

І. Б. МУСАТОВА<sup>1</sup>, В. В. ВОЛІНА<sup>1</sup>, О. В. ЧУБ<sup>1</sup>,  
В. Ю. ПРОКОПЮК<sup>1</sup>, О. С. ПРОКОПЮК<sup>1</sup>

## ВПЛИВ ІМПЛАНТАЦІЇ КРІОКОНСЕРВОВАНИХ ЕКСПЛАНТІВ ПЛАЦЕНТИ НА ПОВЕДІНКУ ТА МОРФОЛОГІЮ СТРУКТУР ГОЛОВНОГО МОЗКУ СТАРІЮЧИХ МИШЕЙ

Надійшла 12.03.16

Досліджували впливи імплантації кріоконсервованих експлантів плаценти (КЕП) на поведінкові феномени у дорослих молодих мишей (вік шість місяців) і мишей у перебігу старіння (пресенільний період онтогенезу, вік 12 місяців), а також на морфологічні характеристики структур головного мозку таких тварин. Виявилось, що імплантація КЕП істотно впливає на поведінку та адаптаційні можливості старіючих мишей, причому напрямок впливів залежить від статі піддослідних тварин. У самців спостерігалися прояви дезадаптації (зниження рухливості та дослідницької активності, а також зростання тривожності), тоді як у самиць зміни поведінкових проявів були протилежними (позитивними). Імплантація КЕП призводила до часткового нівелювання негативних зрушень морфологічних характеристик у моторній корі та гіпокампі тварин, що старіють. Отже, КЕП може слугувати джерелом природних сполук та клітинних елементів, необхідних для активації нейрогенезу, утворення та проліферації нейронів у ключових структурах головного мозку. У перспективі лікувальні засоби на основі КЕП можуть знайти застосування для корекції вікових порушень функцій ЦНС.

**КЛЮЧОВІ СЛОВА:** старіння, плацента, кріоконсервування, поведінка, кора головного мозку, гіпокамп, нейрогенез.

### ВСТУП

Протягом останнього десятиріччя все більше підтверджень знаходить гіпотеза, згідно з якою однією з основних причин порушень моторики та когнітивних функцій мозку при старінні є біохімічні і структурні зміни в тканинах певних церебральних структур – насамперед гіпокампа, сенсомоторної кори і стріатума [1, 2]. Процеси, що пов'язані зі старінням, призводять до зниження здатності до навчання, негативних модифікацій адаптаційних реакцій і змін структури поведінки [3, 4]. З віком розвиваються дегенераційні зміни в сірій речовині кори та кортикальних волоконних шляхах, послаблюється активність дофамінергічної системи і ви-

никає функціональний дисбаланс у сенсомоторних кортикальних зонах, гіпокампі та потиличній корі; натомість відмічається деяке компенсаторне посилення активності структур переднього мозку [5]. Вважається, що «згасання» процесів пластичності ЦНС, зумовлене дією епігенетичних факторів, може спричинити розвиток нейродегенеративних патологій [6]. Уповільнення постнатального («дорослого») нейрогенезу переважно в субвентрикулярній зоні мозку і зубчастій звивині проявляється як обмеження проліферації та подовження клітинного циклу; це супроводжується розладами когнітивних функцій і формування пам'яті [7–9].

Є певні підстави думати, що нейрогенез у зрілому мозку може бути реактивований за допомогою застосування певних фармакологічних препаратів та імплантації стовбурових клітин. Описані активаційні впливи антидепресантів та простратину на нейрогенез у зрілому гіпокампі [10, 11], а також позитивні ефекти внутрішньовенних ін'єкцій культури невральних прогеніторних клітин щодо пам'яті та когнітивних функцій у щурів після екс-

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

Ел. пошта: bhbyfq@gmail.com (І. Б. Мусатова);  
volina1003@gmail.com (В. В. Воліна);  
odoctor911@gmail.com (О. В. Чуб);  
prokoryuk@mail.ru (В. Ю. Прокопюк);  
osprokoryuk@mail.ru (О. С. Прокопюк).

периментальної ішемії мозку [12]. Встановлено, що новоутворені нейрони залучаються до функціонування нейронних мереж гіпокампа (в першу чергу в зубчастій звивині) і це позитивно впливає на процеси навчання, формування пам'яті та емоційну поведінку [13]. Виявлено, що інтенсивність «дорослого» нейрогенезу істотно пов'язана з експресією нейротрофічних чинників, зокрема BDNF та GDNF [14]. Недостатній рівень ростових і нейротрофічних чинників значно обмежує цей процес [12, 15]. Згідно із сучасними уявленнями, нейротрофіни відіграють важливу роль у функціонуванні нейронних зв'язків у головному мозку, в разі впливів пошкоджуючих факторів сприяючи посиленню репаративного білкового синтезу, утворенню нейронів *de novo*, збереженню життєздатності церебральних клітин та підтриманню високого метаболічного рівня в структурах ЦНС [16, 17].

Можливим джерелом біологічно активних речовин і стовбурових клітин, які потенційно здатні впливати на нейрогенез, є біооб'єкти плацентарного походження (БПП). Плацента ссавців не тільки забезпечує розвиток плоду, реалізуючи відповідні метаболічні, імунні та гормональні функції; під дією плацентарних факторів підвищується стійкість тканин до гіпоксії та стимулюються процеси репарації [18–20]. Ефективність застосування певних БПП у лікуванні різноманітних захворювань зумовила вже в теперішній час досить широкий спектр їх клінічного застосування, що призвело до формування відповідного напрямку клітинної терапії [21–23]. Успіхи клітинної терапії багато в чому завдячують розробці успішних технологій низькотемпературного консервування безклітинних, клітинних і тканинних біоматеріалів. Це дозволило створити певний запас безпечних стандартизованих препаратів, у тому числі отриманих з плаценти людини [24]. В Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України розроблено методики кріоконсервування, котрі дозволяють тривалий час зберігати біологічно активні речовини, та створено колекцію кріоконсервованих експлантів плаценти (КЕП). У перебігу попередніх досліджень було виявлено, що дія імплантованого КЕП на організм тварини характеризується значною тривалістю і є подібною до спостережуваної при застосуванні стовбурових клітин [25, 26].

Зважаючи на можливу дію плацентарних факторів на функціонування та адаптаційні можливості ЦНС, ми провели дослідження впливів імплантації КЕП на поведінку мишей, котрі знаходилися на

пізньому відрізку онтогенезу, та на морфологічні характеристики церебральних структур таких тварин. Групою порівняння були молоді дорослі миші.

## МЕТОДИКА

Досліди було виконано на шести- та 12-місячних білих мишах лінії Balb/c обох статей ( $n = 60$ ). Згідно з прийнятою класифікацією вікових груп лабораторних тварин, шестимісячні миші вважаються дорослими молодими, а 12-місячні – тваринами пресенільного віку [27, 28]. Беручи в експеримент 12-місячних мишей, ми вважали за доцільне проводити дослідження саме на тваринах, у котрих вже йде розвиток сенільних змін, але процес старіння ще не досяг максимуму. Миші були розділені на шість груп по 10 тварин у кожній – дві групи позитивного контролю (шестимісячні самиці та самці – 6f та 6m), дві групи негативного контролю (12-місячні самиці та самці – 12f та 12m) та дві групи мишей з імплантацією КЕП (12-місячні самиці та самці – 12f+КЕП та 12m+КЕП). КЕП отримували та піддавали кріоконсервуванню за раніше розробленим методом [26, 29]. Розмороження виконували безпосередньо перед імплантацією, нагріваючи матеріал на водяній бані при температурі 37–40 °С. Розморожені КЕП протягом 10 хв тричі відмивали від кріопротекторів у живильному середовищі DMEM та фрагментували. Імплантацію здійснювали мишам у шести-, дев'яти- та 12-місячному віці, вводячи внутрішньом'язово фрагментований КЕП шприцом із товстою голкою в дозі 10 мг на тварину [27]. Впродовж експерименту тварини знаходилися в умовах природного освітлення та отримували стандартне для цього виду тварин харчування при питному режимі *ad libitum*.

Дослідження впливу імплантації КЕП на поведінку дорослих та старіючих мишей проводили з використанням широко розповсюджених методик [28–32]. У перебігу тестування у «відкритому полі» оцінювали інтенсивність горизонтальної (локомоторної) активності відповідно до кількості квадратів арени, відвіданих у межах тест-періоду, інтенсивність вертикальної (орієнтувально-дослідницької) активності згідно з кількістю стійок на задніх кінцівках та кількістю епізодів грумінгу («умивань»). Можливі анксиолітичні/анксиогенні ефекти імплантації КЕП оцінювали за поведінкою тварин у піднятому хрестоподібному лабіринті, вимірюючи сумарний час перебування піддослідної

тварини в закритих рукавах цього лабіринту протягом тест-періоду. Визначали також зоосоціальну активність у трикамерному тесті згідно з часом, проведеним піддослідною мишею з особиною тієї ж самої або іншої статі. Всі тестування проводили в один і той самий час доби, періоди спостереження складали 5 хв.

Після проведення поведінкових тестів тварин наркотизували і декапітували; головний мозок швидко вилучали та фіксували у 10 %-вому розчині нейтрального формальдегіду. Зрізи структур мозку забарвлювали гематоксиліном та еозином за стандартною методикою [33]. Використовували тринкулярний мікроскоп із фото/відеовиходом XSP-139TP («JNOEC», Японія–Китай), цифрову камеру Sigeta UCMOS 3100 (Китай) та програмне забезпечення «TourView 3.7».

Статистичну обробку числових результатів проводили із застосуванням парних порівнянь за критерієм Ст'юдента (програмне забезпечення «Past V. 3.15»).

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Як вже згадувалося, для дослідження впливу імплантації КЕП на поведінку мишей проводили тест «відкритого поля», а також використовували тестування в піднятому хрестоподібному лабіринті. Зоосоціальну активність тварин тестували в контактах із особиною тієї ж самої або іншої статі.

Відомо, що стійкість ЦНС до несприятливих впливів пов'язана з вихідним рівнем емоційності, а також проявляється в показниках рухової та пошукової активності тварин [34, 35]. У тесті «відкритого поля» стрес новизни часто зумовлює певну інтенсифікацію орієнтувально-дослідницької поведінки, але остання може і пригнічуватися в разі високого рівня тривожності.

Згідно з отриманими результатами, у старіючих мишей (особин пресенільного віку) обох статей (групи 12f і 12m) показник локомоторної активності (середня кількість відвіданих квадратів арени «відкритого поля») не демонстрував вірогідних відмінностей від аналогічного показника у молодих тварин (групи 6f та 6m; рис. 1, А). Такі відмінності, проте, спостерігались у показників вертикальної активності та грумінгу. Кількість стійок у самців пресенільного віку у порівнянні з такою в групі 6m була істотно (майже вдвічі) меншою (Б), тоді як кількість актів грумінгу – значно більшою – майже в три рази (В). Посилення умивання, або грумінгу, як форма активності, асоційованої з емоційним станом, часто спостерігається при новизні середовища і може бути не пов'язане прямо із забрудненням хутра тварин [36]. Збільшення частоти грумінгу в структурі поведінки з паралельним зниженням частоти орієнтувально-дослідницьких феноменів у старіючих мишей вказує на певне зміщення поведінкової активності, вірогідно, в результаті конфлікту мотивацій страху і потягу до дослідження.

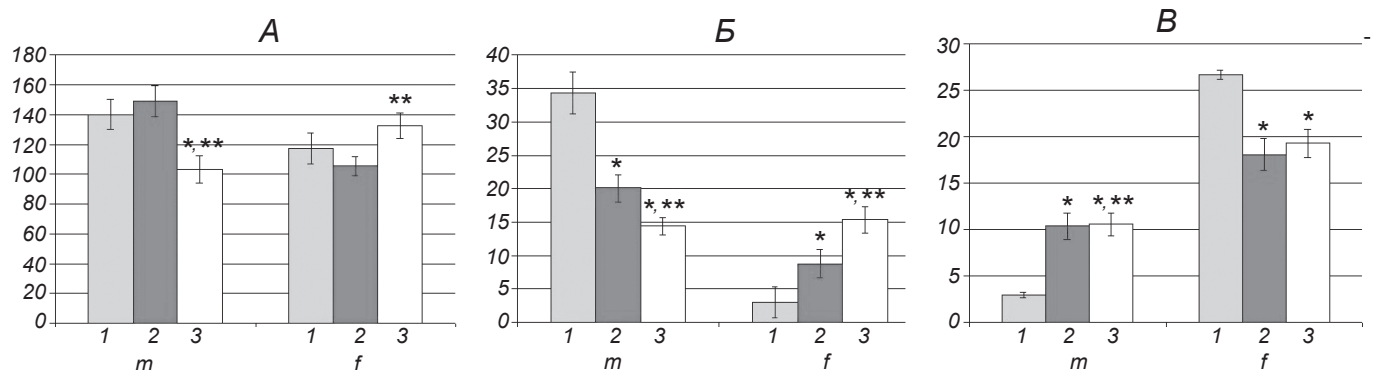


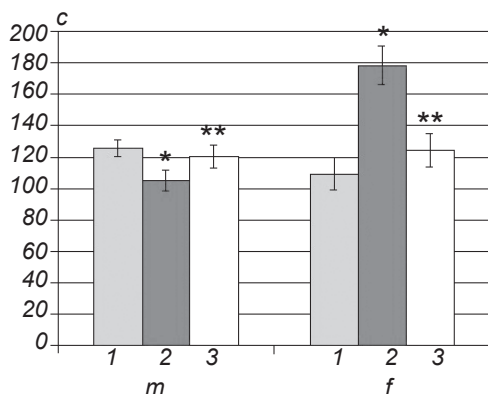
Рис. 1. Результати тестування мишей у «відкритому полі».

А – кількість перетнутих квадратів; Б – кількість вертикальних стійок; В – кількість актів грумінгу в межах періоду спостереження. *m* та *f* – показники у самців та самиць відповідно; 1–3 – показники у молодих дорослих мишей (групи 6m та 6f), мишей пресенільного віку (групи 12m та 12f) та мишей пресенільного віку, котрим імплантували кріоекспланти плаценти (КЕП; групи 12m+КЕП та 12f+КЕП) відповідно. Наведені середньогрупові значення та похибки середнього. Однією зірочкою позначені випадки вірогідної відмінності показників у групах старіючих мишей з імплантацією КЕП або без неї від груп 6m та 6f, двома зірочками – випадки міжгрупової різниці при порівнянні груп старіючих мишей з імплантацією КЕП із відповідними групами без такої імплантації з  $P < 0.05$ .

У самиць пресенільного віку (12f), навпаки, вертикальна моторна активність у порівнянні з такою у молодих самиць (6f) була вірогідно інтенсивнішою (рис. 1, *Б*), а кількість актів грумінгу – істотно меншою (*В*). Іншими словами, у старіючих самиць мишей спостерігався помітно більший потяг до дослідницької поведінки в умовах стресу новизни, менш обмежений емоцією страху. При цьому треба згадати, що у молодих мишей самці (6m) демонстрували драматично більшу (в декілька разів) схильність до орієнтувально-дослідницької поведінки, ніж самиці того ж самого віку (6f).

Піднятий хрестоподібний лабіринт зазвичай використовується для оцінки дії анксиолітиків/анксиогенів на поведінку тварин [37]; результати цього тесту відображають ступінь тривожності та здатності тварини адаптуватися до стресу. Наші спостереження показали, що самці мишей пресенільного віку (12m) проводили в закритих рукавах хрестоподібного лабіринту вірогідно менше часу ніж молоді тварини (рис. 2). Гальмування механізмів тривоги підвищує інтенсивність дослідницької поведінки, що проявляється в більшій тривалості перебування у відкритих зонах лабіринту [38]. Самиці ж віком 12 місяців (12f) проводили значно більше часу в закритих сегментах хрестоподібного лабіринту, ніж молоді дорослі самиці (6f). Такий факт є свідомством підвищеної чутливості ЦНС старіючих самиць до стресорних чинників та помітного підвищення рівня тривожності у таких тварин.

Результати реєстрації зоосоціальної активності мишей у трикамерному тесті показали, що час, проведений старіючими самцями (12m) у контакті з одно- та різностатевими особинами, є порівняно



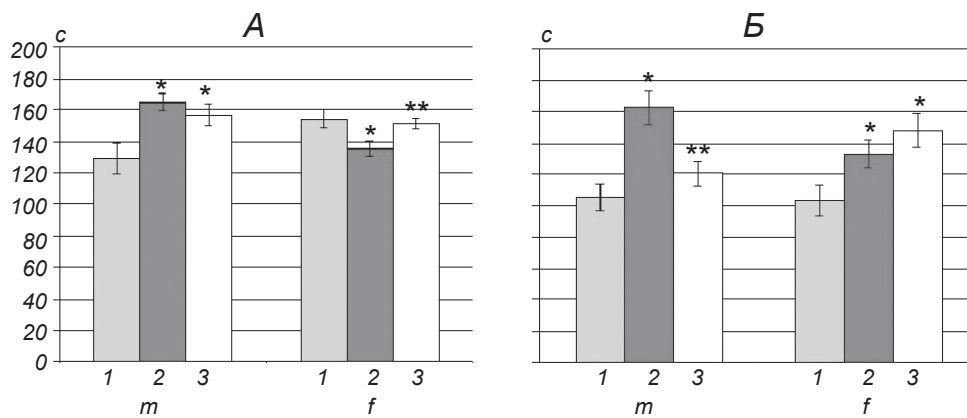
**Рис. 2.** Результати тестування мишей у піднятому хрестоподібному лабіринті. По вертикалі – час (с), проведений у закритих рукавах лабіринту. Позначення ті ж самі, що й на рис. 1.

більшим, ніж аналогічні індекси у молодих самців (6m). У самиць мишей пресенільного віку показник зоосоціальної активності в тестуванні з одностатевою твариною був вірогідно меншим, а відповідний індекс при контакті з різностатевою особиною – помітно більшим, ніж у молодих дорослих самиць (6f; рис. 3, *А, Б*). У цілому ж отримані дані свідчать про досить високий рівень зоосоціальної активності та значну збереженість статевої поведінки у мишей обох статей на дослідженому етапі онтогенезу.

Отже, наші спостереження вказували на помітні зміни структури поведінки піддослідних мишей при нормальному старінні в нормі. Поведінка мишей пресенільного віку порівняно з такою молодих тварин також демонструвала певні відмінності, залежні від статі. Серед найбільш помітних змін поведінки мишей при старінні слід особливо відзначити пригнічення орієнтувально-дослідницької поведінки (вертикальної активності) та посилення грумінгу у старіючих самців. Такі зрушення, вірогідно, пов'язані з дезорієнтацією в незнайомих умовах (тест «відкритого поля»). Слід також, мабуть, підкреслити значне зростання рівня тривожності у самиць пресенільного віку.

Зараз велику увагу в дослідженнях порушень пам'яті, когнітивних здібностей та поведінки при старінні приділяють пошуку хімічних агентів та природних сполук або їх похідних, які б сприяли відновленню неврологічного статусу, зменшенню неврологічного дефіциту та покращенню пам'яті. Плацентарні біопрепарати є джерелом цитокінів, ростових та нейротрофічних чинників; деякі з них вміщують стовбурові клітини [39]. Біологічно активні речовини плаценти, відіграючи захисну або нейротрофічну роль, здатні активувати синтез білків та антиоксидантні реакції, інгібувати апоптоз [20, 40, 41]. Тому при імплантації КЕП в організм старіючих (12-місячних) піддослідних мишей ми очікували позитивних впливів на здатність ЦНС тварин до адаптації в умовах стресу, на поведінкові реакції та морфологічні характеристики структур головного мозку.

Результати наших тестів показали, що імплантація КЕП самицям мишей пресенільного віку (12f) зумовлювала помітне посилення дослідницької поведінки та локомоції. Ставали вірогідно більшими як горизонтальна, так і вертикальна (майже вдвічі) форми рухової активності порівняно з відповідними показниками в групах як старіючих, так і молодих тварин (12f та 6f), не підданих імплантації (рис. 1, *А, Б*). Відчутно зростала також зоосоціаль-



Р и с. 3. Результати тестування зоосоціальної поведінки мишей.

По вертикалі – час (с), проведений тестованою особиною з особиною тієї ж самої (А) та протилежної (Б) статі. Позначення ті ж самі, що й на рис. 1 та 2.

на активність при тестуванні контактів як із одностатевою, так і з різностатевою особиною (рис. 3). Ставав істотно меншим (майже на 40 %) час, проведений у закритих рукавах хрестоподібного лабіринту, що свідчило про зменшення рівня тривожності (рис. 2).

Імплантація КЕП самцям пресенільного віку (12m), на відміну від описаного вище, зумовлювала помітне зниження вертикальної та горизонтальної моторної активності порівняно з аналогічними індексами у молодих та старіючих самців, котрим КЕП не імплантували; кількість актів грумінгу майже не змінювалася (рис. 1). Результати відповідних тестів свідчили про певне зниження зоосоціальної активності, особливо в контактах із особинами протилежної статі, та деяке збільшення рівня тривожності у самців. Відзначені зміни поведінки, вірогідно, слід інтерпретувати як певні прояви дезадаптації тварин цієї групи після імплантації КЕП; очевидними були також негативні зрушення у самцях пресенільного віку в емоційній сфері.

Оскільки є підстави вважати, що вікові порушення когнітивних процесів значною мірою асоційовані зі змінами в гіпокампі – структурі головного мозку, найтісніше пов'язаній із формуванням пам'яті, мотивацій та стратегії поведінки, а також у корі великих півкуль, ми піддали морфологічному дослідженню ділянки моторної кори та зубчастої звивини амонової рога гіпокампа. Нижче описані лише якісні відмінності морфологічних характеристик, котрі спостерігалися; кількісні відмінності можуть стати об'єктом спеціального дослідження.

Гістологічне дослідження головного мозку шестимісячних мишей (молодих дорослих тварин)

дало матеріал для співставлення структурних характеристик вказаних вище регіонів ЦНС із морфологічними картинами, характерними для тварин у пресенільному періоді онтогенезу (12 місяців). У старіючих мишей у помітній частці пірамідних нейронів гіпокампа та відповідних шарів моторної кори відзначались явні дегенераційні зміни різної інтенсивності – від незначного помутніння цитоплазми до втрати ядерця, істотного підвищення гетерогенності хроматину, зниження оптичної щільності цитоплазми, помітного зменшення розмірів клітин, появи в ядрах нейронів двох ядерця. Ті або інші зрушення могли спостерігатися при відсутності інших морфологічних змін. Значна частина нейронів мала бути віднесена до гіпохромних одиниць.

На оглядових зображеннях (при малому збільшенні) зрізів структур гіпокампа та моторної кори як самців, так і самоць мишей пресенільного віку була очевидною значно менша кількість/щільність клітинних елементів порівняно з аналогічними показниками у молодих тварин (порівняйте рис. 4 та 5). В моторній корі старіючих мишей межі між шарами були істотно нівельованими (рис. 5, А). Шар пірамідних клітин у зубчастій звивині гіпокампа був помітно тоншим, ніж у молодих тварин (Б). Отже, негативні структурні зміни в моторній корі та структурах гіпокампа у старіючих мишей були виражені досить яскраво.

При гістологічному дослідженні аналогічних структур 12-місячних мишей, яким були імплантовані КЕП, спостерігалися помітні позитивні зміни. Чисельність/щільність пірамідних нейронів у відповідних шарах моторної кори та таких нейронів у

зубчастій звивині візуально значною мірою відновлювалася (рис. 6). У перебігу дослідження окремих нейронів слід було відзначити зменшення кількості гіпохромних одиниць та клітин із вираженими дегенеративними змінами; відносна кількість нейронів малих розмірів також виглядала меншою. Шар пірамідних клітин у зубчастій звивині гіпокампа виглядав майже подібним до такого у молодих мишей (Б). Візуально більша кількість пірамідних нейронів у гіпокампі, вірогідно, свідчила про реак-

тивацію процесу нейрогенезу. Слід відзначити, що позитивні зміни в моторній корі та гіпокампі після імплантації КЕП спостерігались у дещо більшій мірі у мишей-самиць.

Таким чином, згідно з нашими результатами, імплантація КЕП мишам пресенільного віку обох статей позитивно впливає на морфологічні характеристики гіпокампа та моторної кори. Виглядає вірогідним, що біологічно активні речовини в складі КЕП, діючи комплексно, природним чином стимулюють «дорослий» нейрогенез. Такими речовинами, зокрема, можуть бути нейротрофічні чинники та нейротрофоподібні агенти, що посилюють репаративний синтез білків [42].

Впливи імплантації КЕП на зоосоціальну поведінку, орієнтувально-дослідницьку активність та здатність до адаптації щодо стресорних чинників виявилися значною мірою протилежними у самців та самиць старіючих мишей. У самиць усі відповідні показники значною мірою покращувалися, тоді як у самців зміни були в основному негативними. Вірогідно, такі відмінності в поведінці можуть бути пов'язані з впливом жіночих статевих гормонів, наявних у складі КЕП. Крім того, на реалізацію поведінкових феноменів можуть також впливати біоактивні пептиди, присутні в КЕП, які здатні включатися в нейромедіаторні системи, по-різному модулюючи нейрохімічні процеси у самців і самиць [43, 44].

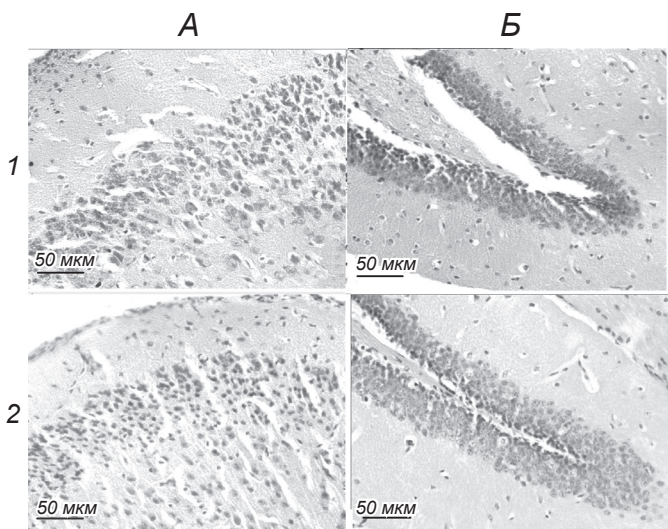


Рис. 4. Мікрофотографії зрізів моторної кори (А) та зубчастої звивини гіпокампа (Б) шестимісячних самців (1) та самиць (2) мишей.

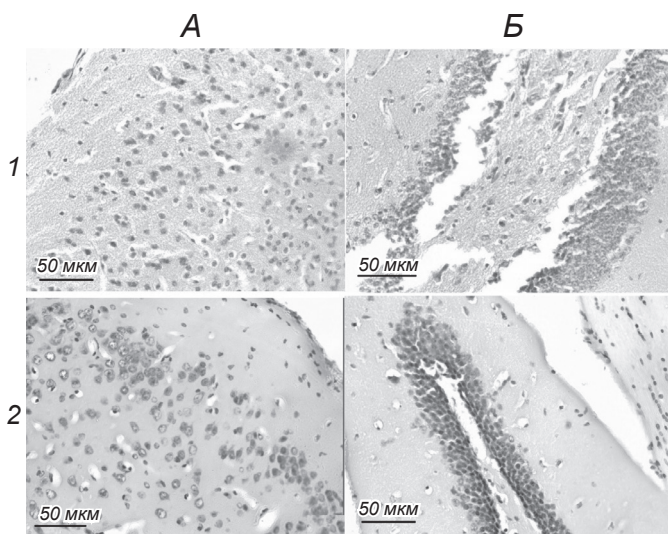


Рис. 5. Мікрофотографії зрізів моторної кори (А) та зубчастої звивини гіпокампа (Б) 12-місячних самців (1) та самиць (2) мишей.

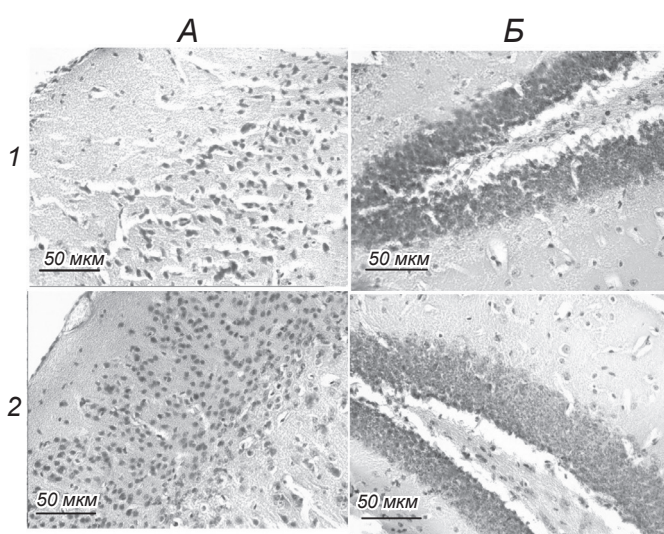


Рис. 6. Мікрофотографії зрізів моторної кори (А) та зубчастої звивини гіпокампа (Б) 12-місячних самців (1) та самиць (2) мишей, котрим було імплантовано кріоконсервовані експланти плаценти (КЕП).

Таким чином, отримані нами результати дають підстави вважати, що імплантатія експлантів плаценти, забезпечуючи надходження в організм плацентарних сполук, забезпечує певні геропротекторні ефекти, попереджаючи вікові зміни у тварин, що знаходяться в періоді пізнього онтогенезу. Зокрема, такі ефекти проявляються в змінах поведінки старіючих мишей, причому напрямок відповідних впливів значною мірою залежить від статі піддослідних тварин. Стимулююча дія біологічно активних складових імплантованих КЕП проявляється і в змінах морфологічних характеристик ключових структур головного мозку, найтісніше пов'язаних із регуляцією моторної поведінки та формуванням пам'яті, – гіпокампа та моторної кори. Негативні альтерації клітин цих структур, пов'язані зі старінням, певною мірою нівелюються. Отже, імплантатія КЕП, котрі є джерелом природних сполук, необхідних для активації нейрогенезу та проліферації нейронів, може бути застосована для корекції вікових порушень функцій ЦНС. Ще раз підкреслимо, що позитивні ефекти імплантатії КЕП демонструють виражену гендерну специфіку.

Усі стадії дослідження відповідали положенням Європейської Конвенції про захист тварин, котрі використовуються в експериментах (86/609 ЄЕС, Страсбург), і нормовані Комітетом з біоетики Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України.

Автори роботи – І. Б. Мусатова, В. В. Воліна, О. В. Чуб, В. Ю. Прокопюк та О. С. Прокопюк – підтверджують відсутність будь-яких конфліктів щодо комерційних або фінансових відносин, відносин з організаціями або особами, котрі будь-яким чином могли бути пов'язані з дослідженням, а також взаємовідносин співавторів статті.

## СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. H. W. Mahncke, A. Bronstone, and M. M. Merzenich, "Brain plasticity and functional losses in the aged: scientific bases for a novel intervention," *Prog. Brain Res.*, **157**, 81-109 (2006).
2. L. A. Mongiat and A. F. Schinder, "Adult neurogenesis and the plasticity of the dentate gyrus network," *Eur. J. Neurosci.*, **33**, No. 6, 1055-1061 (2011).
3. E. L. Glisky "Changes in cognitive function in human aging," in: *Brain Aging: Models, Methods, and Mechanisms*, D. R. Riddle (ed.), CRC Press/Taylor & Francis, Boca Raton, Florida (2007), <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1834/>
4. Н. В. Анисимов, *Молекулярные и физиологические механизмы старения*, Т. 1, Наука, СПб. (2008).
5. J. O. Goh and D. C. Park, "Neuroplasticity and cognitive aging: the scaffolding theory of aging and cognition," *Restorat. Neurol. Neurosci.*, **27**, No. 5, 391-403 (2009).
6. M. S. Penner, T. L. Roth, C. Barnes, and J. D. Sweatt, "An epigenetic hypothesis of aging-related cognitive dysfunction," *Front. Aging Neurosci.*, **2**, 9-11 (2010).
7. R. Coras, F. A. Siebzehnrubl, E. Pauli, et al., "Low proliferation capacities of adult hippocampal stem cells correlate with memory dysfunction in humans," *Brain*, **133**, 3359-3372 (2010).
8. E. Drapeau and D. Nora Arous, "Stem cell review series: role of neurogenesis in age-related memory disorders," *Aging Cell*, **7**, No. 4, 569-589 (2008).
9. S. Nikolova, S. M. Stark, and C. E. Stark, "3T hippocampal glutamate-glutamine complex reflects verbal memory decline in aging," *Neurobiol. Aging*, **54**, 103-111 (2017).
10. J. E. Malberg, A. J. Eisch, E. J. Nestler, and R. S. Duman, "Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus," *J. Neurosci.*, **20**, 9104-9110 (2000).
11. N. Geribaldi-Doldan, E. Flores-Giubi, M. Murillo-Carretero, et al., "12-deoxyphorbols promote adult neurogenesis by inducing neural progenitor cell proliferation via PKC activation," *Int. J. Neuropsychopharmacol.*, **19**, No. 1, 1-14 (2016).
12. N. Mochizuki, Y. Moriyama, N. Takagi, et al., "Intravenous injection of neural progenitor cells improves cerebral ischemia-induced learning dysfunction," *Biol. Pharm. Bull.*, **34**, No. 2, 260-265 (2011).
13. A. S. Hill, A. Sahay, and R. Hen, "Increasing adult hippocampal neurogenesis is sufficient to reduce anxiety and depression-like behaviors," *Neuropsychopharmacology*, **40**, No. 10, 2368-2378 (2015).
14. М. В. Ведунова, Т. А. Сахарнова, Е. В. Митрошина и др., "Антигипоксические и нейропротективные свойства нейротрофических факторов BDNF и GDNF при гипоксии *in vitro* и *in vivo*", *Соврем. технологии в медицине*, **6**, № 4, 1-10 (2014).
15. M. Nibuya, S. Morinobu, and R. S. Duman, "Regulation of BDNF and trkB mRNA in rat brain by chronic electroconvulsive seizure and antidepressant drug treatments," *J. Neurosci.*, **15**, No. 11, 7539-7547 (1995).
16. N. D. Bull and P. F. Bartlett, "The adult mouse hippocampal progenitor is neurogenic but not a stem cell," *J. Neurosci.*, **25**, No. 47, 10815-10821 (2005).
17. J. Chen and R. Shi, "Current advances in neurotrauma research: diagnosis, neuroprotection, and neurorepair," *Neural. Regenerat. Res.*, **9**, No. 11, 1093-1095 (2014).
18. F. Colleoni, A. J. Morash, T. Ashmore, et al., "Cryopreservation of placental biopsies for mitochondrial respiratory analysis," *Placenta*, **33**, No. 2, 122-123 (2012).
19. A. Garrod, G. Batra, I. Ptacek, et al., "Duration and method of tissue storage alters placental morphology – implications for clinical and research practice," *Placenta*, **34**, No. 11, 1116-1119 (2013).
20. C. Pipino, P. Shangaris, E. Resca, et al., "Placenta as a reservoir of stem cells: an underutilized resource," *Br. Med. Bull.*, **105**, 43-68 (2013).
21. Т. А. Астрелина, А. Е. Гомзяков, И. В. Кобзева и др., "Оценка качества и безопасности применения криоконсервированных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток плаценты в клинической практике", *Клеточ. трансплантация и тканевая инженерия*, **8**, № 4, 82-87 (2013).

22. D. Pogozhykh, V. Prokopyuk, O. Pogozhykh, et al., "Influence of factors of cryopreservation and hypothermic storage on survival and functional parameters of multipotent stromal cells of placental origin," *PLoS One*, **10**, No. 10, 1-16 (2015).
23. М. Д. Василюк, А. Г. Шевчук, Є. І. Романишин та ін., "Трансплантація кріоплацентарних тканин в лікуванні та попередженні виникнення синдрому діабетичної стопи", *Трансплантологія*, **4**, № 1, 134-135 (2003).
24. V. Yu. Prokopyuk, O. V. Falko., I. B. Musatova, et al., "Low temperature preservation and storage of placental biological derivatives," *Probl. Cryobiol. Cryomed.*, **25**, No. 4, 291-310 (2015).
25. N. O. Schevchenko, K. V. Somova, V. V. Volina, et al., "Dynamics of activity and duration of functioning of cryopreserved cryoextract, placental cells and fragments in the organism of experimental animals," *Morphologia*, **10**, No. 2, 93-98 (2016).
26. V. Yu. Prokopyuk, O. S. Prokopyuk, I. B. Musatova, et al., "Safety of placental, umbilical cord and fetal membrane explants after cryopreservation," *Cell Organ Transplantol.*, **3**, No. 1, 34-38 (2015).
27. *Доклінічні дослідження лікарських засобів*, О. В. Стефанов (ред.), Видавничий дім „Авіценна”, Київ (2001).
28. В. И. Донцов, *Экспериментальная геронтология: методы изучения старения*, Альтекс, Москва (2011).
29. І. Б. Мусатова, О. С. Прокопюк, В. В. Волина, В. Ю. Прокопюк, "Создание криозащитных сред для сохранения эксплантов ткани плаценты", *Biotechnol. Acta*, **6**, № 6, 132-138 (2013).
30. Т. А. Воронина, С. Б. Середенин, "Экспериментальное изучение препаратов с транквилизирующим (анксиолитическим) действием: методические рекомендации", *Ведомости фармакол. ком. МЗ РФ*, № 2, 19-25 (1998).
31. M. Faizi, P. L. Bader, N. Saw, et al., "Thy1-hAPP<sup>Lond/Swe+</sup> mouse model of Alzheimer's disease displays broad behavioral deficits in sensorimotor, cognitive and social function," *Brain Behav.*, **2**, No. 2, 142-154 (2012).
32. *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience*, J. J. Buccafusco (ed.), CRC Press LLC, Boca Raton, Florida (2001), <https://edisciplinas.usp.br/mod/resource/view.php?id=1101062>
33. Д. Э. Коржевский, А. В. Гиляров, *Основы гистологической техники. Практическое руководство*, Спецлит, СПб. (2010).
34. Д. Ф. Августинович, И. Л. Коваленко, "Формирование патологии поведения у самок мышей линии C57BL/6J под влиянием длительного психоэмоционального воздействия", *Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова*, **90**, № 11, 1324-1336 (2004).
35. А. В. Мельников, М. А. Куликов, М. Р. Новикова, Е. В. Шарова, "Выбор показателей поведенческих тестов для оценки типологических особенностей поведения крыс", *Журн. высш. нерв. деятельности*, **54**, № 5, 712-717 (2004).
36. P. A. Russe, "Relationships between exploratory behaviour and fear: a review", *Brit. J. Psychol.*, **64**, 417-433 (1973).
37. A. Carobrez and L. Bertoglio, "Ethological and temporal analyses of anxiety-like behavior: the elevated plus-maze model 20 years on", *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **29**, No. 8, 1193-1205 (2005).
38. И. П. Левшина, В. Н. Мац, Н. В. Пасикова, Н. Н. Шуйкин, "Сопоставление поведения крыс после длительной иммобилизации со структурными изменениями в моторной коре и гиппокампе," *Журн. высш. нерв. деятельности*, **60**, № 2, 184-191 (2010).
39. О. А. Громова, И. Ю. Торшин, Е. А. Диброва и др., "Мировой опыт применения препаратов из плаценты человека: результаты клинических и экспериментальных исследований. Обзор", *Пласт. хирургия и косметология*, **3**, 385-576 (2011).
40. O. S. Prokopyuk, V. Yu. Prokopyuk, N. M. Pasieshvili, et al., "Implantation of cryopreserved human placental fragments restores prooxidant-antioxidant balance in experimental animals of late ontogeny", *Cryobiol. Cryomed.*, **27**, No. 1, 61-70 (2017).
41. O. Parolini, F. Alviano, G. P. Bagnara, et al., "Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international "Workshop on Placenta Derived Stem Cells", *Stem Cells*, **26**, No. 2, 300-311 (2008).
42. G. Tonello, M. Daglio, N. Zaccarelli, et al., "Characterization and quantitation of the active polynucleotide fraction (PDRN) from human placenta, a tissue repair stimulating agent", *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **14**, 1555-1560 (1996).
43. K. Yamada and T. Nabeshima, "Brain-derived neurotrophic factor/TrkB signaling in memory processes", *J. Pharmacol. Sci.*, **91**, 267-270 (2003).
44. K. Takuma, H. Mizoguchi, and Y. Funatsu, "Placental extract improves hippocampal neuronal loss and fear memory impairment resulting from chronic restraint stress in ovariectomized mice", *J. Pharmacol. Sci.*, **120**, 89-97 (2012).