm 145,3$	$1589,2 \pm 176,8$
Вагові коефіцієнти яєчників (г/100 г маси тварини)	$0,043 \pm 0,0041$	$0,035 \pm 0,0032$	$0,040 \pm 0,002^{**}$

Примітки: тут і в табл. 1-4: * $P < 0,05$ порівняно з 1-ю групою, ** $P < 0,05$ порівняно з 2-ю групою

співвідношення генеративних елементів відповідало їх фізіологічній нормі (див. табл. 1). У яєчниках зустрічалися ніжні колагенові волокна, які забарвлювалися пікрофуксином. Ріст і дозрівання фолікулів у цій групі відповідали нормі. Імуногістохімічно в яєчниках виявлено специфічне світіння окремих клітин (див. рисунок III, а), значення апоптотичного індексу віддзеркалювало органоспецифічні

циклічні процеси. Виявлялося слабке осередкове світіння базальних мембран судин і ендотелію (табл. 2). У деяких полях зору в просвіті судин яєчників спостерігалось світіння помірної інтенсивності ендотеліоцитів, які експресують рецептори до ендотеліну-1 (див. табл. 2).

Стан маток у дослідних тварин є біологічним тестом для визначення функціональної



Дослідження репродуктивних органів самиць щурів гістологічне (I – яєчників, II – маток), забарвлення гематоксилином і еозином, збільшення у 40 разів та гістохімічне (III – яєчників), прямий метод Кунса з моноклональними антитілами до CD 95, збільшення у 100 разів:

а – молоді самиці;

б – старі хібнооперовані самиці;

в – старі самиці після імплантації кріоконсервованого фрагменту плаценти

Таблиця 2. Індекс апоптозу клітин яєчників і оптична щільність флуоресценції ендотеліну-1 і колагену IV типу в судинах яєчників ($M \pm m$)

Показники	Молоді самиці (група 1)	Старі хібно-оперовані самиці (група 2)	Старі самиці з імплантованими кріоконсервованими фрагментами плаценти людини (група 3)
Індекс апоптозу	4,0±0,1	6,9±0,3*	4,7±0,6**
Оптична щільність флуоресценції ендотеліну-1, ум.од.	0,23±0,08	0,21±0,04*	0,22 ±0,05
Оптична щільність флуоресценції колагену IV типу, ум.од.	0,16±0,07	0,20±0,03	0,17±0,02**

активності яєчників, оскільки гормони яєчників впливають на ступінь проліферативних процесів у матці. Морфологічна структура маток молодих самиць відповідала фазам проєструсу і еструсу. Макроскопічно роги матки були помірно потовщені, повнокровні. На розрізі виявлялася виражена складчастість слизової оболонки. Вагові коефіцієнти маток наведені в табл. 3.

При мікроскопічному дослідженні маток молодих самиць спостерігали значно потовщений ендометрій, в стромі якого виявлено як

поодинокі, так і групи залоз, характерні для репродуктивного віку (див. табл. 3). Отримані значення оптичної щільності флуоресценції дезоксирибонуклеотидів та рибонуклеопротейдів (табл. 4) свідчать про достатньо високий рівень активності нуклеопротейдів, детермінований специфічним циклічним відновленням структури в процесі функціонування органу репродукції.

Хібнооперовані старі самиці були менш активними, з дефектами хутряного покриву, без ознак хвороб. При дослідженні стат-

Таблиця 3. Морфометричні та вагові показники маток ($M \pm m$)

Показники	Молоді самиці (група 1)	Старі хібнооперовані самиці (група 2)	Старі самиці з імплантованими кріоконсервованими фрагментами плаценти людини (група 3)
Кількість поодиноких залоз ендометрія на зрізі	5,2±0,45	4,0±0,3*	5,0±0,35**
Кількість груп залоз на зрізі	6,3±0,4	1,2±0,1*	4,2±0,34*,**
Діаметр залози, мкм	32,1±2,4	12,3±1,2*	28,3±2,5**
Товщина строми ендометрія, мкм	55,5±4,3	10,3±1,2*	48,5±4,6**
Товщина ендометрія, мкм	253,3±20,5	149,2±12,2*	230,5±23,4**
Товщина міометрія, мкм	72,2±7,2	40,5±5,7*	52,5±5,4**
Вагові коефіцієнти маток (г/100 г маси тварини)	0,234±0,032	0,150±0,018*	0,220±0,019**

Таблиця 4. Оптична щільність флуоресценції рибонуклеопротейдів та дезоксирибонуклеотидів в клітинах маток ($M \pm m$)

Оптична щільність флуоресценції, ум.од.	Молоді самиці (група 1)	Старі хібнооперовані самиці (група 2)	Старі самиці з імплантованими кріоконсервованими фрагментами плаценти людини (група 3)
Дезоксирибонуклеотиди	0,131 ± 0,010	0,172 ± 0,010*	0,152 ± 0,005*,**
Рибонуклеопротейди	0,161 ± 0,023	0,139 ± 0,002*	0,151 ± 0,010**

вого циклу у них спостерігали подовження циклу до 6 – 7 діб, дві самиці знаходилися у фазі деєструсу протягом усього періоду спостереження. При розміщенні з самцями репродуктивного віку самиці не допускали спарювання, проявляючи агресію. Макроскопічно яєчники відрізнялися від таких молодих самиць наявністю зон склеротичних деформацій. Вагові коефіцієнти гонад були нижчими, що пов'язано з інволюцією яєчників і збільшенням маси самиць з віком (див. табл. 1). Мікроскопічно спостерігали зменшення кількості фолікулів на всіх стадіях їх розвитку (див. рисунок I, б). Спостерігалися поодинокі зрілі фолікули, збільшення кількості жовтих тіл та атретичних фолікулів (див. табл. 1). У клітинах яєчників виявляли підвищення значення оптичної щільності флуоресценції дезоксирибонуклеотидів та зниження такого – рибонуклеопротейдів. Відзначено вірогідне збільшення апоптотичного індексу клітинних елементів яєчників (див. табл. 2). У базальних мембранах судин і епітелію порівняно з молодими тваринами виявлено більш яскраве світіння колагену IV типу, що свідчить про наявність склеротичних змін [23]. Макроскопічно роги матки були атрофічними, зтоншеними, вагові коефіцієнти маток – достовірно зниженими (див. табл. 3), на розрізі складчастість слизової оболонки – згладжена. При мікроскопічному дослідженні ендометрія спостерігалася помірна гіпоплазія, сплюснення і дифузний розвиток сполучної тканини, групи залоз практично не виявлялися, а поодинокі мали менший діаметр, ніж у молодих самиць. Строма ендометрія та міометрій також були достовірно тоншими (див. табл. 3). Оптична щільність флуоресценції дезоксирибонуклеотидів було підвищеною, що свідчило про збільшення кількості гетерохроматину. Оптична щільність світіння рибонуклеопротейдів як показника потенціалу анаболічних процесів знижена порівняно з молодими самицями (див. табл. 4).

Самиці з імплантованими кріоконсервованими фрагментами плаценти на початок

експерименту були малорухливі, видимих ознак хвороб не мали, їх хутряний покрив був середньої щільності. Після імплантації КФП, починаючи з 10-ї доби, підвищився апетит, відновилася рухливість і статевая активність тварин, значно покращився зовнішній вигляд хутряного покриву, відновився естральний цикл до 4 – 5 діб. Спарювання з молодими самцями відбувалося, проте жодна з самиць не завагітніла. Макроскопічне дослідження яєчників показало наявність ознак помірної фіброзної деформації (див. рисунок I, в). За ваговим коефіцієнтом достовірної відмінності від яєчників молодих самиць не було. Незважаючи на невелику кількість примордіальних та збільшену кількість атретичних фолікулів порівняно з молодими самицями, число зростаючих і зрілих фолікулів та жовтих тіл значно перевищувало цей показник у старих хибнооперованих самиць (див. табл. 1). Імуногістохімічне дослідження виявило специфічне світіння клітин яєчників (див. рисунок III, в). Спостерігалася також зниження апоптотичного індексу клітинних елементів яєчників порівняно з групою хибнооперованих самиць. При цьому оптична щільність світіння колагену IV типу була нижчою, а інтенсивність світіння ендотеліоцитів, що експресують рецептори до ендотеліну-1, вищою порівняно з групою старих хибнооперованих самиць (див. табл. 2). Вищевказане свідчить, що відбулася стабілізація базальних мембран судин, що призвело до підвищення функціональної активності ендотеліоцитів та експресії рецепторів до ендотеліну-1. Макроскопічне дослідження виявило, що після імплантації КФП матки були гіпертрофовані, повнокровні та за ваговими коефіцієнтами подібні до таких у молодих самиць. Спостерігалася потовщення маток за рахунок фізіологічної проліферації ендометрія та строми, збільшення розмірів поодиноких залоз (див. табл.3). Подекуди зустрічалися групові залози. Міометрій також мав потовщений вигляд. Гістохімічно виявлено зниження оптичної щільності флуоресценції дезоксирибонуклео-

тидів в ядрах епітеліоцитів та підвищення оптичної щільності флуоресценції рибонуклеопротейдів у цитоплазмі клітин маток порівняно зі старими хібнооперованими самками, що є ознакою підвищення функціональної активності цих клітин (див. табл. 4).

Отримані результати інтерпретуються як процес корекції інволютивних змін, відновлення тканин репродуктивної системи за допомогою активізації обміну нуклеопротейдів, мікрогемодинаміки, зниження апоптотичних процесів, зменшення фіброзу, гіперплазії залоз, проліферації раніш атрофованого ендометрія, але без відновлення репродуктивної функції.

Проведені дослідження демонструють, що імплантація кріоконсервованих фрагментів плаценти самицям пізнього онтогенезу з інволютивними проявами в органах репродукції викликає їх зворотний позитивний розвиток. Відновлювалася структура та функціональний стан яєчників і матки, але до такого ступеня, що виявився недостатнім для відновлення репродуктивної функції та настання вагітності. Таким чином, проблема застосування кріоконсервованих фрагментів плаценти в регенеративній медицині та геріатрії залишається актуальною і потребує подальшого вивчення.

The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of coauthors of the article.

**В.Ю. Прокопюк¹, О.С. Прокопюк¹,
И.Б. Мусатова¹, И.В. Сорокина²,
О.А. Логинава³, Е. В. Сомова⁴**

КОРРЕКЦИЯ ИНВОЛЮТИВНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ РЕПРОДУКТИВНОЙ СИСТЕМЫ САМОК СТАРЫХ КРЫС ПРИ ПОМОЩИ ИМПЛАНТАЦИИ КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ ФРАГМЕНТОВ ПЛАЦЕНТЫ

Експериментально досліджено вплив імплантації кріоконсервованих фрагментів плаценти людини (КФП) на статеву систему і репродуктивну функцію

самок крыс в период позднего онтогенеза. Выявлено увеличение числа растущих и зрелых фолликулов вдвое, желтых тел – в 1,8 раза по сравнению со старыми ложнооперированными самками. Наблюдалось снижение индекса апоптоза клеточных элементов яичников, оптической плотности свечения коллагена IV типа и увеличение интенсивности свечения эндотелиоцитов, которые экспрессируют рецепторы к эндотелину- 1. После имплантации КФП матки по весовым коэффициентам были подобны таковым у молодых самок. У самок основной подопытной группы снижалась оптическая плотность флуоресценции дезоксирибонуклеотидов в ядрах эпителиоцитов и повышалась оптическая плотность флуоресценции рибонуклеопротейдов в цитоплазме клеток маток, которая является признаком увеличения их функциональной активности, по сравнению со старыми ложнооперированными самками. Таким образом, имплантация КФП восстанавливает ткани репродуктивной системы самок стареющих крыс, но без возобновления репродуктивной функции.

Ключевые слова: поздний онтогенез; инволютивные изменения; кріоконсервованные фрагменты плаценты; крысы; репродуктивная система.

**V.Yu. Prokopyuk¹, O.S. Prokopyuk¹,
I.B. Musatova¹, I.V. Sorokina², O.O. Loginova³,
K.V. Somova⁴**

CORRECTION OF INVOLUTIVE CHANGES IN THE REPRODUCTIVE SYSTEM OF LATE ONTOGENESIS FEMALE RAT BY IMPLANTATION OF CRYOPRESERVED FRAGMENTS OF THE PLACENTA

The effect of cryopreserved human placenta fragments (CPF) implantation on female rats' reproductive system and its function in the period of late ontogenesis was experimentally investigated. The increase of number of growing and mature follicles is educed twice, yellow bodies - in 1,8 time as compared to old falsely-operated females. There was a decline of index of apoptosis of cellular elements of ovaries, to the absorbancy of luminescence of collagen type IV and increase of intensity of luminescence of endotheliocytes that expressed receptors to endothelin- 1. After implantation of CPF of uterus on gravimetric coefficients were similar to such for young females. For the females of basic experimental group the decline of absorbancy of fluorescence of deoxyribonucleotides was observed in the nucleus of epitheliocytes and increase of absorbancy of fluorescence of ribonucleoproteins in the cytoplasm of cells of uterus, that is the sign of increase of their functional activity, as compared to old falsely-operated females. Thus, implantation of CPF restores tissue of the reproductive system of females of senescent rats, but without proceeding in a reproductive function.

Key words: late ontogenesis; involutive changes; cryopreserved fragments of placenta; rats; reproductive system.

*Institute of Cryobiology and Cryomedicine, NAS of Ukraine¹;
Kharkiv National Medical University, Ministry of Health of
Ukraine²;
Kharkiv Medical Academy of Postgraduate Education,
Ministry of Health of Ukraine³;
VP Karazin's Kharkiv National University⁴*

REFERENCES

1. Naghavi M, Wang H, Lozano R, Foigt N, et al. Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet* 2015; 385(9963): 117-71.
2. Korkushko OV, Kopchak OO, Shatilo VB, Bachinskaya NYu. Metabolic syndrome and cognitive disorders in older patients with dyscirculatory encephalopathy. *Adv in Gerontol.* 2015; 28(3): 546-54. [Ukrainian].
3. Jackson Charles F, Wenger Nanette K. Cardiovascular Disease in the Elderly. *Rev Esp Cardiol.* 2011; 64(8): 697-712.
4. Sydora BC, Yuksel N, Veltri NL, Marillier J, Sydora CP, Yaskina M et al. Patient characteristics, menopause symptoms, and care provided at an interdisciplinary menopause clinic: retrospective chart review. *Menopause.* 2017 Jul 10. doi: 10.1097/GME.0000000000000942.
5. Pinkerton JV, Pastore LM, Johns DW, Tucker AL. Risk of first-time heart disease higher for hormone therapy users with metabolic syndrome. *Menopause.* 2013 Mar;20(3):244-7. doi: 10.1097/GME.0b013e3182850c5d.
6. Bezrukov VV, Kuprash LP, Kuprash EV, Gudarenko SA. Optimization of drug therapy in geriatric clinic. *Ratsional Farmakoterap.* 2015; 37(4): 5-9. [Ukrainian].
7. Marjoribanks J, Farquhar C, Roberts H, Lethaby A, Lee J. Long-term hormone therapy for perimenopausal and postmenopausal women. *Cochrane Database Syst Rev.* 2017 Jan 17;1:CD004143. doi: 10.1002/14651858.CD004143.pub5.
8. Mys LA, Budko AYU, Strutynska NA, Sagach VF. Pyridoxal-5-phosphate restores hydrogen sulfide synthesis and redox state of heart and blood vessels tissue in old animals. *Fiziol Zh.* 2017; 63(1): 3-9. [Ukrainian].
9. Zhu X, Liew Y, Liu ZL. Chinese herbal medicine for menopausal symptoms. *Cochrane Database Syst Rev.* 2016 Mar 15;3:CD009023. doi: 10.1002/14651858.CD009023.pub2.
- 10 Korkushko OV, Khavinson VK, Butenko GM, Shatilo VB. Peptide drugs of thymus and epiphysis in prevention of accelerated aging. *St. Petersburg: Nauka*, 2002. [Russian].
11. Shakouri-Motlagh A, Khanabdal R, Heath DE, Kalionis B. The application of decellularized human term fetal membranes in tissue engineering and regenerative medicine (TERM). *Placenta.* 2017 Jul 4. pii: S0143-4004(17)30651-3. doi: 10.1016/j.placenta.2017.07.002.
12. Gromova OA, Torshin IYu, Dibrova EA, Karimova IM, Gilels AV, Kustova EV. World experience in using human placenta-derived drugs: findings of clinical and experimental studies. *Review. Plasticheskaya Khirurgiya i Kosmetologiya.* 2011; 3: 1-12. [Ukrainian].
13. Pitko VA. Effect of cryopreserved chorion extract and tissue on the activity of lipid peroxidation processes and antioxidant system in patients with subacute salpingoophoritis. *Probl Cryobiol.* 2001; 3: 133. [Ukrainian].
14. Goltsev AN, editor. Actual problems of cryobiology and cryomedicine. *Kharkov: Raider*; 2012. [Ukrainian].
15. Pitko VA, Lazurenko VV, Antonyan MI, Feskov AM. Tissue therapy in a combined therapy of patients with chronic prostatitis: immunological aspects. *Exp Clin Med.* 2004; 4: 169-72. [Ukrainian].
16. Musatova IB, Prokopyuk OS, Volina VV, Prokopyuk VYu. Design of cryoprotective media for preservation of placental tissue explants. *Biotechnologia Acta.* 2013; 6 (6): 132-38. [Ukrainian].
17. Prokopyuk VYu, Prokopyuk OS, Musatova IB, Shevchenko NA, Roenko AA, Terehova EA, et al. Safety of placental, umbilical cord and fetal membrane explants after cryopreservation. *Cell and organ transplantology.* 2015; 3(1): 34-8.
18. Stefanov OV, editor. Preclinical trials of drugs: methodical recommendations. *Kyiv: Avitsenna*; 2001.
19. Korzhevsky DE, Gilyarov AV. Bases of histological technique. *Practice guideline.* St. Petersburg: Spetslit; 2010. [Russian].
20. Pearse E. Histochemistry (theoretical and applied). *Moscow: Foreign Languages Publishing House*; 1962.
21. Brosman M. Immunofluorescence vystrovanie formal-parafinovogo materialu. *Cs. Patol.* 1979; 15(4): 215-20.
22. Gubina-Vakulik GI, Sorokina IV, Markovsky VD, Kupriyanova LS, Sidorenko RV. Method of quantitative determination of antigen content in biological tissues. *Patent of Ukraine for utility model No. 46489 G01N 33/00*, 2009 Dec25. [Ukrainian].
23. Liliensiek SJ, Nealey P, Murphy CJ. Characterization of endothelial basement membrane nanotopography in rhesus macaque as a guide for vessel tissue engineering. *Tissue Engineering.* 2009; 15 (9): 2643-51.

*Матеріал надійшов
до редакції 05.11.2017*