

DOI 10.29254/2077-4214-2026-1-180-288-298

UDC 611.013.3:57.086.13:612.017

Mykhalchuk T. V., Prokopyuk O. S.

COMPARATIVE ANALYSIS OF BIOCHEMICAL PROFILES OF HUMAN PLACENTAL EXPLANTS BY FETAL SEX AFTER CRYOPRESERVATION

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the NAS of Ukraine (Kharkiv, Ukraine)

tv.mykhalchuk@gmail.com

Preservation of cell viability and morphological integrity of placental explants is crucial for their subsequent use in pharmacology and regenerative medicine. Of particular interest is the potential influence of fetal sex on the biochemical profile of the placenta.

The aim of this study was to determine the efficiency of cryopreservation of human placental explants using 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) and to assess the effect of fetal sex on the content of biologically active substances in placental extracts.

Placental explants were obtained from women after cesarean section and cryopreserved at a cooling rate of 1°C/min to -70°C, followed by storage in liquid nitrogen. Cell viability was assessed using vital staining with neutral red and trypan blue, while morphological analysis was performed after hematoxylin and eosin staining of histological sections. Hormone and protein levels were determined using electrochemiluminescence and photometric methods.

After cryopreservation with DMSO, high cell viability and preservation of placental villous morphological integrity were observed, with minimal transient signs of damage. No morphological differences were detected between samples obtained from fetuses of different sexes. Biochemical analysis revealed sex-specific differences: extracts derived from placental tissue of female fetuses contained higher levels of alpha-fetoprotein, chorionic gonadotropin, luteinizing hormone, prolactin, and total protein, whereas samples from male fetuses were characterized by increased levels of testosterone and unconjugated estriol.

Thus, cryopreservation with DMSO ensures effective preservation of the structural and functional integrity of placental explants. At the same time, fetal sex determines the specific biochemical composition of the tissue, which is important for the further development of placental-based preparations for medical use.

Key words: placenta, cryopreservation, sex-specific differences, placental explants, regenerative medicine.

Connection of the publication with planned research work.

The study was conducted within the framework of the SRW "Effects of cryopreservation on placental cells and their impact on the reproductive system of females with ovarian insufficiency" (state registration number 0119U100443), "Assessment of the efficacy of cryosublimated cord blood serum in mitigating the consequences of blast-induced concussive injury combined with whole-body hypothermia", state registration number 0123U105307, as well as the SRW under contract No. 2N/11-23 entitled "Preservation, and development of the scientific facility - the low-temperature bank of biological specimens of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, which constitutes a national asset of the State".

Introduction.

The placenta is a unique temporary organ that integrates barrier, endocrine, and immunoregulatory functions, ensuring fetal development throughout the entire gestational period. Its biological uniqueness is determined by a complex composition that includes a wide range of biologically active substances, such as hormones, growth factors, cytokines, chemokines, extracellular matrix components, enzymes, lipids, and nucleic acids [1, 2, 3]. This complexity underlies the high regenerative, immunomodulatory, and cytoprotective potential of placenta-derived preparations, which in turn explains the growing interest in such therapeutic approaches in both fundamental and applied biomedical research [4, 5].

In recent years, increasing attention has been paid to the study of sex-specific characteristics of the placenta

[6]. Accumulating evidence indicates that fetal sex may influence gene expression, leading to differences in the profile of biologically active substances, metabolic and immune characteristics of the placenta, as well as fetal adaptive responses to stress factors [7, 8, 9]. Such sexual dimorphism may result in differences in the biological activity of placenta-derived biopreparations depending on their level of organization and may potentially affect the efficacy of regenerative therapy.

In modern biomedicine, several main forms of placental derivatives have been described, including mesenchymal stromal cells, conditioned medium, cell-free extracts, extracellular vesicles (including exosomes), and tissue explants [4, 5]. Each of these forms represents a different level of biological organization and, consequently, a different degree of preservation of tissue integrity and functional complexity. While cell cultures and cell-free fractions allow the investigation of individual mechanisms of action, explants provide the most comprehensive reproduction of the natural properties of the placenta due to the preservation of tissue architecture, cellular heterogeneity, and the local microenvironment [10, 11]. In this context, explants are considered a promising approach for studying the integrated morphofunctional and biochemical characteristics of the placenta.

At the same time, the practical application of placental derivatives in scientific research and biomedical development is inseparably associated with the need to ensure their long-term storage without loss of key biological properties, which is most effectively achieved through cryopreservation [12]. This method enables the establishment of biobanks of placental samples, ensuring their availability and standardization. However, low-temperature exposure may induce structural and

biochemical alterations in the tissue, including disruption of cellular ultrastructure, intercellular contacts, and modification of the composition of biologically active components [10, 11, 12]. This necessitates a detailed analysis of the morphological and biochemical characteristics of placental derivatives both before and after cryopreservation.

Thus, the available data indicate a clear need for comprehensive investigation of the morphological and biochemical characteristics of placental derivatives with consideration of fetal sex, as well as for evaluation of the effects of cryopreservation on these parameters. Studying these differences opens opportunities for the development of personalized biotherapeutic approaches based on placental components in regenerative medicine.

The aim of this study.

To determine the structural preservation of human placental explants with regard to fetal sex after cryopreservation and to assess the content of biologically active substances in these explants.

Objects and research methods.

Human placentas obtained after cesarean section from women who delivered newborns of different sexes were washed with phosphate-buffered saline and dissected into fragments up to 3 mm in size [10, 11]. This study was conducted in accordance with the requirements of Good Clinical Practice (ICH E2(R6) GCP) and the Declaration of Helsinki of the World Health Organization. All women provided informed voluntary consent prior to any procedures. The resulting villous tissue was cryopreserved using 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma, USA) prepared in high-glucose DMEM supplemented with L-glutamine and 10% fetal bovine serum (FBS) (PAA, Austria). Freezing was performed at a cooling rate of 1°C/min to -70°C, followed by storage in liquid nitrogen (-196°C) [10, 11]. Thawing was carried out in a water bath at 37°C, after which the cryoprotectant was removed by sequential washing.

Cell viability within PE after cryopreservation was assessed using vital staining with neutral red and trypan blue.

PE were cultured in high-glucose DMEM supplemented with L-glutamine and pyruvate (BioWest, France), 10% fetal bovine serum (PAA, Austria), antibiotics, and antimycotics (PAA, Austria) at 37°C in an atmosphere of 5% CO₂.

To assess structural changes in PE after cryopreservation, histological examination was performed using standard hematoxylin and eosin staining. Samples were fixed in 10% neutral formalin for 24 h, dehydrated in ascending concentrations of ethanol, and embedded in paraffin. Sections 5–7 µm thick were prepared and stained with Mayer's hematoxylin followed by counterstaining with eosin Y. Histological evaluation was performed using a light microscope (PZO-Warszawa, Poland).

PE samples of different fetal sex were analyzed to determine the content of biomarkers potentially associated with their therapeutic potential. Explants obtained during cultivation were homogenized and subjected to cryotreatment by freezing to -40°C followed by thawing at 37°C in a water bath. The samples were then centrifuged (1500 rpm, 10 min), and the supernatants were collected for further analysis.

The concentrations of prolactin, progesterone, testosterone, and estradiol were determined by electrochemiluminescence immunoassay (ECLIA) using commercial test kits on Elecsys 1070/2010 and Cobas E411 analyzers (Hoffmann-La Roche, Switzerland). Levels of alpha-fetoprotein (AFP), human chorionic gonadotropin (hCG), luteinizing hormone (LH), and follicle-stimulating hormone (FSH) were measured using solid-phase chemiluminescent immunometric assays with appropriate reagent kits on the IMMULITE 2000 platform (Siemens Healthineers, USA). Total protein content was determined by a photometric method based on the biuret reaction using the BioSystems PROTEIN (TOTAL) reagent kit (BioSystems S.A., Spain).

For each group (female and male fetal sex), extracts were obtained by pooling PE isolated from placentas of five donors. Subsequent biochemical analyses were performed on a single pooled sample for each group. Due to prior pooling of placental material before analysis, inferential statistical analysis was not performed, which precluded assessment of interindividual variability. The results are presented as absolute values and were used for descriptive comparative analysis of parameters depending on fetal sex. The authors used ChatGPT-5.2 (OpenAI) exclusively for language editing; all scientific content, interpretations, and conclusions were generated by the authors.

Research results and their discussion.

One of the key criteria for the effectiveness of cryopreservation is the preservation of cell viability; therefore, a comparative analysis of control and cryopreserved-thawed placental explants (PE) was performed using the vital dyes neutral red and trypan blue. Vital staining of native explants with neutral red demonstrated intense and uniform staining of cellular elements, indicating high cell viability (**fig. 1**). It is well established that neutral red selectively accumulates in the lysosomes of viable cells; therefore, this staining pattern reflects preserved cell membrane integrity and an active metabolic state.

In samples frozen in liquid nitrogen without the use of a cryoprotective medium (negative control), neutral red staining revealed heterogeneous diffuse coloration with the absence of distinct cellular boundaries (**fig. 2A**), indicating disruption of membrane integrity as a result of low-temperature exposure. Trypan blue staining of these samples demonstrated staining of all cellular el-

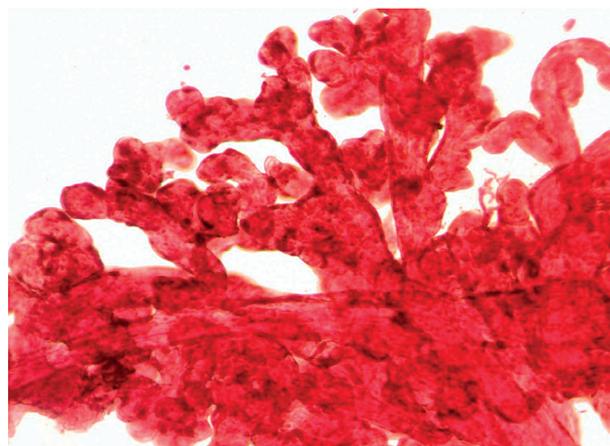


Figure 1 – Microstructure of human placental villi (native sample) following vital staining with neutral red. Scale bar: 100 µm.

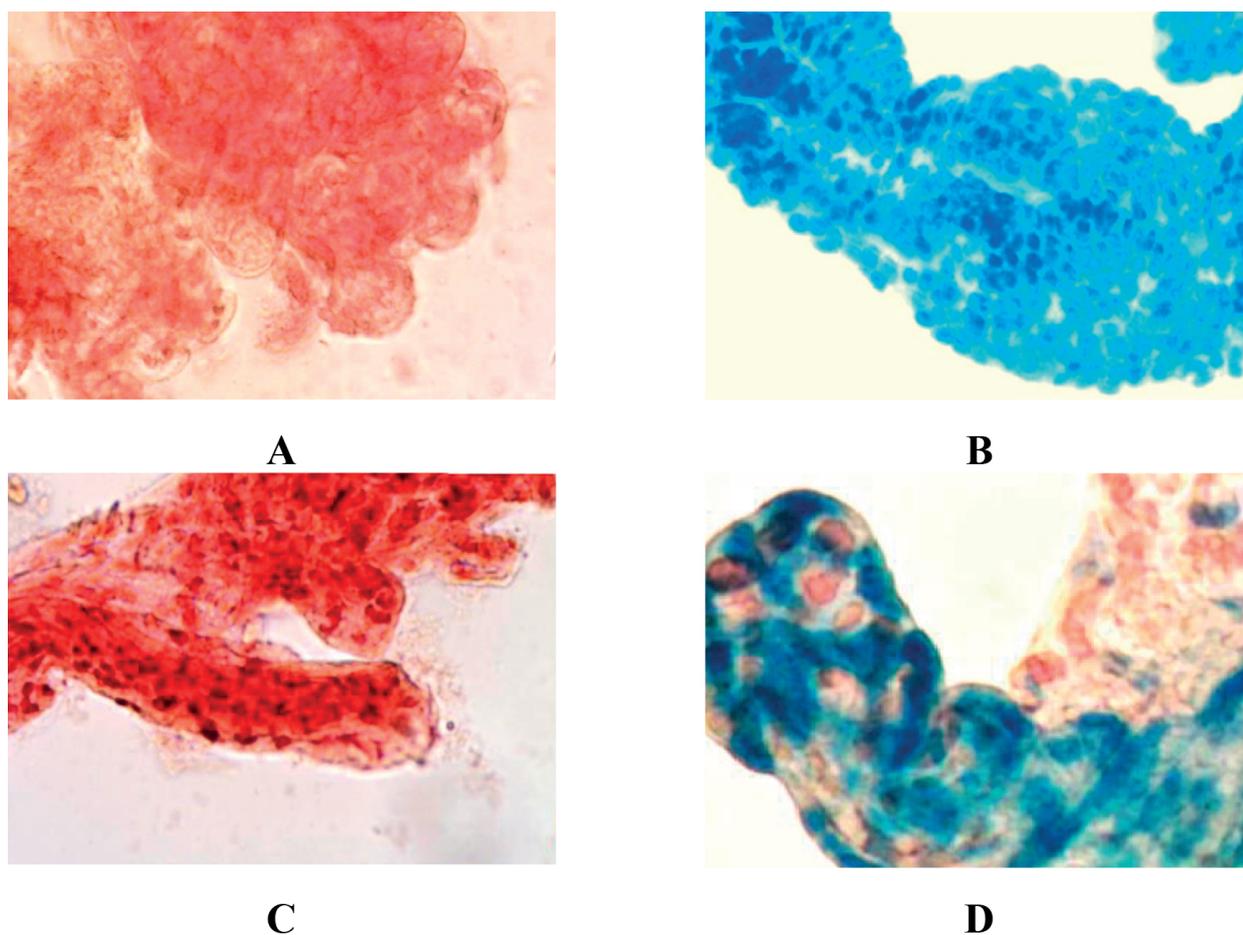


Figure 2 – Microstructure of human placental explants after cryopreservation assessed by vital staining: A – negative control, neutral red staining; B – negative control, trypan blue staining; C – sample after cryopreservation with DMSO, neutral red staining; D – sample after cryopreservation with DMSO, trypan blue staining. Scale bar: 50 μ m.

ements, including both trophoblastic and stromal cells (**fig. 2B**), which indicates a complete loss of cell viability in this control group.

In contrast, after cryopreservation of PE using a DMSO-based cryoprotective solution, intense neutral red staining was observed in the majority of cells (**fig. 2C**), indicating preservation of cell viability. At the same time, occasional trypan blue-positive cells and episodic dye penetration into the stroma were noted (**fig. 2D**), suggesting the presence of partial damage induced by freezing and subsequent thawing processes; these changes disappeared after 24 h of sample cultivation.

Thus, the results of vital staining demonstrate that the use of DMSO provides a substantially higher level of preservation of cell viability within PE compared with the control, despite the presence of individual signs of cryo-induced damage.

Morphological analysis of PE stained with hematoxylin and eosin revealed marked differences between native, negative control, and cryopreserved-thawed samples. In native PE maintained for 24 h under subnormothermic conditions, the overall architecture of placental villi was preserved (**fig. 3A**). Moderate narrowing of the villi and a reduction in the inter-villous distance were observed, along with apparent thickening and fusion of the trophoblastic layer without signs of its detachment from the stroma. In some cells, increased cytoplasmic eosinophilia and nuclear heterochromia were noted.

In contrast, samples of the negative control frozen directly in liquid nitrogen without the use of a cryoprotective solution exhibited pronounced destructive changes (**fig. 3B**). The villi lost their characteristic shape and structure; the trophoblast was fragmented and detached from the stroma along the basement membrane. Disruptions were observed in the embryonic mesenchyme, and terminal villi displayed a wrinkled appearance. Cell nuclei were hyperchromatic, and the cells were reduced in size. Capillaries in secondary and tertiary villi were destroyed and lacked erythrocytes, indicating severe disruption of tissue integrity.

After cryopreservation using a cryoprotective medium, the morphological structure of placental villi was generally preserved (**fig. 3C, D**). In cryopreserved-thawed samples, only occasional detachment of the trophoblast from the villous stroma, moderate expansion of intercellular spaces within the mesenchyme, and a reduction in cell size with preservation of intercellular contacts were observed. The architecture of capillaries remained intact, and cell nuclei were normochromatic. The described morphological changes were transient and disappeared after 24 h of explant cultivation. Comparative analysis of cryopreserved-thawed PE samples obtained from fetuses of different sexes revealed no morphological differences between them, indicating a similar degree of tissue preservation after cryopreservation and the absence of an effect of fetal sex on the morphological integrity of the explants.

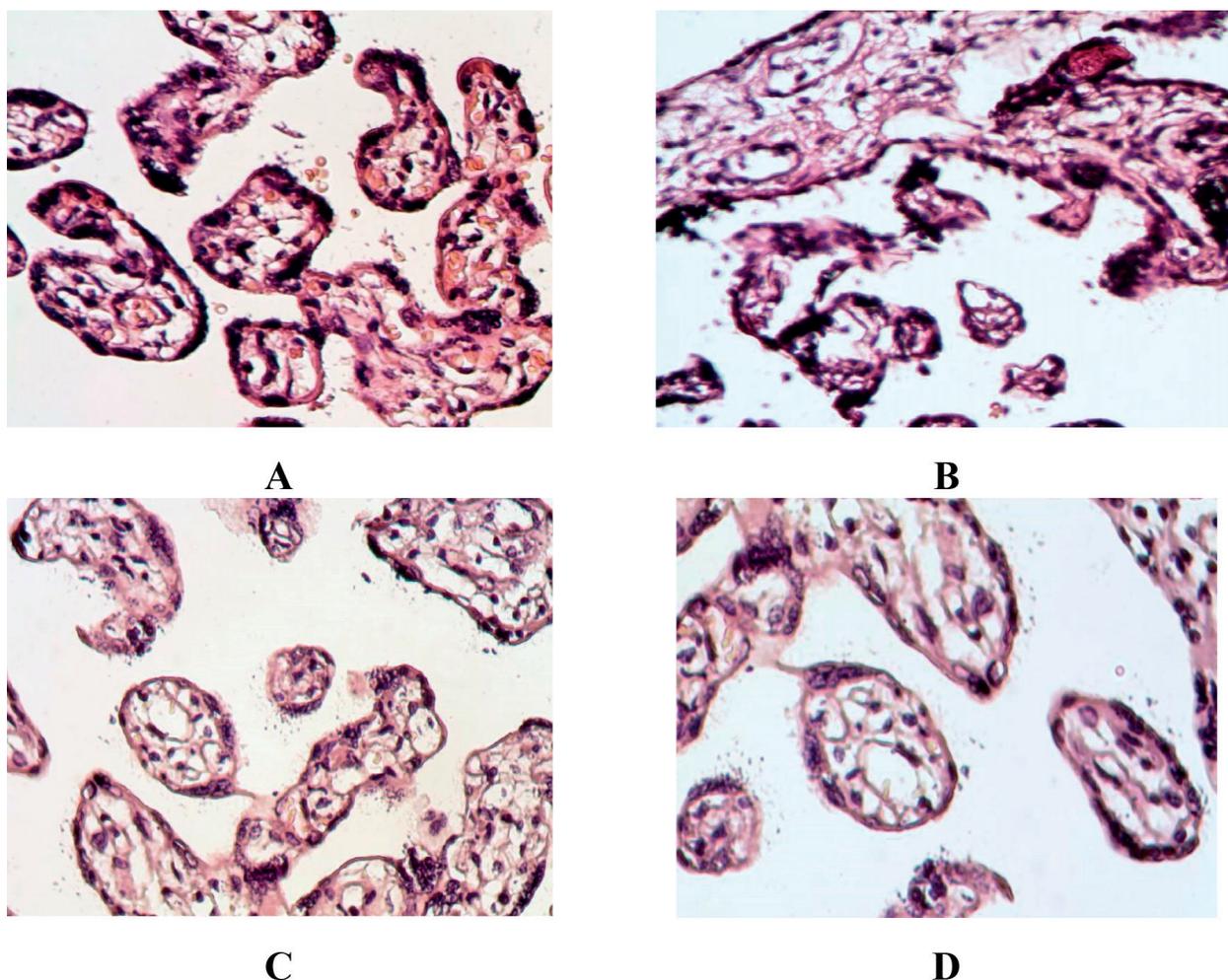


Figure 3 – Morphological features of human placental explants stained with hematoxylin and eosin: A – native PE after 24 h storage under subnormothermic conditions; B – negative control; C – cryopreserved-thawed PE sample obtained from a male fetus; D – cryopreserved-thawed PE sample obtained from a female fetus. Scale bar: 50 μ m.

However, analysis of the biochemical profile of PE extracts obtained from female and male fetuses revealed a number of differences in their composition (table). Specifically, PE extracts from female fetuses exhibited higher concentrations of AFP, hCG, LH, and prolactin. In addition, a higher total protein content was observed in this group. These differences may be attributed both to more active hormone synthesis by placental cells and to greater accumulation of these substances within the tissue. Increased concentrations of AFP and prolactin may reflect more active processes of tissue growth and differentiation, whereas elevated levels of hCG and LH may indicate specific pathways of maternal-placental interaction that are more characteristic of pregnancies with female fetuses. Together with the increased total protein content, these findings may reflect integrated activity of the placental secretome, supporting fetal development and potentially providing a more enriched hormonal profile for pharmacological or regenerative applications.

The absence of marked differences in progesterone levels indicates its fundamental role in the maintenance of pregnancy, regardless of fetal sex.

In PE extracts derived from male fetuses, higher concentrations of total testosterone and unconjugated estriol were detected, which is likely associated with sex-specific features of placental steroidogenesis and the hormonal microenvironment of the fetus. Together

with the low levels of FSH observed in both groups, this finding highlights differentiated hormonal activity of the placenta depending on fetal sex and may represent an important characteristic for evaluating the biological and regenerative activity of placenta-derived preparations.

It should be noted that the obtained results are descriptive in nature, as the extracts were generated from a relatively small pooled amount of placental material. Nevertheless, the presented data allow characterization

Table – Comparative biochemical profile of placental extracts depending on fetal sex

Parameter (units)	PE extract	
	Female fetus	Male fetus
AFP (ng/ml)	1380	642
hCG (mIU/ml)	4002	2988
LH (mIU/ml)	1.155	0.63
Progesterone (ng/ml)	256.8	268.8
Prolactin (mIU/ml)	702	485.1
Total testosterone (ng/dl)	352	543.3
FSH (mIU/ml)	< 0.3	< 0.3
Unconjugated estriol (nmol/l)	359.1	492
Total protein (g/l)	19.47	14.58

Notes: AFP – alpha-fetoprotein; hCG – human chorionic gonadotropin; LH – luteinizing hormone; FSH – follicle-stimulating hormone.

of the integrated hormonal and biochemical features of PE extracts depending on fetal sex and may serve as a basis for further studies.

Conclusions.

Thus, the results of the study demonstrated that the applied method of cryopreservation of placental explants using a DMSO-based cryoprotective solution ensures preservation of cell viability and tissue morphological integrity, with minimal and predominantly transient signs of cryo-induced damage. Comparative histological analysis revealed no morphological differences between cryopreserved–thawed samples obtained from fetuses of different sexes.

At the same time, fetal sex was found to influence the content of biologically active substances in PE extracts, particularly hormone and protein levels. The identified

differences may be important for further optimization of approaches to the development of placental preparations in pharmacology and regenerative medicine, with consideration of the potential need to account for the sex of the donor material.

Prospects for further research.

Further studies should be directed toward a comprehensive analysis of the composition of PE extracts with consideration of fetal sex, with a focus on the concentrations of cytokines, pro- and anti-inflammatory factors, growth factors, enzymes, angiogenic agents, and metabolites. Such an approach will allow a more detailed assessment of the potential impact of these components on the regenerative properties of PE and help to elucidate their role in ensuring the biological activity and pharmacological efficacy of finished biopreparations.

DOI 10.29254/2077-4214-2026-1-180-288-298

УДК 611.013.3:57.086.13:612.017

Михальчук Т. В., Прокопюк О. С.

ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ БІОХІМІЧНОГО ПРОФІЛЮ КРІОКОНСЕРВОВАНИХ ЕКСПЛАНТІВ ПЛАЦЕНТИ ЛЮДИНИ ЗАЛЕЖНО ВІД СТАТІ ПЛОДА

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (м. Харків, Україна)

tv.mykhalchuk@gmail.com

Збереження життєздатності клітин та морфологічної цілісності експлантів плаценти є визначальним для їх подальшого використання у фармакології та регенеративній медицині. Особливий інтерес викликає можливий вплив статі плода на біохімічний профіль плаценти.

Метою нашого дослідження було визначити ефективність кріоконсервування експлантів плаценти людини з використанням 10% диметилсульфоксиду (ДМСО) та оцінити вплив статі плода на вміст біологічно активних речовин у плацентарних екстрактах.

Експланти плаценти отримували від жінок після кесаревого розтину та кріоконсервували зі швидкістю 1°C/хв до –70°C із подальшим зберіганням у рідкому азоті. Життєздатність клітин оцінювали за допомогою вітального забарвлення нейтрального червоним і трипановим синім, морфологічний аналіз проводили після фарбування гістологічних зразків гематоксиліном та еозином. Вміст гормонів і білка визначали електрохемілюмінесцентним та фотометричним методами.

Після кріоконсервування з ДМСО зберігалась висока життєздатність клітин і морфологічна цілісність ворсин плаценти з мінімальними транзиторними ознаками ушкоджень. Морфологічних відмінностей між зразками від плодів різної статі не виявлено. Біохімічний аналіз показав статевоспецифічні відмінності: екстракти з плацентарного матеріалу від плодів жіночої статі мали вищий вміст альфафетопротеїну, хоріонічного гонадотропіну, лютеїнізуючого гормону, пролактину та загального білка, а зразки від плодів чоловічої статі характеризувались підвищеним рівнем тестостерону та некон'югованого естріолу.

Таким чином, кріоконсервування з ДМСО забезпечує ефективне збереження структурної та функціональної цілісності плацентарних експлантів. При цьому стать плода визначає специфіку біохімічного складу тканини, що має значення для подальшого виготовлення плацентарних препаратів для медичного застосування.

Ключові слова: плацента, кріоконсервування, статевоспецифічні відмінності, експланти плаценти, регенеративна медицина.

Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами.

Дослідження виконано в рамках НДР «Вплив кріоконсервування на клітини плаценти та їх дія на репродуктивну систему самиць з оваріальною недостатністю», номер державної реєстрації 0119U100443, «Визначення ефективності дії кріосублімованої сироватки кордової крові у подоланні наслідків вибухової контузійної травми, поєднаної з переохолодженням організму», номер державної реєстрації 0123U105307 та НДР за договором № 2Н/11-23 «Збереження та розвиток наукового об'єкта – низькотемпературний банк біологічних об'єктів Інституту про-

блем кріобіології і кріомедицини НАН України, що становить національне надбання Держави».

Вступ.

Плацента є особливим тимчасовим органом, який поєднує функції бар'єра, ендокринної залози та імунорегуляторної платформи, забезпечуючи розвиток плода протягом усього гестаційного періоду. Її біологічна унікальність зумовлена різноманітним складом, що включає широкий спектр біологічно активних речовин, таких як гормони, фактори росту, цитокіни, хемокіни, позаклітинні матриксні компоненти, ферменти, ліпіди та нуклеїнові кислоти [1, 2, 3]. Саме ця комплексність визначає високий регене-

ративний, імуномодулюючий та цитопротекторний потенціал препаратів, розроблених на основі плаценти, що в свою чергу зумовлює зростаючий інтерес до таких терапевтичних підходів у фундаментальних і прикладних біомедичних дослідженнях [4, 5].

Останніми роками у науковій літературі зростає інтерес до вивчення статевоспецифічних особливостей плаценти [6]. Накопичені дані свідчать, що стать плода може впливати на експресію генів, що призводить до відмінностей у профілі біологічно активних речовин, метаболічних та імунних характеристик плаценти, а також адаптаційних реакцій плода у відповідь на стресові фактори [7, 8, 9]. Такі статеві диморфізми можуть зумовлювати різну біологічну активність біопрепаратів на основі похідних плаценти залежно від рівня їх організації і потенційно впливати на ефективність відновлювальної терапії.

У сучасній біомедицині описано кілька основних форм плацентарних похідних, зокрема мезенхімальні стромальні клітини, кондиціоноване середовище, безклітинні екстракти, позаклітинні везикули (у тому числі екзосоми), а також тканинні експланти [4, 5]. Кожна з цих форм відображає різний рівень організації біологічного матеріалу та, відповідно, різний ступінь збереження тканинної цілісності й функціональної комплексності. Якщо клітинні культури та безклітинні фракції дозволяють досліджувати окремі механізми дії, то експланти забезпечують найбільш повне відтворення природних властивостей плаценти завдяки збереженню структури тканини, клітинної гетерогенності та локального мікрооточення [10, 11]. У зв'язку з цим експланти розглядаються як перспективний підхід для вивчення інтегральних морфофункціональних та біохімічних характеристик плаценти.

Водночас практичне застосування плацентарних похідних у наукових дослідженнях та біомедичних розробках нерозривно пов'язане з необхідністю забезпечення їх довготривалого зберігання без втрати ключових біологічних властивостей, що найкраще можна реалізувати за допомогою кріоконсервування [12]. Цей метод дозволяє створювати біобанки плацентарних зразків, забезпечуючи їх доступність та стандартизацію. Однак, низькотемпературний вплив може спричинити структурні та біохімічні зміни тканини, зокрема порушення клітинної ультраструктури, міжклітинних контактів та модифікацію складу біологічно активних компонентів [10, 11, 12]. Це зумовлює необхідність детального аналізу морфологічних і біохімічних характеристик плацентарних похідних як до, так і після кріоконсервування.

Таким чином, сукупність наведених даних свідчить про те, що на сьогодні існує очевидна потреба у комплексному вивченні морфологічних та біохімічних характеристик плацентарних похідних з урахуванням статі плода, а також оцінці впливу кріоконсервування на ці показники. Дослідження цих відмінностей відкриває можливості для розробки персоналізованих біотерапевтичних підходів на основі плацентарних компонентів у регенеративній медицині.

Мета дослідження.

Визначення структурної збереженості експлантів плаценти людини з урахуванням статевої належності після їх кріоконсервування та вивчення в них вмісту біологічно активних речовин.

Об'єкт і методи дослідження.

Плаценту людини, отриману після кесаревого розтину від жінок із новонародженими різної статі, промивали фосфатно-сольовим буфером і подрібнювали на фрагменти до 3 мм [10, 11]. Під час проведення даного дослідження було дотримано вимог Good Clinical Practice (ICH E2(R6) GCP) та Гельсінської Декларації Всесвітньої медичної організації. До початку будь-яких процедур усі жінки надали інформовану добровільну згоду на участь. Отримані ворсини кріоконсервували з використанням 10% диметилсульфоксиду (ДМСО) («Sigma», США), приготованого на основі середовища DMEM з високим вмістом глюкози, доповненого L-глутаміном і 10% фетальної бичачої сироватки (PPA, Австрія). Заморожування здійснювали зі швидкістю 1°C/хв до -70°C з подальшим зберіганням у рідкому азоті (-196°C) [10, 11]. Розморожування проводили у водяній бані при 37°C, після чого кріопротектор видаляли шляхом послідовних відмивань.

Життєздатність клітин у складі ЕП після кріоконсервування оцінювали за допомогою вітального забарвлення нейтральним червоним і трипановим синім.

Культитивування ЕП здійснювали у поживному середовищі DMEM з високим вмістом глюкози, L-глутаміном і піруватом (BioWest, Франція), доповненому 10% фетальної бичачої сироватки (PPA, Австрія), антибіотиком та антимікотиком (PPA, Австрія) при 37°C та 5% CO₂.

Для оцінки структурних змін в ЕП після кріоконсервування проводили гістологічне дослідження з використанням стандартного фарбування гематоксином та еозином. Зразки фіксували у 10% нейтральному формаліні протягом 24 год, дегідрували у спиртах зростаючої концентрації та заливали у парафін, з якого готували зрізи товщиною 5-7 мкм. Отримані зрізи фарбували гематоксином Мейєра з подальшим контрастуванням еозином Y. Гістологічну оцінку проводили за допомогою світлового мікроскопа (PZO-Warszawa, Польща).

Зразки ЕП різної статевої належності досліджували з метою визначення вмісту біомаркерів, потенційно пов'язаних з їх терапевтичним потенціалом. Отримані в процесі культивування експланти гомогенізували та піддавали кріообробці шляхом заморожування до -40°C з подальшим розморожуванням при 37°C у водяній бані. Після цього зразки центрифугували (1500 об/хв, 10 хв), а надосадову рідину відбирали для подальшого аналізу.

Вміст пролактину, прогестерону, тестостерону та естріолу визначали методом електрохемілюмінесцентного імуноаналізу (ECLIA) з використанням комерційних тест-систем на аналізаторах Elecsys 1070/2010 та Cobas E411 («Hoffmann-La Roche», Швейцарія). Для оцінки вмісту альфафетопротеїну (АФП), хоріонічного гонадотропіну (ХГЛ), лютеїнізуючого (ЛГ) та фолікулоstimулюючого (ФСГ) гормонів застосовували твердофазний хемілюмінесцентний імунометричний аналіз з використанням відповідних наборів реагентів на платформі IMMULITE 2000 (Siemens Healthineers, США). Вміст загального білка визначали фотометричним методом за біуретовою реакцією з використанням набору реагентів BioSystems PROTEIN (TOTAL) (BioSystems S.A., Іспанія).

Для кожної групи (жіноча та чоловіча стать плода) екстракти були отримані шляхом пулювання ЕП, ізольованих від плацент 5 донорів. Подальше визначення біохімічних показників проводили в одному об'єднаному зразку для кожної групи. У зв'язку з попереднім пулюванням плацентарного матеріалу перед визначенням показників, статистичну обробку результатів у вигляді інферентного аналізу не проводили, що унеможливило оцінку міжіндивідуальної варіабельності. Результати наведено у вигляді абсолютних значень та використано для описового порівняльного аналізу показників залежно від статі плода. Автори використовували ChatGPT-5.2 (OpenAI) виключно для мовного редагування; науковий зміст, інтерпретація та висновки належать авторам.

Результати дослідження та їх обговорення.

Одним із ключових критеріїв ефективності кріоконсервування є збереження життєздатності клітин, у зв'язку з чим було проведено порівняльний аналіз ЕП з використанням вітальних барвників. При забарвленні нативних експлантів нейтральним червоним спостерігалось інтенсивне рівномірне фарбування клітинних елементів, що свідчить про їх високу життєздатність (рис. 1). Відомо, що нейтральний червоний вибірково накопичується в лізосомах живих клітин, тому такий характер забарвлення відображає збережену цілісність клітинних мембран і активний метаболічний стан клітин.

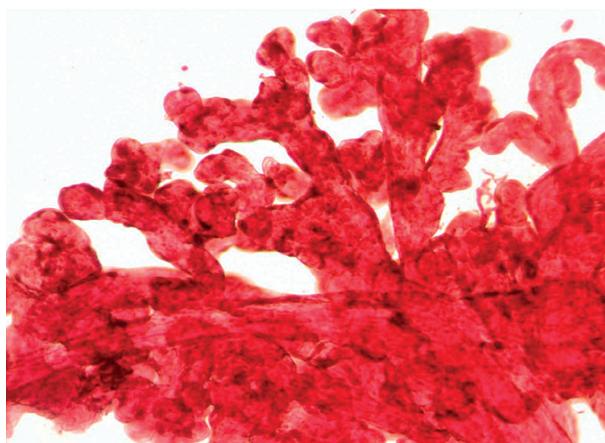
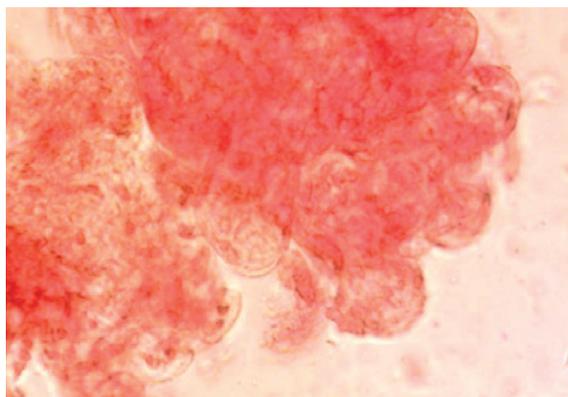
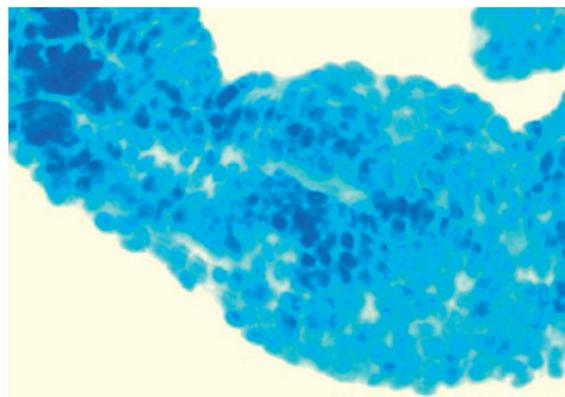


Рисунок 1 – Мікроструктура ворсин плаценти людини (нативний препарат) при вітальному забарвленні нейтральним червоним. Масштаб: 100 мкм.

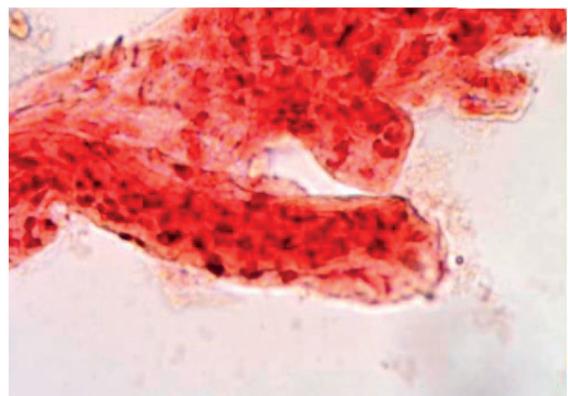
У зразках, заморожених у рідкому азоті без застосування кріозахисного середовища (негативний контроль), при забарвленні нейтральним червоним відзначалось неоднорідне дифузне фарбування за відсутності чітких клітинних меж (рис. 2А), що вказує на порушення мембранної цілісності внаслідок дії низьких температур. При забарвленні цих зразків трипановим синім спостерігалось фарбування усіх клітинних елементів, як трофобластичних, так і клітин



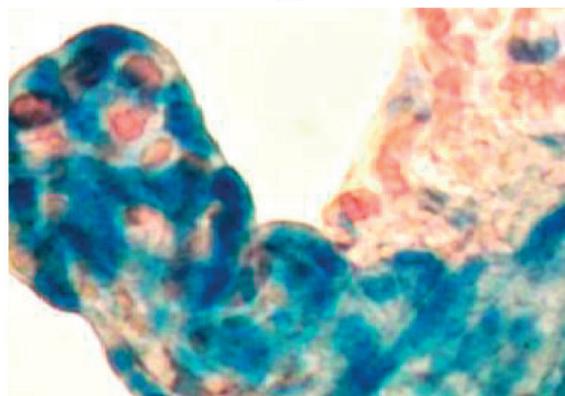
А



Б

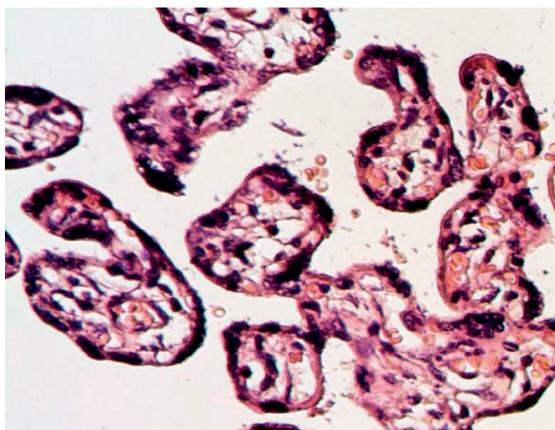


В

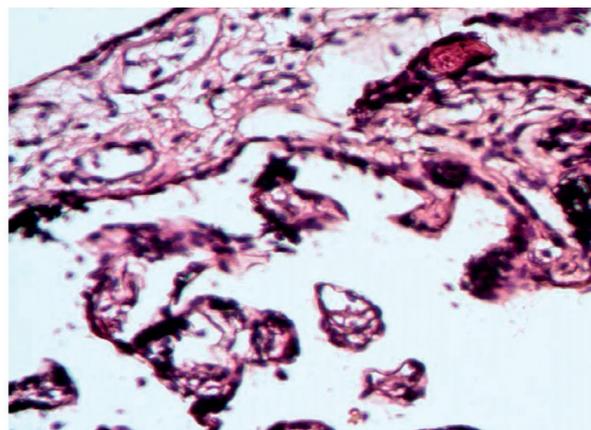


Г

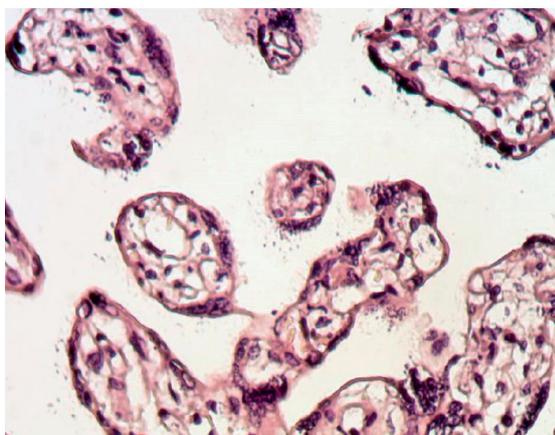
Рисунок 2 – Мікроструктура ЕП людини після кріоконсервування при вітальному забарвленні: А – негативний контроль, забарвлення нейтральним червоним; Б – негативний контроль, забарвлення трипановим синім; В – зразок після кріоконсервування з ДМСО, забарвлення нейтральним червоним; Г – зразок після кріоконсервування з ДМСО, забарвлення трипановим синім. Масштаб: 50 мкм.



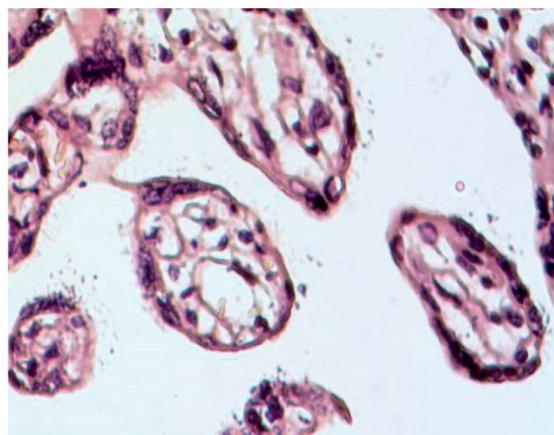
А



Б



В



Г

Рисунок 3 – Морфологічна характеристика ЕП людини при забарвленні гематоксилином та еозином: А – нативні ЕП після зберігання протягом 24 год за субнормотермічних умов; Б – негативний контроль; В – деконсервованій зразок ЕП, отриманих від плода чоловічої статі; Г – деконсервованій зразок ЕП, отриманих від плода жіночої статі. Масштаб: 50 мкм.

строми (рис. 2Б), що свідчить про повну втрату життєздатності клітин у даній контрольній групі.

Натомість після кріоконсервування ЕП з використанням кріозахисного розчину на основі ДМСО спостерігалось інтенсивне фарбування більшості клітин нейтральним червоним (рис. 2В), що вказує на збереження їх життєздатності. При цьому відзначались поодинокі клітини, позитивні за трипановим синім, а також епізодичне затікання барвника в строму (рис. 2Г), що свідчить про наявність часткових ушкоджень, спричинених процесами заморожування та подальшого розморожування, які зникали при культивуванні зразків протягом доби.

Таким чином, результати вітального забарвлення демонструють, що застосування ДМСО забезпечує суттєво вищий рівень збереження життєздатності клітин у складі ЕП порівняно з контролем, незважаючи на наявність окремих ознак кріоіндукованого ушкодження.

Морфологічний аналіз ЕП, забарвлених гематоксилином та еозином, показав суттєві відмінності між нативними, контрольними та деконсервованими зразками. Так, у нативних ЕП, що зберігалися протягом 24 год за субнормотермічних умов, загальна архітектура ворсин плаценти була збережена (рис. 3А). Спостерігалось помірне звуження ворсин, зменшення відстані між ними, а також візуальне потовщення

та злиття шару трофобласту без ознак його відшарування від строми. В окремих клітинах відзначали підвищену еозинофілію цитоплазми та гетерохромію ядер.

Натомість у зразках негативного контролю, заморожених безпосередньо у рідкому азоті без застосування кріозахисного розчину, мали місце виражені деструктивні зміни (рис. 3Б). Ворсини втрачали характерну форму та структуру, трофобласт був фрагментований і відшаровувався від строми по базальній мембрані. В ембріональній мезенхімі спостерігались розриви, термінальні ворсини мали зморщений вигляд. Ядра клітин були гіперхромними, клітини мали зменшений розмір. Капіляри у вторинних і третинних ворсинах були зруйновані та не містили еритроцитів, що свідчить про грубе порушення тканинної цілісності.

Після кріоконсервування з використанням кріозахисного середовища морфологічна структура ворсин плаценти загалом зберігалась (рис. 3В, Г). У деконсервованих зразках відзначались лише поодинокі відшарування трофобласту від строми ворсин, помірне розширення міжклітинних просторів у мезенхімі та зменшення розмірів клітин за збереження міжклітинних контактів. Архітектура капілярів залишалась інтактною, ядра клітин були нормохромними. Описані морфологічні зміни мали транзиторий характер

Таблиця – Порівняльна характеристика біохімічного профілю екстрактів плаценти залежно від статі плода

Показник (одиниці вимірювання)	Екстракт ЕП	
	Жіноча стать плода	Чоловіча стать плода
АФП (нг/мл)	1380	642
ХГЛ (mIU/мл)	4002	2988
ЛГ (mIU/мл)	1.155	0.63
Прогестерон (нг/мл)	256.8	268.8
Пролактин (mIU/мл)	702	485.1
Тестостерон загальний (нг/дл)	352	543.3
ФСГ (mIU/мл)	< 0.3	< 0.3
Естріол неконюгований (нмоль/л)	359.1	492
Загальний білок (г/л)	19.47	14.58

Примітки: АФП – альфафетопротеїн; ХГЛ – хоріонічний гонадотропін людини; ЛГ – лютеїнізуючий гормон; ФСГ – фолікулостимулюючий гормон.

і зникали після культивування експлантів протягом доби. Порівняльний аналіз деконсервованих зразків ЕП, отриманих від плодів різної статі, не виявив морфологічних відмінностей між ними, що свідчить про однаковий ступінь збереженості тканин після кріоконсервування та відсутність впливу статі плода на морфологічну цілісність експлантів.

Однак, при аналізі біохімічного профілю екстрактів ЕП, отриманих від плодів жіночої та чоловічої статі, виявлено низку відмінностей у їхньому складі (табл.). Так, в екстрактах ЕП від плодів жіночої статі відзначали вищі концентрації АФП, ХГЛ, ЛГ та пролактину. Також у цій групі спостерігали вищий вміст загального білка. Такі відмінності можуть бути зумовлені як більш активним синтезом гормонів клітинами плаценти, так і їх більшим накопиченням у тканині. При цьому збільшена концентрація АФП і пролактину може бути результатом активніших процесів росту та диференціації тканин, тоді як підвищений рівень ХГЛ та ЛГ може вказувати на специфічні шляхи материнсько-плацентарної взаємодії, більш характерні для вагітностей із плодами жіночої статі. Разом із підвищенням вмістом загального білка це може відображати інтегровану активність плацентарного секреторного, що підтримує розвиток плода та створює потенційно більш насичений гормональний профіль для фармакологічних або регенеративних застосувань.

Відсутність помітних відмінностей у рівнях прогестерону свідчить про його базову роль у підтриманні вагітності, незалежно від статі плода.

У екстрактах ЕП від плодів чоловічої статі виявлено вищі концентрації загального тестостерону та некон'югованого естріолу, що, ймовірно, пов'язано зі статевими особливостями плацентарного стероїдогенезу та гормонального мікрооточення плода. Разом із низьким рівнем ФСГ у обох групах це підкреслює диференційовану гормональну активність плаценти залежно від статі плода і може бути важливою характеристикою для оцінки біологічної та регенеративної активності препаратів, виготовлених на основі плаценти.

Слід зазначити, що отримані результати мають описовий характер, оскільки екстракти формувалися з відносно невеликого пулу плацентарного матеріалу. Разом із тим, наведені дані дозволяють охарактеризувати інтегральні особливості гормонального та біохімічного складу екстрактів ЕП залежно від статі плода та можуть бути використані як підґрунтя для подальших досліджень.

Висновки.

Таким чином, результати дослідження показали, що застосований метод кріоконсервування ЕП з використанням кріозахисного розчину на основі ДМСО забезпечує збереження життєздатності клітин і морфологічної цілісності тканин за наявності мінімальних, переважно транзиторних ознак кріоушкоджень. Порівняльний гістологічний аналіз не виявив морфологічних відмінностей між деконсервованими зразками, отриманими від плодів різної статі.

Водночас встановлено, що стать плода впливає на вміст біологічно активних речовин у екстрактах з ЕП, зокрема на рівень гормонів і білка. Виявлені відмінності можуть мати значення для подальшої оптимізації підходів до виготовлення плацентарних препаратів у фармакології та регенеративній медицині з огляду на можливу необхідність урахування статеві належності донорського матеріалу.

Перспективи подальших досліджень.

Подальші дослідження доцільно спрямувати на комплексний аналіз складу екстрактів ЕП з урахуванням статі плода з фокусом на концентрації цитокінів, прозапальних та протизапальних факторів, факторів росту, ферментів, ангіогенних агентів та метаболітів. Такий підхід дозволить більш детально оцінити потенційний вплив цих компонентів на регенеративні властивості ЕП і визначити їхню роль у забезпеченні біологічної активності та фармакологічної ефективності готових біопрепаратів.

References / Література

- Esposito M, Paulesu L, Mandalà M. The role of placental hormones and metabolites in modulating uterine circulation in physiological and pathological pregnancies. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2025;16:1637570. DOI: [10.3389/fendo.2025.1637570](https://doi.org/10.3389/fendo.2025.1637570).
- Aye ILMH, Tong S, Charnock-Jones DS, Smith GCS. The human placenta and its role in reproductive outcomes revisited. *Physiol Rev*. 2025;105(4):2305-2376. DOI: [10.1152/physrev.00039.2024](https://doi.org/10.1152/physrev.00039.2024).
- Zhou Q, Acharya G. Editorial: placental hormones and pregnancy-related endocrine disorders. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022;13:905829. DOI: [10.3389/fendo.2022.905829](https://doi.org/10.3389/fendo.2022.905829).
- Pogozhykh O, Prokopyuk V, Figueiredo C, Pogozhykh D. Placenta and placental derivatives in regenerative therapies: experimental studies, history, and prospects. *Stem Cells Int*. 2018;2018:4837930. DOI: [10.1155/2018/4837930](https://doi.org/10.1155/2018/4837930).
- Moghasssemi S, Nikanfar S, Dadashzadeh A, Sousa MJ, Wan Y, Sun F, et al. The revolutionary role of placental derivatives in biomedical research. *Bioact Mater*. 2025;49:456-485. DOI: [10.1016/j.bioactmat.2025.03.011](https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2025.03.011).
- Broere-Brown ZA, Adank MC, Benschop L, Tielemans M, Muka T, Gonçalves R, et al. Fetal sex and maternal pregnancy outcomes: a systematic review and meta-analysis. *Biol Sex Differ*. 2020;11(1):26. DOI: [10.1186/s13293-020-00299-3](https://doi.org/10.1186/s13293-020-00299-3).
- Flowers AE, Gonzalez TL, Wang Y, Santiskulvong C, Clark EL, Novoa A, et al. High-throughput mRNA sequencing of human placenta shows sex differences across gestation. *Placenta*. 2024;150:8-21. DOI: [10.1016/j.placenta.2024.03.005](https://doi.org/10.1016/j.placenta.2024.03.005).

8. Cowell W, Deyssenroth M, Chen J, Wright RJ. Maternal stress in relation to sex-specific expression of placental genes involved in nutrient transport, oxygen tension, immune response, and the glucocorticoid barrier. *Placenta*. 2020;96:19-26. DOI: [10.1016/j.placenta.2020.05.004](https://doi.org/10.1016/j.placenta.2020.05.004).
9. Meakin AS, Clifton VL. Review: Understanding the role of androgens and placental AR variants: Insight into steroid-dependent fetal-placental growth and development. *Placenta*. 2019;84:63-8. DOI: [10.1016/j.placenta.2019.03.006](https://doi.org/10.1016/j.placenta.2019.03.006).
10. Prokopyuk VYu, Loginova OO, Prokopyuk OV, Somova YeV. Vplyv kriokonservovanykh eksplantiv platsenty na vidnovlennia yaiechnykhiv pislia likuvannia perekhrutu. *Svit medytsyny ta biolohii*. 2018;1(63):150-155. DOI: [10.26.724/2079-8334-2018-1-63-150-153](https://doi.org/10.26.724/2079-8334-2018-1-63-150-153). [in Ukrainian].
11. Prokopyuk VYu, Grischenko OV, Prokopyuk OV, Shevchenko NO, Falko OV, Storchak AV, et al. Effect of cryopreserved placental explants on female reproductive system under normal and pathological conditions (experimental study). *Probl Cryobiol Cryomed*. 2017;27(3):250-265. DOI: [10.15407/cryo27.03.250](https://doi.org/10.15407/cryo27.03.250).
12. Parihar A, Kumar A, Panda U, Khan R, Parihar DS, Khan R. Cryopreservation: a comprehensive overview, challenges, and future perspectives. *Adv Biol (Weinh)*. 2023;7(6):e2200285. DOI: [10.1002/adbi.202200285](https://doi.org/10.1002/adbi.202200285).

ПОРІВНЯЛЬНИЙ АНАЛІЗ БІОХІМІЧНОГО ПРОФІЛЮ КРІОКОНСЕРВОВАНИХ ЕКСПЛАНТІВ ПЛАЦЕНТИ ЛЮДИНИ ЗАЛЕЖНО ВІД СТАТІ ПЛОДА

Михальчук Т. В., Прокопюк О. С.

Резюме. У представленому дослідженні оцінювали ефективність криоконсервування експлантів плаценти (ЕП) людини та вплив статі плода на їх біохімічний склад.

Плацентарний матеріал отримували після кесаревого розтину, подрібнювали до фрагментів 3 мм і заморожували у 10% розчині диметилсульфоксиду (ДМСО) на основі середовища DMEM. Заморожування проводили зі швидкістю 1°C/хв до -70°C із подальшим зберіганням у рідкому азоті (-196°C). Розморожування здійснювали у водяній бані при 37°C. Життєздатність клітин оцінювали за допомогою вітального забарвлення нейтральним червоним і трипановим синім. Морфологічну цілісність оцінювали за допомогою гістологічного аналізу зразків, забарвлених гематоксиліном та еозином. Вміст біологічно активних речовин визначали фотометричним методом, а також методом електро- та хемілюмінесцентного імунометричного аналізу.

Результати показали, що криоконсервування з ДМСО забезпечує високий рівень життєздатності клітин і збереження морфологічної структури ворсин плаценти. Негативний контроль, заморожений без криопротектора, демонстрував грубі деструктивні зміни, в той час як транзиторні ознаки ушкоджень у деконсервованих зразках зникали після культивування ЕП протягом 24 годин. Морфологічний аналіз не виявив відмінностей між зразками, отриманими від плодів різної статі.

На відміну від цього, біохімічний аналіз показав суттєві статеві відмінності. Екстракти ЕП від плодів жіночої статі містили вищі рівні альфафетопротеїну, хоріонічного гонадотропіну, лютеїнізуючого гормону, пролактину та загального білка, тоді як у зразках від плодів чоловічої статі спостерігалось підвищення тестостерону та некон'югованого естріолу. Рівень прогестерону та ФСГ залишався низьким і подібним у обох групах. Ці дані свідчать про специфічний вплив статі плода на гормональний та білковий профіль плаценти, що може бути важливо для оптимізації фармакологічних і регенеративних застосувань плацентарних препаратів.

Таким чином, запропонований метод криоконсервування є ефективним для збереження життєздатності клітин та морфології ЕП, а виявлені статеві відмінності у біохімічному складі можуть служити підставою для подальшої персоналізації підходів до використання плацентарного матеріалу.

Ключові слова: плацента, криоконсервування, статевоспецифічні відмінності, експланти плаценти, регенеративна медицина.

COMPARATIVE ANALYSIS OF BIOCHEMICAL PROFILES OF HUMAN PLACENTAL EXPLANTS BY FETAL SEX AFTER CRYOPRESERVATION

Mykhalchuk T. V., Prokopyuk O. S.

Abstract. This study evaluated the effectiveness of cryopreservation of human placental explants (PEs) and the influence of fetal sex on their biochemical composition.

Placental tissue was obtained after cesarean section, minced into 3 mm fragments, and frozen in 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) in DMEM medium. Freezing was performed at a rate of 1°C/min down to -70°C, followed by storage in liquid nitrogen (-196°C). Thawing was conducted in a water bath at 37°C. Cell viability was assessed using vital staining with neutral red and trypan blue. Morphological integrity was evaluated by histological analysis of hematoxylin and eosin-stained sections. The content of biologically active substances was determined using photometric methods as well as electrochemiluminescent and chemiluminescent immunometric assays.

The results demonstrated that cryopreservation with DMSO preserved high cell viability and maintained the morphological structure of placental villi. The negative control, frozen without a cryoprotectant, exhibited severe destructive changes, whereas transient damage in thawed explants disappeared after 24 hours of cultivation. Morphological analysis revealed no differences between explants from male and female fetuses.

In contrast, biochemical analysis revealed significant sex-related differences. Extracts from female fetuses contained higher levels of alpha-fetoprotein, human chorionic gonadotropin, luteinizing hormone, prolactin, and total protein, whereas explants from male fetuses showed elevated levels of testosterone and unconjugated estradiol. Progesterone and follicle-stimulating hormone (FSH) levels remained low and similar in both groups. These findings indicate a specific influence of fetal sex on the hormonal and protein profile of the placenta, which may be important for optimizing pharmacological and regenerative applications of placental-derived preparations.

In conclusion, the proposed cryopreservation method effectively preserves cell viability and morphology of PEs, and the observed sex-dependent differences in biochemical composition can inform personalized approaches to the use of placental material.

Key words: placenta, cryopreservation, sex-specific differences, placental explants, regenerative medicine.

ORCID and contributionship / ORCID кожного автора та його внесок до статті:Mykhalchuk T. V.: <https://orcid.org/0000-0002-6396-470X>^{BCD}Prokopyuk O. S.: <https://orcid.org/0000-0002-3155-7755>^{AEF}**Conflict of interest / Конфлікт інтересів:**

The authors confirm that there is no conflict of interest in this article. / Автори підтверджують, що в даній статті відсутній конфлікт інтересів.

Corresponding author / Адреса для кореспонденції

Mykhalchuk Tetyana Vadymivna / Михальчук Тетяна Вадимівна

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine / Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України

Ukraine, 61000, Kharkiv, 23 Pereiaslavska str. / Україна, 61000, м. Харків, вул. Переяславська 23

Tel.: +380664942452 / Тел.: +380664942452

E-mail: tv.mykhalchuk@gmail.com

A – Work concept and design, B – Data collection and analysis, C – Responsibility for statistical analysis, D – Writing the article, E – Critical review, F – Final approval of the article / A – концепція роботи та дизайн, B – збір та аналіз даних, C – відповідальність за статичний аналіз, D – написання статті, E – критичний огляд, F – остаточне затвердження статті.

This article is distributed under the terms of the **Creative Commons Attribution (CC-BY) License**, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited © All authors, 2026 / Ця стаття розповсюджується на умовах ліцензії **Creative Commons Attribution (CC-BY)**, яка дозволяє необмежене використання, поширення та відтворення в будь-якому форматі за умови належного цитування оригінальної роботи © Всі автори, 2026

Received 26.10.2025 / Стаття надійшла 26.10.2025 року
Accepted 19.02.2026 / Стаття прийнята до друку 19.02.2026 року
Published 27.03.2026 / Опубліковано 27.03.2026 року

DOI 10.29254/2077-4214-2026-1-180-298-309

UDC 616.98:578.834]-074:577.1

¹Narbiekova A. V., ²Voronkova Y. S., ¹Pavlova O. O., ¹Budkova H. V.,¹Simonova O. M., ¹Merzliakova N. V., ³Voronkova O. S.**DYNAMICS OF BIOCHEMICAL MARKERS IN BLOOD IN CORONAVIRUS DISEASE****¹A municipal non-profit enterprise “Pavlohrad Intensive Care Hospital” of the Pavlohrad City Council” (Pavlohrad, Ukraine)****²“Dnipro University of Technology” (Dnipro, Ukraine),****³Oles Honchar Dnipro National University (Dnipro, Ukraine)****voronkova.olga.04@gmail.com**

The pandemic caused by coronavirus disease (COVID-19) is currently one of the most serious and influential problems in modern medicine. It has presented the medical community with a number of important challenges, including studying the dynamics of the disease and developing new approaches to diagnosis and treatment. Biochemical markers have proven to be one of the most convenient tools in such studies, as tracking their dynamics allows for rapid assessment of the patient's condition, prediction of changes, and adjustment of therapeutic strategies to achieve optimal results. The aim of this study was to analyze the dynamics of biochemical markers in the blood of patients with COVID-19 and to establish possible links between their changes and the severity of the disease. Hemostasis system indicators (D-dimer, fibrinogen, activated partial thromboplastin time), as well as C-reactive protein (CRP), procalcitonin, and ferritin were studied. The results showed that CRP levels varied across all age groups regardless of gender, with significantly higher values observed in elderly patients: men – 88.94±9.13, women – 76.49±7.51. In younger patients, CRP levels were lower: men – 41.63±8.95, women – 39.70±5.43, indicating a more pronounced inflammatory response in older age groups. Procalcitonin levels exceeded the norm by 6-7 times. Coagulogram indicators showed an upward trend: D-dimer concentration in elderly and senile patients was as follows: men: 1.750±0.500, women: 1.940±0.300 for the elderly; men: 1.890±0.240, women: 1.910±1.200 for the senile age group, which is almost three times higher than the values in younger groups and indicates an increased risk of thrombosis. Fibrinogen levels were elevated (7.60±0.80 g/L) and accompanied by a slowdown in prothrombin, thrombin, and activated partial thromboplastin times, as well as a significant increase in D-dimer. These changes indicate the activation of hypercoagulable syndrome, which contributes to the formation of blood clots. Studying the characteristics of SARS-CoV-2 in patients with chronic diseases requires taking into account the significant variability of these indicators, therefore, their analysis should be individual and take into account the clinical picture of each patient. This approach allows for a more accurate assessment of the dynamics of the disease and the development of personalized treatment strategies.

Key words: COVID-19, biochemical markers, C-reactive protein, procalcitonin, D-dimer, coagulopathy/hemostasis, disease severity/clinical prognosis.