

Кріоконсервована хоріальна тканина в терапії материнсько-плодової інфекції (клініко-експериментальне дослідження)

UDC 618.2-022.1:615.361.013.84.014.41:616-089.843

V.YU. PROKOPYUK

Cryopreserved Chorionic Tissue in Maternal and Fetal Infection Therapy (Clinical and Experimental Research)

Досліджували кріочутливість хоріальної тканини (ХТ) при різних методах кріоконсервування, вплив ХТ на перебіг і результат вагітності лабораторних тварин. Вивчали ефективність застосування препарату "Платекс-хоріональний" (ПХ) у комплексній терапії материнсько-плодової інфекції (МПІ). Виявлено, що кріопротекторами вибору для заморожування ХТ є ДМСО, а також ДМСО в комбінації з ПЕО-400. Хоріальна тканина не має тератогенних властивостей та позитивно впливає на репродуктивні показники. Застосування ПХ у комплексній терапії МПІ дозволяє поліпшити структуру плаценти, зменшити частоту ускладнень гестаційного процесу і пологів, завдяки чому значно покращується прогноз для матері та новонародженого.

Ключові слова: кріоконсервування, хоріальна тканина, материнсько-плодова інфекція.

Исследовали кріочувствительность хориальной ткани (ХТ) при разных методах кріоконсервирования, влияние ХТ на течение и результат беременности лабораторных животных. Изучали эффективность применения препарата "Платекс-хориональный" (ПХ) в комплексной терапии материнско-плодовой инфекции (МПИ). Показано, что кріопротектором выбора для замораживания ХТ является ДМСО, а также ДМСО в комбинации с ПЭО-400. Хориальная ткань не имеет тератогенных свойств и позитивно влияет на репродуктивные показатели. Использование ПХ в комплексной терапии МПИ позволяет улучшить структуру плаценты, уменьшить частоту осложненных гестационного процесса и родов, благодаря чему значительно улучшается прогноз для матери и новорожденного.

Ключевые слова: кріоконсервирование, хориальная ткань, материнско-плодовая инфекция.

The cryosensitivity of chorionic tissue (CT) under different cryopreservation protocols, CT effect on pregnancy proceeding and outcome in laboratory animals were investigated. The application efficiency of preparation "Platex-chorionic" (PC) in a combined therapy of maternal-fetal infection (MFI) was under study. Both DMSO and that combined with PEO-4000 were shown to be the cryoprotectants of choice for CT freezing. Chorionic tissue has no teratogenic properties and positively affects the reproductive indices. The PC use in a combined therapy of MFI enables to improve placental structure, reduce the morbidity in gestation process and labor, thereby significantly enhancing prognosis for mother and newborn.

Key words: cryopreservation, chorionic tissue, maternal-fetal infection.

За статистичними даними 21% вагітних інфіковані. Існують стерті та латентні форми інфекції, внаслідок яких розвиваються захворювання новонароджених або інфекційні ускладнення в післяпологовому періоді. Крім того, інфекції можуть викликати вади розвитку та загибель плода; багатовіддя; інфекційний процес у плода, новонародженого, вагітної та породіллі; затримку внутрішньочеревного розвитку (ЗВУР), плацентарну дисфункцію (ПД); дистрес плода; метаболічні порушення; ускладнення при пологах та у післяпологовому періоді, які є вагомою частиною материнської і перинатальної захворюваності та смертності [3, 5, 12].

Інфікування – це комплексна проблема материнського та плодового організмів. Навіть коли патогенний мікроорганізм існує тільки в одному з них,

According to statistics 21% of pregnant women are infected. There are subtle and latent infections, due to which the diseases in newborns or infectious complications in puerperal period are in progress. In addition, infections may cause developmental defects and fetal death; hydramnion; infection in fetus, newborn, pregnant and parturient; intrauterine growth restriction (IUGR); placental dysfunction (PD); fetal distress; metabolic disorders; complications in labor and puerperal period, being a large part in maternal and perinatal morbidity and mortality [3, 5, 12].

Infection is a complex problem for mother and fetal organisms. Even when a pathogenic microorganism exists only in one of them, the other has to suffer from toxins, metabolic disorders, endocrine and immune changes. Therefore of expedience is to consider in-

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини
НАН України, м. Харків

ДП "МНЦ кріобіології і кріомедицини НАН, АМН, МОЗ
України", м. Харків

* Адреса для кореспонденції: вул. Переяславська, 23,
м. Харків, Україна 61015; тел.: (+38 057) 373-59-53, факс:
(+38 057) 373-30-84, електронна пошта: prokopyuk@mail.ru

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

Interdepartmental Scientific Center for Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences, Academy of Medical Sciences, Ministry of Health Care of Ukraine, Kharkov, Ukraine

* Address for correspondence: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov,
Ukraine 61015; tel.:+380 57 373 5953, fax: +380 57 373 3084,
e-mail: prokopyuk@mail.ru

інший обов'язково страждає від токсинів, порушень обміну речовин, ендокринних та імунних змін. Тому доцільно розглядати інфекційний процес не окремо у вагітної чи плода, а в цілому – як материнсько-плодову інфекцію (МПІ) [3, 13].

Сучасні схеми лікування МПІ повинні включати не тільки антибактеріальні препарати, але й ті, що спрямовані на корекцію стану фетоплацентарного комплексу (ФПК), розбалансованого внаслідок МПІ [5]. Розповсюдженість інфекційної патології обумовила пошук більш надійних схем профілактики та лікування МПІ [11, 14].

Природним коректором, який відповідає за регуляцію систем матері та плода, взаємодію імунних систем, трофіку, обмін речовин, є хоріальна тканина (ХТ) [10]. В попередніх дослідженнях виявлено лікувальну дію ХТ, обумовлену здатністю синтезувати ряд речовин, яка продовжується після розморожування [9]. Протизапальну дію ХТ забезпечують ендогенні пептидні антибіотики, ензими, а також цитокіни. Ендокринна активність ХТ обумовлена синтезом багатьох гормонів і регуляцією роботи гіпофізу, плаценти, наднирників [10].

Вміст біологічно активних речовин у хоріальній та плацентарній тканині залежить від терміну гестації. Найбільша їх концентрація на одиницю маси ХТ спостерігається в 8–12 тижнів гестації [9, 10]. Тому препарати, виготовлені з ХТ цих термінів гестації зі збереженістю вітальності, повинні мати найбільшу активність.

Препарати плаценти та хоріона застосовують при різних патологічних станах. Доведено їх протизапальну дію, позитивний трофічний ефект, вплив на антитоксичну та синтетичну функції печінки, нормалізацію судинного тону та процесів в нервовій системі [1, 4, 8, 9]. В.М. Босацький [1] довів ефективність застосування консервованої ХТ для лікування хронічних запальних процесів жіночих статевих органів. В.А. Пітько [8] визначив, що кріоекстракт і фрагменти хоріона для лікування підгострих запальних захворювань придатків матки в порівнянні з екстрактом плаценти та традиційної терапії мали достовірно вищі показники клінічної ефективності. За даними І.В. Лахна [4] при застосуванні кріоконсервованої суспензії плаценти для лікування ПД ефект спостерігався вже на 8–9 добу, частота пренатальної патології плода зменшувалася на 45,5%. Тканину плаценти використовували для екстракорпоральної детоксикації у гнійно-септичних хворих. Вже на 3-ю добу відмічали зниження рівня білірубину, креатиніну, ферментів печінки, а також активацію гуморальної ланки імунітету [6].

Такий біологічний матеріал, як ХТ, може бути використано в клініці при гарантії його біологічної безпеки та визначенні біологічної дії. Таку можли-

вість не окремо в вагітній жінці чи плоді, а інтегровано як материнсько-фетальну інфекцію (МФІ) [3, 13].

Actual protocols for MFI treatment should include not only antibacterial preparations, but those, directed to correct the state of fetoplacental complex (FPC), being dysbalanced because of MFI [5]. The infectious pathology spread stipulated the search for more reliable protocols of MFI prevention and treatment [11, 14].

Chorionic tissue (CT) is a natural corrector, responsible for regulation of mother and fetus system, interaction between immune systems, trophism and metabolism [10]. In previous research there was revealed a therapeutic effect of CT, stipulated by its ability to synthesize a number of substances, that lasted after freezethawing as well [9]. Anti-inflammatory action of CT is provided by endogenous peptide antibiotics, enzymes and cytokines as well. The CT endocrine activity is stipulated by synthesis of a number of hormones and activity regulation of hypophysis, placenta and adrenal glands [10].

The content of biologically active substances in chorionic and placental tissues depends on gestation term. Their highest concentration per CT mass unit is observed in 8–12 gestation weeks [9, 10]. Therefore the preparations, produced from CT of these gestation terms with preserved vitality should have the highest activity.

Placental and chorionic preparations are applied in therapy of different pathological states. There are proved their anti-inflammatory action, positive trophic effect, influence on antitoxic and synthetic liver functions, normalization of vascular tonus and processes in nerve system [1, 4, 8, 9]. Bosatsky V.M. [1] has proved the application efficiency for preserved CT in treating chronic inflammatory processes in female genital organs. Pitko V.A. [8] had found the cryoextract and chorionic fragments to have statistically higher indices of clinical efficiency in treating subacute inflammatory diseases of uterine appendages, comparing to application of placenta extracts and traditional therapy. According to the data of Lakhno I.V. [4] when applying cryopreserved suspension of placenta in PD treatment the effect was observed even to the 8th–9th days, the frequency of fetal prenatal pathology reduced by 45.5% [4]. Placental tissue was used for extracorporeal detoxication in purulent-septic patients. Even to the 3rd day there was noted a decreased level of bilirubin, creatinine, liver enzymes, the activation of humoral link of immunity [6].

Such biological material as CT may be used in clinic if guarantying its biological safety and determining biological effect. Such a possibility is provided by low temperature preservation and long-term storage of bioobjects. According to this fact our research was aimed to determine the CT cryosensitivity, experimentally

вість забезпечують низькотемпературне консервування і довгострокове зберігання біооб'єктів. Відповідно до цього метою нашого дослідження було визначення кріочутливості ХТ, експериментальне обґрунтування і розробка схеми лікування МПІ з застосуванням ХТ та оцінка її ефективності.

Матеріали та методи

На I етапі роботи вивчали кріочутливість ХТ людини при різних способах кріоконсервування. Досліджували хоріон людини 8–12 тижнів гестації, який отримували при штучному аборті з інформованої згоди жінки. Виконували гістологічні дослідження (забарвлення гематоксилином і еозином, вітальне забарвлення нейтральним червоним після 20 хв експозиції у 0,005%-му розчині) нативної тканини та після різних програм кріоконсервування. Досліджували ХТ нативну, після кріовпливу та розморожування, а також після експозиції у 10%-му розчині ПЕО-400; 10%-му розчині ДМСО; у кріоконсерванті з 5%-ми ДМСО і ПЕО-400. Кріоконсерванти готували на 0,9% розчині NaCl. Термін експозиції складав 30 хв при 18–20°C. Після експозиції застосовували двохетапне заморожування: повільне до –20°C, потім швидко – занурення у рідкий азот. Кріоконсервовану ХТ зберігали в азоті в середньому 30 діб, розморожували на водяній бані при 40°C. Деконсервовану ХТ також досліджували за допомогою вищезазначених гістологічних методик.

На II етапі роботи вивчали вплив ХТ на організм лабораторних тварин. Експерименти проводили згідно з "Загальними принципами експериментів на тваринах", які затверджені III Національним Конгресом з біоетики (2007, Київ, Україна) та узгоджені з положеннями "Європейської Конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей" (1986, Страсбург, Франція).

Хоріальну тканину (n = 40) отримували гострим шляхом у ранньовагітних шурів лінії Вістар, кріоконсервували з застосуванням у якості кріопротектора 10%-го розчину ДМСО за двохетапною програмою: повільно (до –20°C), потім швидко (занурення у рідкий азот), зберігали у рідкому азоті (–196°C), розморожували при температурі 40°C. Під інфільтраційною анестезією (0,5 мл 0,25%-го розчину новокаїну) ХТ вводили під шкіру тваринам у сформований карман в ділянці правого стегна, розріз ушивали кетгуттом. Самців розподіляли на групи: 1 – невагітні, 2 – вагітні. У кожній групі тварин було по 3 підгрупи: а – хібнооперовані; б – з введенням нативної ХТ підшкірно у дозі 0,2 г/тварину в ділянці спини; в – з введенням кріоконсервованої ХТ (аналогічно методиці, що застосовували в підгрупі б).

substantiate and develop MFI treatment protocols with CT application and its efficiency assessment.

Materials and methods

The cryosensitivity of human CT under different protocols of cryopreservation was under study at the 1st research stage. Human chorion of 8–12 gestation weeks, derived at artificial abortion with informed consent of woman, was analyzed. Histological studies (staining with hematoxylin and eosin, vital staining with Neutral Red after 20 min exposure in 0.005% solution) of native tissue and after application of freeze-thawing were carried-out. Native CT, the tissue after cryo-effect and freeze-thawing, as well as after exposure in 10% PEO-400; 10% DMSO; and in cryopreservative with 5% DMSO and PEO-400 were studied. Cryopreservatives were prepared in 0.9% NaCl solution. The exposure time was 30 min at 18–20°C. After exposure a two-step freezing was applied: slow cooling down to –20°C, then a rapid one via immersion into liquid nitrogen. Frozen CT was stored in nitrogen within 30 days on average, thawing was done in water bath at 40°C. Frozen-thawed CT was also studied using the mentioned above histological techniques.

At the 2nd stage there was studied the CT effect on laboratory animals' organism. The experiments were done according to the General Principles of Experiments in Animals, approved by the 3rd National Congress in Bioethics (Kiev, 2007) and agreed to the statements of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986).

Chorionic tissue (n = 40) was derived by an acute way in early pregnant Wistar rats, cryopreserved with 10% DMSO solution as cryoprotectant according to the two step program: slow cooling (down to –20°C), then a rapid one (immersion into liquid nitrogen), storage in a liquid nitrogen at –196°C, thawing at 40°C. The CT was introduced using an infiltration anesthesia (0.5 ml of 0.25% novocain solution) under animal's skin into a formed pocket at right femur site, the incision was stitched with catgut. The females were divided into the following groups: 1 – not pregnant animals; 2 – pregnant ones. There were 3 subgroups in each animal group: a – pseudooperated animals; b – those with introduced native CT subcutaneously 0.2 g per animal in back site; c – those with introduced frozen-thawed CT (the similar technique as used in sub-group b).

To obtain pregnancy in the group 2 the females were coupled with male in 3:1 ratio a week after CT introduction. For the first day of pregnancy we considered the day of spermatozoa presence in vaginal test. Animals were sacrificed 20 days later. The microsections of placentas, kidneys, liver, spleen, gonads, skin in preparation injection site were histologically studied.

Для отримання вагітності в групі 2 через тиждень після введення ХТ самиць спаровували з самцями у співвідношенні 3:1. Добу знаходження у піхвовій пробі сперміїв вважали першим днем вагітності. Через 20 діб тварин виводили з експерименту. Проводили гістологічне дослідження мікрорізів плацент, нирок, печінки, селезінки, гонад, шкіри в місці введення препаратів. Плоди досліджували за методикою Вільсона [2]. Аномалії скелета вивчали після забарвлення за методом Даусона [2].

Для встановлення або виключення можливої ембріотоксичної і ембріолетальної дії препарату в яєчниках підраховували кількість жовтих тіл, у матці – місць імплантації, резорбції, живих ембріонів; визначали маси плацент та плодів. Передімплантаційну смертність розраховували за формулою $(B-A)/B \times 100$, постімплантаційну – $(B-A)/B \times 100$, загальну ембріональну – $(B-A)/B \times 100$, плацентарний коефіцієнт – $M_{\text{пл}}/M_{\text{п}}$, де А – кількість живих ембріонів; В – кількість місць імплантації; В – кількість жовтих тіл; $M_{\text{пл}}$ – маса плаценти; $M_{\text{п}}$ – маса плода.

Для дослідження впливу ХТ на перебіг вагітності у жінок з МПІ обстежено 55 жінок в строках 16–22 тижні вагітності, які склали 3 клінічні групи: І (контроль) – 20 жінок з фізіологічним перебігом вагітності; ІІ – 20 жінок з діагнозом МПІ, яким проводилася медикаментозна терапія (антибіотики, інфузійна терапія, лікування плацентарної дисфункції); група ІІІ – 15 жінок із діагнозом МПІ, яким призначалась традиційна медикаментозна терапія з застосуванням препарату ПХ. Кріоконсервування і введення ХТ проводили відповідно до протоколу і інструкції до використання “Платекса-хоріонального”. Всіх жінок обстежували згідно з наказом МОЗ України №503 від 28.12.2002 р. “Про удосконалення амбулаторної акушерсько-гінекологічної допомоги”.

Отримані дані аналізували після статистичної обробки в пакеті Statgraphics V.2.1., застосовували критерії Стьюдента, Манна-Уїтні. Різницю вважали вірогідною при $p < 0,05$.

Результати та обговорення

Гістологічні дослідження хоріальної тканини на етапах кріоконсервування характеризували її кріочутливість. У нативній тканині визначено крупні ворсини, які розташовані на невеликій відстані одна від одної. Синцитій двошаровий, спостерігалось місцеве розростання трофобласта, васкуляризована строма, судини розташовані по периферії ворсин. Виявлено осередки екстравакулярного еритропоезу. Строма мала фібробласти, гістіоцити, макрофаги, клітини Кашенка-Гофбауера. У міжворсинчастому просторі розташовані острівці цитотрофобласта, вкриті синцитієм, а також фібриніод. При забарвленні нейтральним червоним у синцитії

Fetuses were analyzed using the Wilson's method [2]. Skeletal abnormalities were studied after staining by Dawson's method [2].

In order to establish or exclude possible embryotoxic or embryoletal effects of CT preparation we calculated a number of yellow bodies in ovaries, implantation sites, resorption, alive embryos in uterus, with determining placentas and fetuses' weight. Preimplantation mortality was calculated according to the following formulae: $(C-A)C \times 100$, the formulae $(B-A)/B \times 100$ was used for postimplantation mortality, and $(C-A)C \times 100$ for total embryonic mortality, the placental coefficient was defined as $W_{\text{pl}}/W_{\text{f}}$, where A is number of alive embryos, B – number of implantation sites, C – number of yellow bodies, W_{pl} – weight of placenta, W_{f} – weight of fetus.

To investigate the CT effect on pregnancy proceeding in women with MFI we examined 55 women with 16–22 pregnancy weeks, which composed 3 clinical groups: the group 1 (control) comprised 20 women with physiological proceeding of pregnancy; in group 2 were 20 women with MFI diagnosis, received pharmacological therapy (antibiotics, infusion therapy, treatment of placental dysfunction); group 3 consisted of 15 women with MFI diagnosis, received traditional pharmacological therapy and PC preparation administration. The CT cryopreservation and introduction were done according to the protocol and specification for “Platex-chorionic” preparation. All the women were examined in terms of the decree of the Ministry of Health Care of Ukraine N503 of 28.12.2002 “About improvement of outpatient obstetrical and gynecological assistance”.

The data obtained were analyzed after statistical processing with Statgraphics V.2.1. by applying Student's and Mann-Whitney's criteria. Difference was considered as statistically significant at $p < 0.05$.

Results and discussion

Histological studies of chorionic tissue at cryopreservation stages characterized its cryosensitivity. In native tissue there were revealed the large villi, located at a short distance from one another. Syncytium was two-layered, a local proliferation of trophoblast, vascularized stroma, vessels, located along the villi periphery, were observed. The foci of extravascular erythropoiesis were found. Stroma had fibroblasts, histocytes, macrophages, Kaschenko-Hofbauer cells. In an intervillous space there were located the islets of cytotrophoblasts, covered with syncytium, as well as fibrinoids. No granules were found in syncytium while staining with Neutral Red; there were some small granules in cytotrophoblast near nucleus; in stromal cells, especially in Kaschenko-Hofbauer ones a distinct granule-formation was observed, testifying to tissue viability. This method confirmed the fact, that CT non-exposed with cryoprotectant CT kept the capability of granule

гранул не виявлено, у цитотрофобласті було декілька невеличких гранул біля ядра, у клітинах строми, особливо в клітинах Кашченка-Гофбауера, спостерігалось чітке гранулоутворення, яке свідчить про життєздатність тканини. За допомогою цього методу було підтверджено, що нативна ХТ без кріопротектора при охолодженні до 0°C зберігала здатність до формування гранул, але після льодоутворення втрачала життєздатність.

У тканині після обробки ПЕО-400 спостерігали зміни: ворсини розташовані менш щільно; строма займала більше простору; судини знаходились ближче до центра; деяка деформація ядерних мембран; невеличке зменшення ядер та їх гіперхромія. Підвищена кількість гранул свідчила про паранекротичний стан тканини внаслідок токсичної дії кріопротектора. Після кровопливу зміни прогресували, спостерігалось відшаровування цитотрофобласта від строми. Забарвлення нейтральним червоним було практично дифузне, гранул небагато і вони виявлялися лише у клітинах Кашченка-Гофбауера.

Після експозиції у розчині ДМСО стан ядер та забарвлення нейтральним червоним близькі до нативних, але ворсини були більші, а простір між ними менший. В деконсервованому препараті строма більш рихла, зменшені міжворсинчасті простори, спостерігалось збільшення гранул у клітинах строми.

При дослідженні хоріона після експозиції з 5%-ми розчинами ДМСО та ПЕО-400 морфологічна картина практично співпадала з такою у зразках, які кріоконсервували з 10%-м розчином ДМСО, спостерігалось гранулоутворення, близьке до нативного, що посилювалось після кровопливу (рисунок).

Отримані дані мають логічне пояснення. Так, ХТ є структурою раннього онтогенезу з переважно ендокринною функцією і унікальною структурою: на сполучнотканинній стромі розташовано 2 шари клітин – цитотрофобласт і синцитій. Для такої специфічної будови і ступеня ембріогенезу ефективними визначено кріопротектори не лише на основі ДМСО, але й композиційні – енто- і екзоцелюлярні (ДМСО і ПЕО-400).

За результатами експериментів були верифіковані позитивний вплив і біобезпечність імплантації ХТ. Безпосередньо після введення ХТ стан тварин відповідав показникам раннього післяопераційного періоду, через 3 години їх активність та апетит відновилися. В операційних ранах тварин усіх груп запальних процесів не виявлено, загоювання відбулося первинним натягінням.

formation after cooling down to 0°C, but lost the viability after ice formation.

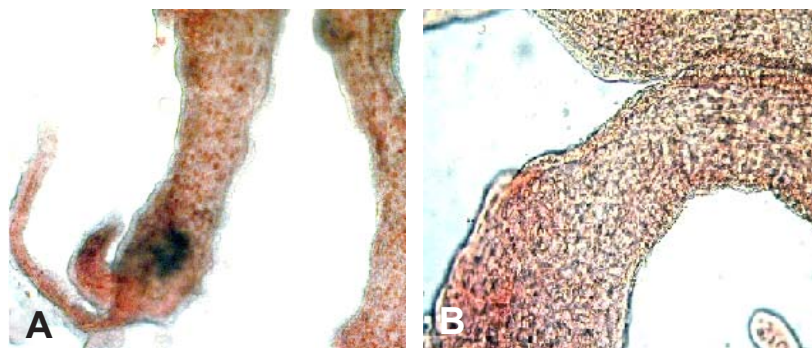
After treating with PEO-400 the following changes in tissue were observed: less tightly located villi; stroma occupied more space; vessels located closer to the center; some deformation in nuclear membranes was present; a slight decrease in nuclei and their hyperchromia was observed. An increased number of granules testified to a paranecrotic state of tissue due to a toxic effect of cryoprotectant. After cryoeffect the changes were in progress, the cytotrophoblast shedding from stroma was observed. Staining with Neutral Red was almost diffuse, granules were in a small number and revealed only in Kashchenko-Hofbauer cells.

After exposure in DMSO solution the state of nuclei and staining with Neutral Red were close to that in native tissue, but the villi were larger and space between them was smaller. In a frozen-thawed preparation more porous stroma was observed, as well as reduced intervillous spaces, increased number of granules in stromal cells.

When studying chorion after exposure with 5% DMSO and PEO-400 a morphological pattern practically coincided with that in the samples, frozen-thawed with 10% DMSO; granule formation was observed, like in the native tissue, and more intense formation after cryoeffect (Figure).

The obtained data could be interpreted logically. So, CT is the structure of early ontogenesis with most endocrine function and unique structure: on a connective-tissue stroma there are 2 cell layers, cytotrophoblast and syncytium. Both DMSO-based cryoprotective solutions and composed ones, containing endo- and exocellular (DMSO and PEO-400) cryoprotectants, were determined as efficient for such a specific structure and embryogenesis rate.

According to the experimental results a positive effect and biosafety of CT implantation were verified. Immediately after CT introduction the state of animals corresponded to the indices of early postoperative pe-



Хоріальна тканина після кріоконсервування з ДМСО (А) та нежиттєздатна ХТ після кровопливу без кріопротектора (В). Забарвлення нейтральним червоним $\times 200$.

Chorionic tissue after cryopreservation with DMSO (A) and unviable CT after cryoeffect without cryoprotectant (B). Staining with Neutral Red $\times 200$.

Гістологічно виявлено збільшення білої пульпи селезінки: кількість лімфатичних фолікулів більша на 20–30%, ніж у хибнооперованих, фолікули великі з тенденцією до злиття. Структура нирок, печінки, нервової тканини у тварин всіх груп без патології.

У невагітних самок після застосування ХТ кількість жовтих тіл збільшувалась на 10–20%, зрілих фолікулів – на 15–30%.

Після проведеного дослідження виявлено позитивний вплив ХТ на репродуктивну функцію дослідних тварин і стан плодів. Кількість жовтих тіл в яєчниках та місць імплантації в матці була більше в групі з ХТ, також збільшувалась кількість живих плодів, що покращило показники виживання серед новонароджених тварин (табл. 1)

У всіх вагітних самок було 8–10 плодів, вага плодів у самок з введенням ХТ – на 12%, а розміри – на 8% більші, ніж у хибнооперованих самиць (табл. 2).

При мікроскопії плацент в групі з ХТ виявлено збільшення кількості мікроворсинок, синцитіальних виростів. Виявлені позитивні зміни більш виражені в групі з введенням кріоконсервованої ХТ, ніж нативної.

При візуальному огляді плодів порушень розвитку, гематом, набряків не виявлено. Будова та розташування внутрішніх органів плодів тварин всіх груп однакові. Стан щелеп, твердого піднебіння, носової порожнини нормальний, без кіст та аномалій. Скелет череп, будова головного мозку були без вад розвитку, кіст і гематом. Горганна частина глотки та стравохід мали типову будову. Спинний мозок розташований у добре розвиненому хребті без розщеплень. Серце мало нормальну будову. При дослідженні печінки виявлено 6 часток. Діафрагма конусоподібна, без порушення цілісності,

riod with recovering 3 hrs later their activity and appetite. No inflammation revealed in operative wounds in the whole animal groups, the healing occurred by the basic intention.

Histological analysis revealed an increased white pulp of spleen: number of lymphatic follicles was 20–30% higher than in pseudooperated animals, follicles were large with a tendency to fusion. No abnormalities were detected in the structure of kidneys, liver, nerve tissue in animals of all the groups.

In non-pregnant females after CT application the number of yellow bodies and mature follicles increased by 10–20% and 15–30%, correspondingly.

After performed research there was found a positive CT effect on reproductive function of experimental animals and state of fetuses. The number of yellow bodies in ovaries and implantation sites in uterus was higher in group with CT, there was also a rise in alive fetuses number, that enhanced the indices of survival among the newborn animals (Table 1).

All the pregnant females had 8–10 fetuses, fetal weight and size in females with CT introduction were by 12 and 8% higher, than in pseudooperated females, correspondingly (Table 2).

An increased number of microvilli and syncytial processes was revealed under microscopy of placentas in the group with CT. The found positive changes were more pronounced in the group with introduction of cryopreserved CT than the native tissue.

No developmental disorders, hematoma, edemas were revealed during visual examination. The structure and location of fetal internal organs in all the animals were equal. The state of jaws, hard palate, nasal cavity was normal without cysts and abnormalities. There were no developmental defects, cysts and hematomae in cranial vault and brain structure. Laryngeal

Таблиця 1. Репродуктивні показники тварин після імплантації нативної та кріоконсервованої ХТ
Table 1. Reproductive indices of animals after implantation of both native and cryopreserved CT

Підгрупа тварин Group of animals	Кількість на одну самицю Number per one female			Летальність,% Lethality,%		
	жовтих тіл corpora lutea	місць імплантації implantation sites	живих плодів alive fetuses	передімплан- таційна pre-implantation	постімплан- таційна post-implantation	загальна ембріональна total
Хибнооперовані Pseudosurgery	12,4 ± 0,3	9,1 ± 0,8	8,6 ± 0,6	24,5 ± 4,6	8,1 ± 2,2	32,6 ± 4,6
Введення нативної ХТ Native CT implantation	12,5 ± 0,5	10,1 ± 0,4	9,4 ± 0,5	12,1 ± 0,7*	5,8 ± 1,5	18,1 ± 2,2*
Введення кріоконсервованої ХТ Frozen-thawed CT implantation	12,6 ± 0,3	10,2 ± 0,4	9,3 ± 0,3	12,0 ± 0,3*	5,9 ± 1,3	18,0 ± 2,2*

Примітка: * – імовірність різниці з підгрупою хибнооперованих тварин ($p < 0,05$).

Notes: * denotes statistically significant difference with subgroup of animals after pseudosurgery ($p < 0.05$).

Таблиця 2. Показники стану фетоплацентарного комплексу після застосування нативної та кріоконсервованої ХТ
Table 2. Indices of fetoplacental complex state after applying native and cryopreserved CT

Підгрупа тварин Group of animals	Довжина плода, см Fetus length, cm	Маса плода, г Fetus weight, g	Маса плаценти, г Placenta weight, g	Плацентарний коефіцієнт Placental coefficient
Хібнооперовані Pseudosurgery	3,4 ± 0,06	2,5 ± 0,05	0,5 ± 0,02	0,19 ± 0,01
Введення нативної ХТ Native CT implantation	3,7 ± 0,05*	2,7 ± 0,07*	0,5 ± 0,01	0,2 ± 0,04
Введення кріоконсервованої ХТ Frozen-thawed CT implantation	3,8 ± 0,05*	2,9 ± 0,05*	0,5 ± 0,03	0,2 ± 0,03

Примітка: * – імовірність різниці з підгрупою хібнооперованих тварин ($p < 0,05$).

Notes: * denotes statistically significant difference with subgroup of animals after pseudosurgery ($p < 0.05$).

грудина добре розвинена. Шлунок заповнено жовтою масою, на розрізі добре видно складки. Підшлункова залоза, нирки, сечові шляхи, кишковик без патології. У плодів жіночої статі добре розвинуті яєчники, піхва, яйцеводи, чоловічої статі – семенники та спермепроводи. Скелет плодів вад не мав.

Отримані експериментальні дані свідчать про те, що ХТ стимулює дозрівання яйцеклітин, овуляцію, розвиток жовтих тіл в яєчниках, при застосуванні у вагітних тварин він не спричиняє тератогенної або ембріотоксичної дії, чинить позитивний трофічний вплив на фетоплацентарний комплекс.

Після ряду досліджень та випробувань [7–9] в Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України спільно з ДП “МНЦ кріобіології та кріомедицини НАН, АМН, МОЗ України” було розроблено препарат ХТ “Платекс-хоріональний” (ПХ), який дозволено до клінічного використання в Україні. Враховуючи те, що препарат є ефективним при комплексному лікуванні інфекційної патології, корекції стану ФПК та при плацентарній дисфункції, на нашу думку, доцільним є його застосування в терапії МПІ.

Клінічними дослідженнями визначено, що введення ПХ пацієнтки переносять позитивно. Скарг на болісність у місці введення ПХ жінки не пред’являли, відзначали покращення сну, апетиту, настрою, зникнення нервового тривожного напруження. Загоювання рани відбувалося первинним натягінням. Алергічних реакцій або ускладнень не спостерігалось. Такий стан обумовлено додатковою секрецією ХТ в організм вагітної репродуктивних ендорфінів, гормональних релізінг-факторів, імуномодуляторів, в першу чергу хоріонічного гонадотропіну.

При аналізі перебігу вагітності було виявлено, що кількість ускладнень вагітності (плацентарна дисфункція, затримка внутрішньоутробного розвитку плода, загроза передчасних пологів, кольпіти) значно зменшилась в групі з застосуванням ХТ (табл. 3).

pharynx and esophagus had a typical structure. Spinal cord was located in well-developed vertebral column without splits. Heart had normal structure. Examined livers had 6 lobes. Diaphragm was cone-shaped, without any disorder in integrity, thorax was well-developed. Stomach was filled with yellow mass with well seen folds in section. No pathology was found in pancreas, kidneys, urinary ducts and intestine. Female fetuses had well developed ovaries, vagina, oviducts; male fetuses had testicles and sperm ducts. No defects in fetal skeletons were found.

The obtained experimental data testify to the fact, that CT stimulates the oocyte maturation, ovulation, development of corpora lutea in ovaries, without causing any teratogenic or embryotoxic effect if applying in pregnant animals, as well as has a positive trophic effect on fetoplacental complex.

After performing a series of research and trials [7–9] at the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of National Academy of Sciences of Ukraine together with the Interdepartmental Scientific Center for Cryobiology and Cryomedicine of National Academy of Sciences, Academy of Medical Sciences, Ministry of Health Care of Ukraine there was developed the CT preparation “Platex-chorionic” (PC), approved for clinical application in Ukraine. Taking into account the fact, that the preparation is efficient under a combined treatment of infectious pathology, correction of FPC state and under placental dysfunction it was considered as expedient for application in MFI therapy.

Clinical trials established the PC introduction as being positively endured by patients. The women had no complaints of pain in sites of PC administration, noted enhancement of sleep, appetite, mood, disappeared nervous anxiety stress. Wound healing was by the basic intention. Neither allergic responses nor complications were observed. This state is stipulated by an additional CT secretion into pregnant organism of reproductive endorphins, hormonal releasing-factors, immune modulators, primarily horionic gonadotropin.

При аналізі перебігу пологів виявлено, що в групі жінок із введенням ХТ у порівнянні з жінками, які отримували традиційну терапію, кількість випадків передчасних пологів, аномалій пологової діяльності, патології III періоду пологів та кесаревого розтину була менша (табл. 4). Отримані результати можна пояснити дією хоріональних гормонів – естрогенів, прогестерону, а також аналогів гіпоталамо-гіпофізарних релізінг-факторів, які в комплексі забезпечують фізіологічність пологового процесу.

Стан новонароджених у групі вагітних після застосування ПХ також був кращим, ніж у групі жінок з традиційним лікуванням. Покращення вітальних показників новонароджених відбулося, в першу чергу, за рахунок зменшення кількості асфіксій і достовірного зменшення гіпоксично-ішемічних уражень центральної нервової системи дітей (табл. 5).

При гістологічному дослідженні плацент жінок після ХТ відмічалось не тільки зменшення кількості патологічних змін, але й збільшення кількості компенсаторних реакцій плаценти (табл. 6).

Імовірно, саме через відновлення структури і функції плаценти відбувалися позитивні зміни в перебігу і результаті вагітності, пологів, а також стану новонароджених.

Analysis of the pregnancy proceeding revealed a significantly decreased number of pregnancy complications (placental dysfunction, intrauterine fetal growth retardation, threatened premature delivery, colpitis) in the group of women with CT administration (Table 3).

When analyzing the labor proceeding it was established, that in the group of women with CT if compared with those, received the standard therapy the number of cases with premature labor, abnormalities in labor activity, pathology in 3rd labor stage and cesarean section was lower (Table 4). The obtained results are likely due to the effect of following chorionic hormones: estrogens, progesterone, as well as the analogues of hypothalamic-pituitary releasing factors, which together provide physiological proceeding of labor.

State of newborns in the group of pregnant women with PC application was also better, than in those with standard treatment. The enhancement of vital indices in newborns occurred firstly due to the reduction of asphyxia number and statistically significant decrease of hypoxic and ischemic damages of central nervous system in children (Table 5).

Placental histology in women after CT application demonstrated not only a reduced number of pathologi-

Таблиця 3. Ускладнення вагітності у жінок груп спостереження
Table 3. Pregnancy complications in women of observation groups

Перебіг вагітності Pregnancy proceeding	Групи пацієнтів Groups of patients					
	I Фізіологічний перебіг вагітності Physiological course of pregnancy		II МПІ, традиційна терапія MFI, standard therapy		III МПІ, традиційна терапія + ПХ MFI, conventional therapy + PC	
	абс. absolute number	%	абс. absolute number	%	абс. absolute number	%
Без ускладнень No complications	16	80	–	–	–	–
Анемія Anemia	3	15	4	20	2	13,3
Загроза передчасних пологів Threatened preterm labor	–	–	8	40	1	6,7*
Гестоз Hestosis	1	5	5	25	2	13,3
Кольпіт Colpitis	–	–	10	50	4	26,6
Пієлонефрит Pyelonephritis	–	–	4	20	2	13,3
ПД PD	–	–	18	90	6	40,2*
ЗВУР IUGR	–	–	6	30	2	13,3

Примітка: * – імовірність різниці між II та III групами ($p < 0,05$).

Notes: * denotes statistically significant difference between groups II and III ($p < 0.05$).

Таблиця 4. Перебіг пологів у жінок груп спостереження
Table 4. Labor proceeding in women of observation groups

Перебіг вагітності Pregnancy proceeding	Групи пацієнтів Groups of patients					
	I Фізіологічний перебіг вагітності Physiological course of pregnancy		II МПІ, традиційна терапія MFI, standard therapy		III МПІ, традиційна терапія + ПХ MFI, conventional therapy + PC	
	абс. absolute number	%	абс. absolute number	%	абс. absolute number	%
Без патології No pathology	16	80	7	35	8	53,3
Передчасні пологи Premature labor	–	–	2	10	1	6,7
Передчасне ізлиття навколоплідної рідини Premature amniorrhea	1	5	7	35	2	13,3*
Аномалії пологової діяльності Labor activity abnormalities	1	5	2	10	1	6,7
Патологічний III період пологів Pathological 3 rd period of labor	–	–	2	10	1	6,7
Кесаріврозтин Cesarean section	1	5	4	20	2	13,3

Примітка: * – імовірність різниці між II та III групами ($p < 0,05$).

Notes: * denotes statistically significant difference between groups II and III ($p < 0.05$).

Таблиця 5. Стан новонароджених у жінок груп спостереження
Table 5. Newborns' state in women from observation groups

Перебіг вагітності Pregnancy proceeding	Групи пацієнтів Groups of patients					
	I Фізіологічний перебіг вагітності Physiological course of pregnancy		II МПІ, традиційна терапія MFI, standard therapy		III МПІ, традиційна терапія + ПХ MFI, conventional therapy + PC	
	абс. absolute number	%	абс. absolute number	%	абс. absolute number	%
Без патологічних змін No pathology	18	90	8	40	8	53,6
Асфіксія середнього ступеня важкості Asphyxia of mean severity level	1	5	3	15	2	13,3
Гіпотрофія Hypotrophy	–	–	6	30	1	6,7
Морфофункціональна незрілість Morphofunctional immaturity	–	–	2	10	1	6,7
Гіпоксично-ішемічне ураження ЦНС Hypoxic and ischemic damage of central nervous system	1	5	4	20	2	13,3*

Примітка: * – імовірність різниці між II та III групами ($p < 0,05$).

Notes: * denotes statistically significant difference between groups II and III ($p < 0.05$).

Таблиця 6. Гістологічні зміни плацент у жінок груп спостереження
Table 6. Histological changes of placenta in women of observation groups

Перебіг вагітності Pregnancy proceeding	Групи пацієнтів Groups of patients					
	I Фізіологічний перебіг вагітності Physiological course of pregnancy		II МПІ, традиційна терапія MFI, standard therapy		III МПІ, традиційна терапія + ПХ MFI, conventional therapy + PC	
	абс. absolute number	%	абс. absolute number	%	абс. absolute number	%
Білі інфаркти плаценти White infarctions of placenta	1	5	5	25	2	13,3
Компенсаторні зміни Compensatory changes	2	10	1	5	9	60*
Дистрофічні, дисциркуляторні зміни Dystrophic, dyscirculatory changes	1	5	5	25	—	—
Лімфоцитарний осередковий хorioамніоніт Lymphocytic focal chorioamnionitis	—	—	1	5	—	—
Серозно-гнійний децидуїт Seropurulent deciduitis	—	—	1	5	—	—
Базальний децидуїт Basal deciduitis	—	—	1	5	1	6,7
Осередковий гнійний інтервезіт Focal purulent interveesitis	—	—	—	—	—	—
Значні фіброзні зміни, кальцинати Significant fibrous changes, calcifications	—	—	1	5	1	6,7
Серозно-гнійний плацентит Seropurulent placentitis	—	—	1	5	—	—
Очагові крововиливи Focal hemorrhages	—	—	1	5	—	—
Інфільтрація коками Infiltration with cocci	—	—	1	5	—	—
Без патологічних змін No pathological changes	26	80	2	10	6	40,2*

Примітка: * – імовірність різниці між II та III групами ($p < 0,05$).

Notes: * denotes statistically significant difference between groups II and III ($p < 0.05$).

Висновки

1. Кріоконсервантами вибору для ХТ при застосуванні двохетапної схеми кріоконсервування є 10%-й розчин ДМСО або комбінація 5%-го розчину ДМСО та 5%-го розчину ПЕО-400.

2. Біологічна дія кріоконсервованої ХТ на організм лабораторних тварин більш виражена, ніж нативної ХТ (в межах даного експерименту).

3. Застосування ХТ стимулює дозрівання яйцеклітин, овуляцію, розвиток жовтих тіл в яєчниках,

cal changes, but a rise in compensatory responses of placenta (Table 6).

Positive changes in proceeding and results of pregnancy, labor, as well as newborn state probably occurred namely due to the recovery of placental structure and function.

Conclusions

1. Cryopreservatives of choice for CT when applying the two-step cryopreservation protocol are 10%

не спричиняє тератогенного ефекту, а також має позитивний трофічний вплив на фетоплацентарний комплекс.

4. Комплексна терапія МПІ з введенням ПХ нормалізує перебіг вагітності, пологів та післяпологового періоду за рахунок зменшення кількості випадків таких ускладнень, як ПД, загроза передчасних пологів, кольпіти, передчасні пологи, аномалії пологової діяльності, патологічний ІІІ період пологів та кесарів розтин.

5. Стан новонароджених у групі вагітних після застосування ПХ покращувався за рахунок зменшення кількості асфіксій, гіпотрофій, морфофункціональної незрілості, гіпоксично-ішемічних уражень ЦНС.

6. При гістологічному дослідженні плацент жінок після застосування ПХ відзначалася менша кількість інфарктів, компенсаторних змін, запальних явищ.

У подальших дослідженнях ми плануємо визначити механізм дії ХТ на фетоплацентарний комплекс.

DMSO or combination of 5% DMSO and 5% PEO-400.

2. Biological effect of cryopreserved CT onto the organism of laboratory animals is more pronounced, than of native CT (under the conditions of this experiment).

3. CT application stimulates the oocyte maturation, ovulation, development of yellow bodies in ovaries, causes no teratogenic effect, as well as has a positive trophic effect on fetoplacental complex.

4. Combined therapy of MFI with PC introduction normalizes the proceeding of pregnancy, labor and postnatal period due to a decrease in such complications as PD, threatened preterm labor, colpitis, premature delivery, abnormalities of labor activity, pathological 3rd labor period and cesarean section.

5. Newborns' state in the group of pregnant with PC administration ameliorated due to a decreased number of asphyxia, hypotrophy, morphofunctional immaturity, hypoxic and ischemic damages of CNS.

6. Histology of placentas from women after PC application demonstrated a lower number of infarctions, compensatory changes, inflammatory phenomena.

In our further research we are going to establish the realization mechanisms of CT effect on fetoplacental complex.

Литература

1. *Босацкий В.М.* Лечение хронических воспалительных заболеваний внутренних женских половых органов подсадками консервированной хориальной ткани ранних сроков беременности: Автореф. дис. ... канд. мед. наук.— Черновцы, 1975.— 20 с.
2. *Дыбан А.П.* Очерки патологической эмбриологии человека.— Л.: Медгиз, 1956.— 228 с.
3. *Кулаков В.И., Орджоникидзе Н.В., Тютюнник В.Л.* Плацентарная недостаточность и инфекция.— М.: Медицина, 2004.— 494 с.
4. *Лакно І.В.* Застосування кріоконсервованої суспензії плаценти для лікування фетоплацентарної недостатності: Автореф. дис. ... канд. мед. наук.— Харків, 1999.— 23 с.
5. *Наказ Міністерства охорони здоров'я України від 27.12.2007 № 906* про затвердження клінічного протоколу з акушерської допомоги "Перинатальні інфекції" [Електронний ресурс] // [Офіційний сайт МОЗ України] <http://moz.gov.ua/ua/main/docs/?docID=7446> (01.05.2011).
6. *Писаревский А.А., Опиненко Н.А., Журавлёв И.В.* Функциональная активность тканей плаценты, селезенки и печени при гнойно-септических заболеваниях в условиях экстракорпоральной детоксикации // Хирургия.— 1998.— №7.— С.40—43.
7. *Одержання, зберігання та застосування фрагментів, суспензій та кріоекстрактів хоріону: Методичні рекомендації* / Н.П. Суббота, В.І. Грищенко, В.А. Питько та ін.— Харків.— 2000.— 12 с.
8. *Питько В.А.* Нові підходи в лікуванні жінок з підгострими запальними захворюваннями придатків матки: Автореф. ... доктора мед. наук.— Харків, 2001.— 36 с.
9. *Прокопюк В.Ю.* Кріочутливість хоріальної тканини та біологічні ефекти її гетеротопічної трансплантації // Трансплантологія.— 2003.— Т. 4, №1.— С. 41—43.
10. *Ширшев С.В.* Иммунология материнско-фетальных взаимодействий.— Екатеринбург: УрО РАН, 2009.— 584 с.
11. *Brito V., Niederman M.S.* Pneumonia complicating pregnancy // Clin. Chest. Med.— 2011.— Vol. 32, N1.— P. 121—132.

References

1. *Bosatsky V.M.* Treatment of chronic inflammatory diseases of internal female genitals by engraftment of preserved chorionic tissue of early gestation terms: Author's abstract of thesis of cand. of med. sci.— Chernovtsy, 1975.— 20 p.
2. *Dyban A.P.* Essay on human pathological embryology.— Leningrad: Medgiz, 1956.— 228 p.
3. *Kulakov V.I., Ordzhonikidze N.V., Tyutyunnik V.L.* Placental insufficiency and infection.— Moscow: Meditsina, 2004.— 494 p.
4. *Lakhno I.V.* Application of cryopreserved placental suspension to treat fetoplacental insufficiency: Author's abstract of thesis of cand. of med. sci.— Kharkiv, 1999.— 23 p.
5. *Decree of the Ministry of Health Care of Ukraine of 27.12.2007 N 906* on approval of clinical protocol for obstetric assistance "Perinatal infections" [Electronic resource] // [Official site of the Ministry of Health Care of Ukraine] <http://moz.gov.ua/ua/main/docs/?docID=7446> (01.05.2011).
6. *Pisarevsky A.A., Opinenko N.A., Zhuravlev I.V.* Functional activity of placental tissue, spleen and liver in purulent-septic diseases under extracorporal detoxification // Khirurgiya.— 1998.— N7.— P. 40—43.
7. *Procurement, storage and application of chorionic fragments, suspensions and cryoextracts: methodical recommendations* / N.P. Subbota, V.I. Grischenko, V.A. Pitko et al.— Kharkov.— 2000.— 12 p.
8. *Pitko V.A.* New approaches in treating women with subacute inflammatory diseases of uterine appendages: Author's abstract of thesis of doctor of med. sci.— Kharkov.— 2001.— 36 p.
9. *Prokopyuk V.I.* Cryosensitivity of chorionic tissue and biological effects of its heterotopic transplantation // Transplantation.— 2003.— Vol. 4, N1.— P. 41—43.
10. *Shirshov S.V.* Immunology of maternal and fetal interactions.— Yekaterinburg: Ural Branch of Russian Academy of Sciences, 2009.— 584 p.

12. *Ganert M., Been J.V., Gavilanes A.W. et al.* Chorioamnionitis: a multiorgan disease of the fetus? // *J. Perinatol.*– 2010.– Vol. 30, Suppl.– P. S21–30.
13. *Goldenberg R.L., Culhane J.F., Johnson D.C.* Maternal infection and adverse fetal and neonatal outcomes // *Clin. Perinatol.*– 2005.– Vol. 32, N3.– P. 523–559.
14. *Vrchnis N., Vitoratos N., Iliodromiti Z. et al.* Intrauterine inflammation and preterm delivery // *Ann. N.-Y. Acad. Sci.*– 2010.– Vol. 1205.– P. 118–122.
11. *Brito V., Niederman M.S.* Pneumonia complicating pregnancy // *Clin. Chest. Med.*– 2011.– Vol. 32, N1.– P. 121–132.
12. *Ganert M., Been J.V., Gavilanes A.W. et al.* Chorioamnionitis: a multiorgan disease of the fetus? // *J. Perinatol.*– 2010.– Vol. 30, Suppl.– P. S21–30.
13. *Goldenberg R.L., Culhane J.F., Johnson D.C.* Maternal infection and adverse fetal and neonatal outcomes // *Clin. Perinatol.*– 2005.– Vol. 32, N3.– P. 523–559.
14. *Vrchnis N., Vitoratos N., Iliodromiti Z. et al.* Intrauterine inflammation and preterm delivery // *Ann. N.-Y. Acad. Sci.*– 2010.– Vol. 1205.– P. 118–122.

Надійшла 04.05.2011
Рецензент С.І. Легач

Accepted 04.05.2011