

## ВПЛИВ КОНДИЦІОНОВАНИХ СЕРЕДОВИЩ ВІД КУЛЬТУР ГЛІАЛЬНИХ КЛІТИН НА РЕПРОДУКТИВНУ СИСТЕМУ САМИЦЬ ЩУРІВ РІЗНОГО ВІКУ\*

Г. В. Нестерук<sup>1,2</sup>, Н. М. Алабедалькарім<sup>1</sup>, Н. В. Колот<sup>2</sup>,  
Н. А. Комаромі<sup>2</sup>, О. С. Проценко<sup>2</sup>, Є. І. Легач<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків, Україна

<sup>2</sup> Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, м. Харків, Україна  
*nesterukhanna@gmail.com*

Відкладене дітонародження у промислово розвинених країнах є сучасною тенденцією. За останні десять років кількість жінок, що народжують у віці старше 35 років, збільшилася в 2,8 рази, тоді як у віці від 20 до 24 років скоротилася в середньому на 9 % [1]. Репродуктивне старіння жінок багато в чому ґрунтується на вікових змінах функції яєчників. Відомо, що репродуктивна здатність жінки закладається при народженні та являє собою невідновлюваний пул примордіальних фолікулів [2]. Вони можуть залишатися у дормантному стані протягом багатьох років. Активація цього пулу відбувається незалежно від гормональних впливів. Механізм залучення примордіальних фолікулів до фази росту досі залишається не до кінця зрозумілим, однак передбачається, що провідна роль у цьому процесі належить паракринній ре-

гуляції, яка одночасно включає сигнали пригнічення та активації. Одним з кандидатів на роль активаторів пропонується сімейство нейротрофічних факторів [3–5], до якого відносяться фактор росту нервів (NGF), нейротрофічний фактор головного мозку (BDNF), нейротрофічний фактор, отриманий з гліальних клітин (GDNF), нейротрофіни 3 (NT-3), 4/5 (NT-4/5) та 6 (NT-6).

Використання клітинної та тканинної терапії для корекції функції жіночої репродуктивної системи було досить поширеним на протязі останніх десятиріч [6]. Однак ризики неадекватного приживлення та диференціювання стовбурових клітин, їх імунного відторгнення або виникнення пухлин обмежують безпечно використання клітинних препаратів. Вивчення механізмів дії клітинної терапії привело до розуміння, що її основні ефекти є опосередко-

\* Дослідження виконано в рамках науково-дослідної роботи Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України «Морфофункціональні характеристики, кріоконсервування та терапевтичний потенціал 2D- і 3D-культур клітин, отриманих з похідних нервового гребеня» (№ державної реєстрації 0121U100).

Установою, що фінансує дослідження, є НАН України.

Автори гарантують колективну відповідальність за все, що опубліковано в статті.

Автори гарантують відсутність конфлікту інтересів та власної фінансової зацікавленості.

Рукопис надійшов до редакції 31.01.2022.

ваними біологічно активними факторами, які секретуються трансплантованими клітинами у організмі реципієнта [7]. Отже, на теперішній час у регенеративній та відновлювальній медицині інтерес сфокусовано на безпосередньому застосуванні кондиціонованих середовищ (КС), які мають значний терапевтичний потенціал та пропонуються як альтернатива клітинної терапії [8, 9]. Припускається, що ефекти КС базуються на паракринній регуляції, оскільки вони містять коктейль факторів (розчинні фактори росту, цитокіни, гормони, екзосоми), що мають широкий спектр біологічної дії.

Спінальні ганглії є потенційним джерелом нейральных стовбурових клітин, оскільки вони містять клітини-похідні нервового гребеня, здатні диференціюватися в нейрони та різні субпопуляції гліальних клітин [10]. Раніше встановлено, що в умовах культивування з використанням фетальної телячої сироватки культура клітин зі спінальних гангліїв є збагаченою на сателітні гліальні клітини [11], які здійснюють структурну й трофічну підтримку нейронів, регулюють їх мікрооточення, виділяють гліотрансміттери та полегшують передачу сигналу. Крім того, сателітні гліальні клітини володіють властивостями прогені-

торних клітин та беруть участь у постійному та регенеративному нейрогенезі [10]. Встановлено, що КС від культур гліальних клітин збагачені на GDNF, NGF, BDNF, основний фактор росту фібробластів (bFGF), антиоксиданти та інші регуляторні білки [12, 13].

Використання КС від культури гліальних клітин має перспективи у підтримці нормального функціонування яєчників, особливо у період репродуктивного згасання. У зв'язку з цим, актуальним є проведення експериментальних досліджень у цьому напрямку.

Сучасні технології клітинного культивування включають кріоконсервування як необхідний етап, який дозволяє зберігати культури клітин протягом тривалого часу, сертифікувати їх, транспортувати й використовувати за необхідності. Однак вплив кріоконсервування на склад та біологічні властивості КС, отриманих від нейральных клітин, залишається невивченим.

Мета роботи — вивчення впливу кондиціонованих середовищ, отриманих від інтактної та кріоконсервованої культур клітин спінальних гангліїв, на морфофункціональні особливості яєчників, рівні статевих та гонадотропних гормонів у щурів різного репродуктивного віку.

## МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

В експериментах використовували білих безпородних самиць щурів віком 6 та 14 місяців, що у цього виду тварин відповідає репродуктивному віку (РВ) та пізньому репродуктивному віку (ПРВ) [14]. Усі експерименти на тваринах проводили відповідно до Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№ 3447-IV від 21.02.2006 р.) при дотриманні вимог Комітету з біоетики Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (ІПКіК НАНУ), узгоджених з положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986).

Моношарову культуру, яка на 80 % складалася з сателітних гліальних клітин, отримували зі спінальних гангліїв неона-

тальних поросят та кріоконсервували за методом Алі С. Г. та співавт. [11]. Клітини, отримані з гангліїв ферментативним методом, висівали у концентрації  $5 \times 10^5$  клітин/мл у пластикові чашки Петрі («SPL Life Sciences», Корея) та культивували при 37 °C в атмосфері 5 % CO<sub>2</sub> з використанням базового середовища (БС), яке містило  $\alpha$ -MEM («Biowest», Франція), антибіотики та 10 % фетальної телячої сироватки (ФТС, «BioSera», Франція). Кріоконсервування здійснювали з використанням кріозахисного розчину на основі  $\alpha$ -MEM з додаванням 25 % ФТС та 7,5 % кріопротектору диметилсульфоксиду (ДМСО, «AppliChem», Німеччина). У кожен кріопробірку («SPL LifeSciences», Корея) поміщали 1 мл клітинної суспензії з концентрацією  $5 \times 10^5$  клітин/мл та заморожували як описано у роботі [11]. Заморожені зраз-

ки зберігали у рідкому азоті. Відігрівання здійснювали на водяній бані при температурі 37 °С до зникнення твердої фази. Для видалення кріопротектору до суспензії клітин по краплях додавали 10-кратний об'єм БС та двічі відмивали шляхом центрифугування, після чого клітини поміщали у БС та культивували, як описано вище.

Кондиціоновані середовища від інтактної (ІКС) та кріоконсервованої культур (ККС) починали збирати через 7–9 діб культивування, коли клітинний ріст переходив до стаціонарної фази. КС збирали кожні три доби, порційно заморожували та зберігали при –18 °С. Загальний термін культивування, на протязі якого збирали ІКС та ККС, складав 28 діб. Оскільки для культивування клітин використовувалося БС з додаванням 10 % ФТС та антибіотиків, воно було використано в якості контролю.

Зібрані порції КС розморожували, об'єднували та фракціонували методом ультрафільтрації з використанням полієфісульфонової мембрани («Millipore», Німеччина). З огляду на те, що молекулярна маса нейротрофічних факторів знаходиться у межах від 13 до 30 кДа, було отримано фракції з молекулярною масою до 30 кДа.

Середовища (ІКС, ККС та БС) вводили щурам (старт введення — у фазі еструсу) по 0,2 мл внутрішньочеревно протягом

9 днів. Тварин забивали на 30–32 добу після закінчення введення, забирали кров для вимірювання гормонів та яєчники для гістологічного дослідження.

Для визначення фаз естрального циклу (ЕЦ) щоденно о 10-й годині ранку брали мазки з піхви щурів. За ЕЦ спостерігали на протязі 30 діб до та 30 діб після введення середовищ. Визначали середню кількість діб, які приходилися на фазу еструсу (ФЕ), та виражали у відсотках до загального періоду спостереження (30 діб).

Для гістологічних досліджень обидва яєчника фіксували у 10 %-му нейтральному формаліні, виготовляли серійні гістологічні зрізи та забарвлювали гематоксиліном/еозином за стандартною методикою. У гістологічних зрізах за допомогою світлового мікроскопа AmScore XYL-403 («AmScore», КНР) підраховували кількість фолікулів різного ступеню зрілості, атретичних фолікулів, жовтих тіл та кіст. Враховували лише фолікули з овоцитом, що запобігало дублюванню результатів підрахунку.

Визначення рівнів естрадіолу (Е<sub>2</sub>), прогестерону (ПГ), лютеїнізуючого гормону (ЛГ) та фолікулостимулюючого гормону (ФСГ) у сироватці крові щурів проводили методом ІФА з використанням тест-наборів виробництва ТОВ «Хема» (Київ, Україна) відповідно до інструкції.

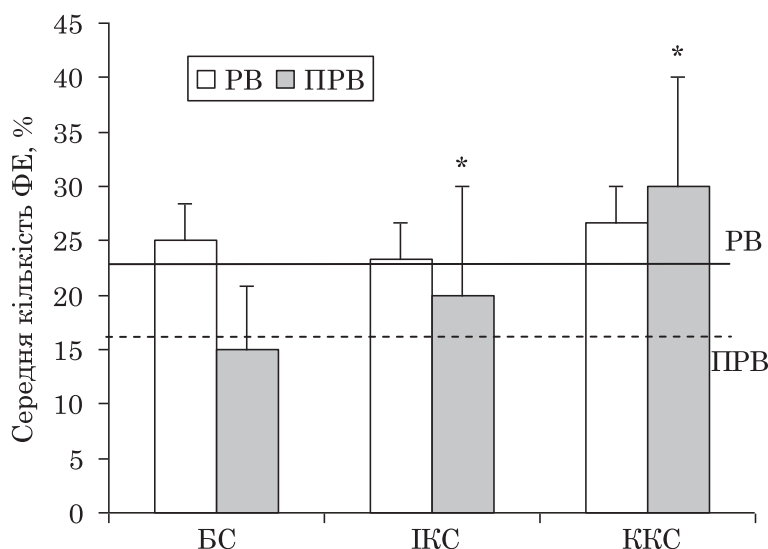


Рис. 1. Середня кількість фаз еструсу (ФЕ) у щурів різного віку після введення БС, ІКС та ККС. Лінії вказують рівень показника для кожної вікової групи до введення середовищ; дані представлені як Me ± IP.

\* — показник статистично значуще відрізняється від показника інтактних тварин відповідного віку,  $p < 0,05$ .

В експерименті були використані наступні групи щурів:

- 1) інтактні РВ (n = 10);
- 2) РВ з введенням БС (n = 9);
- 3) РВ з введенням ІКС (n = 10);
- 4) РВ з введенням ККС (n = 9);
- 5) інтактні ПРВ (n = 10);
- 6) ПРВ з введенням БС (n = 9);
- 7) ПРВ з введенням ІКС (n = 11);

8) ПРВ з введенням ККС (n = 10).

Результати представляли у вигляді  $Me \pm IP$  ( $Me$  — медіана,  $IP$  — інтерквартильний розмах, який дорівнював різниці між квартилями 3 і 1 порядку). Статистичну значущість відмінностей між групами оцінювали за допомогою непараметричного критерію Манна–Уїтні. Відмінності вважали статистично значущими при  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У результаті спостереження за тривалістю ЕЦ було визначено, що у 70 % інтактних тварин РВ цей показник складав у середньому 4 доби, тоді як у 75 % інтактних тварин ПРВ — 5 діб. Водночас у 60 % тварин ПРВ спостерігалось підвищення тривалості циклу до 6–7 діб за рахунок пролонгування фази дієструсу.

Після введення усіх середовищ (БС, ІКС та ККС) тваринам РВ відсоток ФЕ у структурі ЕЦ не змінювався (рис. 1). У тварин ПРВ з введенням ІКС та ККС відбувалося статистично значуще підвищення показника за досліджений період.

Яєчники інтактних щурів РВ мали нормальну гістологічну будову (рис. 2, а). У корковій частині яєчника добре розрізнялися фолікули різного ступеня зрілості та велика кількість функціональних та регресуючих жовтих тіл різного розміру. Крім того, виявлялися крупні атретичні фолікули з нерегулярною структурою гранульоз-

ного шару, утворенням «бісерної строки» (string of beads), руйнуванням гранульозних клітин яйценосного горбка, пікнозом гранульозних клітин, наявністю апоптичних тіл, дегенеративними змінами або фрагментацією овоциту. Маленькі атретичні фолікули мали неправильну форму, гранульозні клітини в них були відсутні, клітини теки заміщені стромальною тканиною.

Гістологічна будова яєчників щурів ПРВ мала схожі риси, однак характерною особливістю була наявність фолікулярних та лютеальних кіст (рис. 2, б). Частіше спостерігалися фолікулярні кісти різного розміру з тонкою стінкою, яка була сформована тонким фіброзним шаром зовні та плоскими фолікулярними клітинами зсередини. Рідше спостерігалися лютеальні кісти, стінка яких була сформована декількома шарами лютеальних клітин з вакуолізованою, оксифільною цитоплазмою, заповнені рідиною або кров'ю.



Рис. 2. Мікрофотографії гістологічних препаратів яєчників інтактних щурів:  
 А) РВ (у полі зору спостерігаються фолікули різного ступеня зрілості, функціональні та регресуючі жовті тіла);  
 Б) ПРВ (у полі зору спостерігаються функціональні та регресуючі жовті тіла, атретичні фолікули зі сплюсненням та руйнуванням шару гранульозних клітин, стрілка — фолікулярна кіста).

У тварин обох вікових груп, яким ввели середовища, не відбувалося кардинальних змін гістологічної будови. Однак візуально спостерігалось переважання крупних атретичних фолікулів на стадії швидкої дегенерації гранульозних клітин.

На гістологічних зрізах було підраховано кількість фолікулів гормонально незалежної (примордіальних і первинних фолікулів) та гормонально залежної (антральні фолікули й Граафові пухирці) стадій розвитку. Вікові зміни у інтраоваріальному пулі інтактних щурів ПРВ виражалися у значущому зменшенні кількості антральних фолікулів та жовтих тіл, а також підвищенні кількості кіст порівняно з тваринами РВ (табл. 1).

Введення БС щурам РВ не призводило до статистично значущих змін у кількості фолікулів усіх стадій розвитку, функціональних і регресуючих жовтих тіл. Після введення ІКС та ККС у тварин РВ спостерігалось статистично значуще зменшення сумарної кількості примордіальних і первинних фолікулів та підвищення кількості атретичних фолікулів в порівнянні з інтактним контролем.

Введення усіх середовищ тваринам ПРВ призводило до змін, подібних тим, які спостерігалися у тварин РВ: зменшення сумарної кількості примордіальних і первинних фолікулів та збільшення кількості атретичних фолікулів. Однак на відміну від тва-

рин РВ також відбувалося зниження пулу антральних фолікулів та кількості кіст.

Оскільки щури відносяться до тварин з дуже коротким ЕЦ, циклічне змінення рівню гонадотропних та статевих гормонів у них має певні особливості. Нами було вивчено рівні  $E_2$ , ЛГ, ЛГ і ФСГ у інтактних щурів РВ і ПРВ у залежності від фази ЕЦ (табл. 2). У тварин обох вікових груп встановлено фізіологічний профіль секреції з характерним підвищенням рівнів усіх досліджених гормонів у фазі проєструсу. За цих обставин статистично значущих відмінностей в рівнях досліджених гормонів у залежності від віку не було зафіксовано.

Відомо, що у самиць щурів з віком змінюється співвідношення між гонадотропними (ЛГ/ФСГ) та статевими ( $E_2$ /ЛГ) гормонами [15]. Нами також було встановлено значуще зниження у 4 рази співвідношення ЛГ/ФСГ у інтактних щурів ПРВ порівняно з щурами РВ (табл. 3).

Введення усіх середовищ не призводило до значущих змін досліджених співвідношень у щурів РВ. На відміну від цього, у щурів ПРВ відбувалося значуще підвищення показника ЛГ/ФСГ у 2,5 рази при введенні БС, у 6,5 рази при введенні ІКС та у 14 разів при введенні ККС.

До ознак репродуктивного згасання у щурів відносяться порушення естрального циклу; зменшення кількості фолікулів, що розвиваються, та жовтих тіл, наявність

Таблиця 1  
Кількісні гістологічні показники яєчників щурів різного віку після введення БС, ІКС та ККС

Показник	РВ				ПРВ			
	Інтактні	БС	ІКС	ККС	Інтактні	БС	ІКС	ККС
ПрФ + ПФ	24,0 ± 13,0	19,0 ± 11,7	11,0 ± 7,5	15,5 ± 9,5	23,5 ± 10,8	16,0 ± 5,5	16,5 ± 7,5	16,0 ± 12,0
АнФ	9,0 ± 3,0	8,2 ± 2,2	7,5 ± 4,5	7,0 ± 4,0	3,0 ± 2,0	2,0 ± 1,2	1,0 ± 1,0	2,0 ± 0,7
АтФ	12,0 ± 4,0	10,5 ± 6,5	17,0 ± 4,5	21,0 ± 5,8	12,0 ± 5,8	11,0 ± 5,5	21,5 ± 12,5	19,5 ± 3,0
ЖТ	23,0 ± 7,0	22,5 ± 12,0	19,0 ± 6,0	30,0 ± 4,5	18,5 ± 11,3	15,0 ± 6,8	16,5 ± 3,8	20,5 ± 10,5
Кісти	0,0 ± 1,0	0,5 ± 1,2	1,0 ± 0,5	0,0 ± 1,0	1,5 ± 3,2	0,5 ± 1,0	0,0 ± 1,7	1,0 ± 1,5

Примітки:

ПрФ + ПФ — сума примордіальних та первинних фолікулів, АнФ — антральні фолікули, АтФ — атретичні фолікули, ЖТ — жовті тіла; дані представлені як  $Me \pm IP$ ;

\* — показник статистично значуще відрізняється від інтактного контролю відповідного віку,  $p < 0,05$ ;

# — показник статистично значуще відрізняється від інтактного контролю РВ,  $p < 0,05$ .

Змінення рівню гонадотропних та статевих гормонів у інтактних щурів РВ та ПРВ у залежності від фази ЕЦ

ЕЦ	РВ				ПРВ			
	Е <sub>2</sub> , пг/мл	ПГ, нг/мл	ЛГ, МЕ/л	ФСГ, МЕ/л	Е <sub>2</sub> , пг/мл	ПГ, нг/мл	ЛГ, МЕ/л	ФСГ, МЕ/л
ФП	68,0 ± 7,5	27,6 ± 14,7	1,2 ± 1,9	40,2 ± 13,8	61,2 ± 14,9	34,2 ± 19,6	0,85 ± 0,22	34,8 ± 39,7
ФЕ	66,5 ± 10,2	10,5 ± 11,1	0,50 ± 0,40	2,3 ± 6,9	63,9 ± 9,5	15,9 ± 11,7	0,85 ± 0,17	5,6 ± 5,1
ФМ	62,6 ± 19,0	30,8 ± 10,2	0,45 ± 0,17	0,7 ± 1,0	59,8 ± 6,12	33,8 ± 28,2	0,31 ± 0,20	1,1 ± 1,37
ФД	69,3 ± 11,5	26,0 ± 18,9	0,30 ± 0,10	2,5 ± 1,4	65,3 ± 10,9	43,9 ± 22,1	0,40 ± 0,31	3,4 ± 3,1

Примітка:

ФП — фаза проеструсу, ФЕ — фаза еструсу, ФМ — фаза метаеструсу, ФД — фаза діеструсу; дані представлені як Ме ± ІР.

Співвідношення гонадотропних та статевих гормонів самиць щурів різного віку після введення БС, ІКС та ККС

Показник	РВ				ПРВ			
	Інтактні	БС	ІКС	ККС	Інтактні	БС	ІКС	ККС
Е <sub>2</sub> /ПГ	0,33 ± 0,24	0,19 ± 0,11	0,33 ± 0,04	0,53 ± 0,57	0,24 ± 0,37	0,29 ± 0,47	0,14 ± 0,06	0,17 ± 0,12
ЛГ/ФСГ	0,16 ± 0,26	0,14 ± 0,13	0,10 ± 0,22	0,29 ± 0,13	0,04 ± 0,02	0,11 ± 0,35	0,26 ± 1,18	0,57 ± 0,32

Примітки:

дані представлені як Ме ± ІР; співвідношення Е<sub>2</sub>/ПГ визначали після перерахунку рівнів гормонів у нмоль/л та представляли у експоненціальному форматі, де Е = 10<sup>-2</sup>;

\* — показник статистично значуще відрізняється від інтактного контролю відповідного віку, р < 0,05;

# — показник статистично значуще відрізняється від інтактного контролю РВ, р < 0,05.

фолікулярних кіст у яєчнику; зміна секреції статевих гормонів та гонадотропнів [15–17]. Зокрема було встановлено зниження пікових концентрацій ЛГ та ФСГ у фазі проеструсу у щурів та мишей старшого віку, що обумовлено зміною здатності гіпоталамо-гіпофізарної системи секретувати гонадотропіни у відповідь на фізіологічні стимули [17]. У наших експериментах вікові зміни у самиць щурів також включали значуще зменшення ФЕ у структурі ЕЦ, зменшення кількості антральних фолікулів та жовтих тіл у яєчниках, наявність кіст, зниження рівню ЛГ у фазі проеструсу, загальне зменшення співвідношення ЛГ/ФСГ.

У результаті виконання роботи нами було встановлено біологічні ефекти КС, отриманих як від інтактної, так і кріоконсервованої культури клітин зі спінальних гангліїв. Застосування обох середовищ зменшувало сумарну кількість примордіальних та первинних фолікулів у яєчнику

кач тварин обох вікових груп, що свідчить про стимулюючий вплив середовищ на вихід фолікулів з дормантного стану. Схожий ефект було встановлено нами раніше при застосуванні кріоекстракту, отриманому зі спінальних гангліїв [18]. Підвищення кількості атретичних фолікулів на цьому фоні свідчило, що в результаті активації примордіальних фолікулів та вступу їх на шлях подальшого розвитку, виникає надлишок антральних фолікулів, який пізніше піддається атрезії.

Вважається, що вступ примордіальних фолікулів у стадію подальшого розвитку є складно організованим процесом, який регулюється багатьма факторами активації та супресії. Важливе значення для цього має сигнальний шлях PI3K/AKT/mTOR [19], специфічні для яєчників фактори транскрипції та системні ростові фактори [20], зокрема нейротрофічні фактори [4, 5]. Результати наших досліджень свідчать

про можливість активації примордіальних фолікулів за рахунок нейротрофічних факторів, що містяться у КС, отриманих від культур гліальних клітин.

Зниження кількості антральних фолікулів у тварин пізнього віку встановлено раніше [21]. У наших експериментах теж було зафіксовано такий факт, причому введення КС не впливало на цей показник.

Присутність фолікулярних кіст у яєчниках щурів пізнього віку є досить поширеним явищем [15]. Вважається, що у таких щурів зрілі антральні фолікули не овулюють, але утворюють кісти внаслідок дисбалансу пролактину, ЛГ, андрогенів та зниження експресії рецепторів до гонадотропінів. Кількість кіст може збільшуватися з віком до тих пір, поки не розвинеться полікістоз яєчників, що приведе до стану константного еструсу, оскільки гранульозні клітини кіст продовжують секретувати естрадіол.

У наших дослідженнях кісти траплялися в яєчниках інтактних тварин ПРВ, хоча рівень естрадіолу значуще не відрізнявся від тварин РВ. Цікаво, що після введення середовищ тваринам цієї вікової групи спостерігалось зниження кількості кіст у щурів ПРВ. Можливо, що підвищення співвідношення ЛГ/ФСГ (за рахунок підвищення

рівню ЛГ) при введенні КС сприяло нормальній овуляції зрілих фолікулів. Крім того, раніше встановлено, що нейротрофічні фактори NGF та BDNF безпосередньо приймають участь у розвитку нормального процесу овуляції [3].

Таким чином, нейротрофічні фактори відіграють важливу роль у розвитку, функціонуванні та патології яєчників. Первинне складання примордіальних фолікулів індукується NGF, BDNF та NT4/5; їх активація – GDNF та NT3, стимуляція дозрівання ооциту та овуляція опосередковується NGF та BDNF [3–5]. Безумовно, інші ростові фактори, наприклад, комбінація епідермального та гепатоцитарного факторів росту (EGF та HGF) теж приймають участь у складній регуляції інтраоваріального пулу на протязі життя [22]. Взагалі, кондиціоновані середовища від культур стовбурових/прогеніторних клітин є цінним джерелом ростових факторів для відновлення функції яєчників, пригнічення їх передчасного старіння та запобігання патологічних змін ооцитів, асоційованих з віком [22, 23]. Кріоконсервування надає можливість зберігати культури клітин, у тому числі аутологічного походження, протягом тривалого часу та отримувати біологічно активне КС від потрібної культури «за запитом».

## ВИСНОВКИ

1. Кондиціоновані середовища, отримані від інтактною та кріоконсервованою культур гліальних клітин, мали стимулюючий вплив на вихід примордіальних фолікулів з дормантного стану в яєчниках тварин репродуктивного та пізнього репродуктивного віку. Водночас відбувалася перебудова інтраоваріального фолікулярного пулу зі зменшення кількості фолікулів гормоно-незалежних стадій розвитку (примордіальних та первинних) та підвищення кількості атретичних фолікулів.
2. Введення кондиціонованих середовищ, отриманих від інтактною та кріоконсерво-
- ваною культур гліальних клітин, сприяло підвищенню співвідношення ЛГ/ФСГ та пригніченню формування асоційованих з віком кіст у щурів пізнього репродуктивного віку.
3. Біологічний вплив на репродуктивну систему самиць щурів від кондиціонованого середовища кріоконсервованою культурі клітин був схожим з тим, що спостерігався у разі застосування середовища від інтактною культурі. Це дозволяє використовувати кріоконсервування для довготривалого зберігання культурі гліальних клітин та отримання кондиціонованого середовища за необхідності.

ЛІТЕРАТУРА  
(REFERENCES)

- Bellieni C. *J Family Reprod Health* 2016;10(3): 104-107.
- Findlay JK, Hutt KJ, Hickey M, Anderson RA *Biol Reprod* 2015;93(5): 111. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.115.133652>.
- Streiter S, Fisch B, Sabbah B, Ao A, et al. *Mol Human Reprod* 2016;22(1): 3-17. <https://doi.org/10.1093/molehr/gav057>.
- Kerr B, Garcia-Rudaz C, Dorfman M, et al. *Reproduction* 2009;138(1): 131-140. <https://doi.org/10.1530/REP-08-0474>.
- Nilsson E, Dole G, Skinner MK. *Reproduction* 2009;138(4): 697-707. <https://doi.org/10.1530/REP-09-0179>.
- Prokopyuk VYu, Karpenko VG, Shevchenko MV, et al. *Innov Biosyst Bioeng* 2020;4(3): 168-176. <https://doi.org/10.20535/ibb.2020.4.3.215215>.
- Teixeira FG, Carvalho MM, Sousa N, Salgado AJ. *Cell Mol Life Sci* 2013;70(20): 3871-3882. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1290-8>.
- Vizoso FJ, Eiro N, Cid S, et al. *Int J Mol Sci* 2017;18(9): 1852. <https://doi.org/10.3390/ijms18091852>.
- Gwam C, Mohammed N, Ma X. *Ann Transl Med* 2021;9(1): 70. <https://doi.org/10.21037/atm-20-5030>.
- Li HY, Say EH, Zhou XF. *Stem Cells* 2007;25(8): 2053-2065. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0080>.
- Ali SG, Moisjejeva NM, Bozhok GA. *Probl Cryobiol Cryomed* 2020;30(2): 158-168. <https://doi.org/10.15407/cryo30.02.158>.
- Walker MJ, Xu XM. *Brain Sci* 2018;8(6): 109. <https://doi.org/10.3390/brainsci8060109>.
- Ruiz C, Casarejos MJ, Gomez A, et al. *PLoS Curr* 2012;2(4): e4fbca54a2028b. <https://doi.org/10.1371/4fbca54a2028b>.
- Sengupta P. *Int J Prev Med* 2013;4(6): 624-630.
- Dixon D, Alison R, Bach U, et al. *J Toxicol Pathol* 2014;27(3-4): 1S-107S.
- Cruz G, Fernandois D, Paredes AH. *Reproduction* 2017;153(2): R59-R68. <https://doi.org/10.1530/REP-16-0117>.
- Bahougne T, Angelopoulou E, Jeandidier N, Simonneaux V. *Geroscience* 2020;42(1): 323-331. <https://doi.org/10.1007/s11357-019-00104-z>.
- Nesteruk HV, Kolot NV, Prochenko OS, et al. *Bull Probl Biol Med* 2020;4(158): 173-178. <https://doi.org/10.29254/2077-4214-2020-4-158-173-177>.
- Ford EA, Beckett EL, Roman SD, et al. *Reproduction* 2020;159(1): R15-R29. <https://doi.org/10.1530/REP-19-0201>.
- Chen Y, Yang W, Shi X, et al. *Front Cell Dev Biol* 2020;8: 575706. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.575706>.
- Steger RW, Peluso JJ. *Exp Aging Res* 1982;8(3-4): 203-208. <https://doi.org/10.1080/03610738208260367>.
- Ding C, Zou Q, Wang F, et al. *Stem Cell Res Ther* 2018;9(1): 55. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0781-9>.
- Buigues A, Marchante M, de Miguel-Gómez L, et al. *Am J Obstet Gynecol* 2021;225(1): 65.E1-65.E14. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2021.01.023>.

ВПЛИВ КОНДИЦІОНОВАНИХ СЕРЕДОВИЩ  
ВІД КУЛЬТУР ГЛІАЛЬНИХ КЛІТИН НА РЕПРОДУКТИВНУ СИСТЕМУ  
САМИЦЬ ЩУРІВ РІЗНОГО ВІКУНестерук Г. В.<sup>1,2</sup>, Алабедалькарім Н. М.<sup>1</sup>, Колот Н. В.<sup>2</sup>,  
Комаромі Н. А.<sup>2</sup>, Проценко О. С.<sup>2</sup>, Легач Є. І.<sup>1</sup><sup>1</sup> Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків, Україна,<sup>2</sup> Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, м. Харків, Україна  
[nesterukhanna@gmail.com](mailto:nesterukhanna@gmail.com)

Кондиціоновані середовища (КС) від культур стовбурових/прогеніторних клітин є цінним джерелом ростових факторів для відновлення функції яєчників, пригнічення їх передчасного старіння та запобігання патологічних змін ооцитів, асоційованих з віком. КС від культури гліальних клітин містить нейротрофічні фактори, які відіграють важливу роль у розвитку та функціонуванні жіночої репродуктивної системи. Передбачається, що нейротрофічні фактори можуть стимулювати вихід при-мордальних фолікулів з дормантного стану та вступ їх до фази подальшого росту. Кріоконсервування є необхідним етапом при роботі з культурами клітин, однак його вплив на склад та біологічні властивості КС залишається невивченим.

**Метою роботи** було вивчення впливу кондиціонованих середовищ, отриманих від інтактної та кріоконсервованої культур клітин зі спінальних гангліїв, на морфофункціональні особливості яєчників, рівні статевих та гонадотропних гормонів у щурів різного віку.

**Матеріали та методи.** Експерименти проводили на самицях віком 6 (репродуктивний вік, РВ) та 14 місяців (пізній репродуктивний вік, ПРВ). Моношарову культуру, в якій переважали гліальні клітин, отримували зі спінальних гангліїв неонатальних поросят. Кріоконсервували клітини у присутності 7,5 % кріопротектору диметилсульфоксиду. Кондиціоновані середовища від інтактної (ІКС)

та кріоконсервованої (ККС) культур фракціонували методом ультрафільтрації та отримували фракції до 30 кДа. Фракції ІКС та ККС вводили щурам внутрішньочеревно. Вивчали естральний цикл щурів, рівні гонадотропних та статевих гормонів у сироватці крові, гістологічну структуру яєчників та кількісний склад фолікулів.

**Результати.** ІКС та ККС мали стимулюючий вплив на вихід примордіальних фолікулів з дормантного стану у яєчниках тварин РВ та ПРВ, водночас відбувалася перебудова інтраоваріального фолікулярного пулу зі зменшенням кількості фолікулів гормоно-незалежних стадій розвитку (примордіальних та первинних) та підвищенням кількості атретичних фолікулів. Введення ІКС та КС сприяло підвищенню співвідношення ЛГ/ФСГ та пригніченню формування асоційованих з віком кіст у щурів ПРВ. Біологічний вплив ККС на репродуктивну систему самиць щурів був схожим з тим, що спостерігався у разі застосування ІКС.

**Висновки.** Встановлено активуючий вплив КС, отриманих від культури гліальних клітин, на фолікулярний профіль яєчників щурів пізнього репродуктивного віку. Кріоконсервування не призводить до втрати біологічних властивостей КС, тому може бути використане для довготривалого зберігання вищезазначеної культури та отримання КС за необхідністю.

Ключові слова: яєчники, статеві гормони, кондиціоноване середовище, культура гліальних клітин, нейротрофічні фактори, кріоконсервування.

### EFFECT OF CONDITIONED MEDIA FROM GLIAL CELL CULTURES ON THE REPRODUCTIVE SYSTEM OF FEMALE RATS OF DIFFERENT AGES

H. V. Nesteruk<sup>1,2</sup>, N. M. Alabedalkarim<sup>1</sup>, N. V. Kolot<sup>2</sup>,  
N. A. Komaromi<sup>2</sup>, O. S. Protsenko<sup>2</sup>, E. I. Legach<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine,  
Kharkiv, Ukraine;

<sup>2</sup> V. N. Karazin Kharkiv National University, Kharkiv, Ukraine  
nesterukhanna@gmail.com

Conditioned media (CM) from stem/progenitor cell cultures are a valuable source of growth factors for restoring ovarian function, inhibiting their premature aging, and preventing age-associated pathological changes in oocytes. CM from glial cell culture contains neurotrophic factors that play an important role in the development and functioning of the female reproductive system. It is assumed that neurotrophic factors can stimulate the exit of primordial follicles from the dormant state and entry into the phase of further growth. Cryopreservation is a necessary step when working with cell cultures; however, its effect on the composition and biological properties of CM remains unclear. **The aim** of the study was to study the effect of conditioned media obtained from intact and cryopreserved cultures of glial cells on the structural and functional characteristics of the ovaries, the levels of the sex and gonadotropic hormones in rats of different ages.

**Materials and Methods.** The experiments were carried out on females aged 6 (reproductive age, RA) and 14 months (late reproductive age, LRA). A monolayer culture in which glial cells predominated was obtained from the dorsal root ganglia of neonatal piglets. Cells were cryopreserved in the presence of 7.5 % cryoprotectant dimethyl sulfoxide. Conditioned media from intact (ICM) and cryopreserved (CCM) cultures were fractionated by ultrafiltration and fractions up to 30 kDa were obtained. The ICM and CCM fractions were injected into rats intraperitoneally. The estrous cycle, the levels of gonadotropic and sex hormones, the histological structure of the ovaries and the quantitative composition of the follicles were studied.

**Results.** ICM and CCM had a stimulating effect on the release of primordial follicles from the dormant state in the ovaries of RA and LRA animals, while the intraovarian follicular pool was rearranged with a decrease in the number of follicles of hormone-independent developmental stages (primordial and primary) and an increase in the number of atretic follicles. The introduction of ICM and CCM promoted an increase in the LH/FSH ratio and inhibition of the formation of age-associated cysts in LRA rats. The biological effect of CCM on the reproductive system of female rats was similar to that observed with the use of ICM. **Conclusions.** An activating effect of CM obtained from glial cell culture on the ovarian follicular profile of late reproductive aged rats was established. Cryopreservation does not lead to the loss of the biological properties of the CM, therefore, it can be used for long-term storage of the above culture and obtaining the CM if necessary.

**Key words:** ovaries, sex hormones, conditioned environment, glial cell culture, neurotrophic factors, cryopreservation.