

... КЛІТИННА БІОЛОГІЯ ... CELL BIOLOGY ...

DOI: 10.26565/2075-5457-2024-43-8

УДК: 576.5:[615.361:615.451.1:611.013.8]:616-003.93:57.017.3](045)

Порівняння впливу кріоекстракту пуповини та його ліофілізованої форми на адгезивні, проліферативні та метаболічні властивості різних типів клітин

А.І. Каверінська, В.Ю. Прокопюк

У дослідженні проведено порівняльний аналіз впливу кріоекстракту пуповини та його ліофілізованої форми на функціональні характеристики різних типів клітин, зокрема фібробластів, нервових клітин, спленоцитів і клітин фетальної печінки. Метою було визначити можливість використання кріоекстракту пуповини як альтернативи фетальній бичачій сироватці (fetal bovine serum, FBS), що традиційно застосовується для стимуляції клітинного росту, але використання якої супроводжується етичними та безпековими обмеженнями. Кріоекстракт пуповини є багатим на біоактивні компоненти, здатні підвищувати адгезивну, проліферативну та метаболічну активність клітин, показав свою ефективність як заміник сироватки в культивуванні різних типів клітин, що робить його перспективним для широкого застосування в клітинних технологіях та регенеративній медицині.

Результати експериментів показали, що кріоекстракт пуповини значно покращує адгезивні та проліферативні властивості клітин порівняно з іншими досліджуваними умовами. Фібробласти демонстрували високу адгезію та швидку міграцію за умов додавання кріоекстракту, що надає переваги для потенційного використання у відновленні сполучнотканинної стромы різних органів та шкіри. Нервові клітини показали збільшення життєздатності та стабільності, в порівнянні з FBS, що робить екстракт пуповини перспективним для застосування в нейрореєнеративних технологіях. Крім того, кріоекстракт виявив значний позитивний вплив на клітини фетальної печінки, підвищуючи їхню метаболічну активність та адгезію, що відкриває можливості для досліджень у галузі печінкової регенерації. Вплив на спленоцити також був позитивним, що свідчить про можливість його застосування для підтримки імунної функції в умовах, де потрібна регуляція імунної відповіді. Ліофілізат кріоекстракту, у свою чергу, продемонстрував обмежений позитивний вплив, зокрема на адгезивні та проліферативні властивості, і був менш ефективним у порівнянні з кріоекстрактом. Його додавання до культур нервових клітин та фібробластів, призводило до зниження адгезії та міграційної активності, що свідчить про необхідність оптимізації процесу ліофілізації для збереження біологічної активності екстракту. Тим не менш, стабільність ліофілізованого екстракту та його здатність до тривалого зберігання робить його корисним для ситуацій, де важливі збереження біоактивних компонентів і тривалий термін придатності.

Таким чином кріоекстракт пуповини є перспективною альтернативою FBS, його використання може забезпечувати необхідну підтримку росту, адгезії та проліферації клітин. Однак, технологія отримання ліофілізату кріоекстракту пуповини потребує подальшого вдосконалення для досягнення такої ж ефективності, як у кріоекстракту. Подальші дослідження повинні зосередитися на детальному вивченні механізмів дії кріоекстракту, а також на оптимізації методів ліофілізації, щоб адаптувати цей продукт до потреб клітинних технологій та регенеративної медицини, що дозволить ширше використовувати його для стимуляції регенерації тканин та відновлення функціональної активності різних органів.

Ключові слова: первинна клітинна культура, пуповина, кріоекстракт, ліофілізація

Цитування: Каверінська А.І., Прокопюк В.Ю. Порівняння впливу кріоекстракту пуповини та його ліофілізованої форми на адгезивні, проліферативні та метаболічні властивості різних типів клітин. Вісник Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна. Серія «Біологія», 2024, 43, с. 96-104. <https://doi.org/10.26565/2075-5457-2024-43-8>

Про авторів:

Каверінська А.І. – Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, вул. Переяславська, 23, Харків, Україна, 61016, kaverinskaanna@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-3414-1656>

Прокопюк В.Ю. – Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, вул. Переяславська, 23, Харків, Україна, 61016, v.yu.prokopiuk@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-4379-4130>

Подано до редакції: 02.10.2024 / Прорецензовано: 10.11.2024 / Прийнято до друку: 19.11.2024

Вступ

В останні роки активно вивчається можливість застосування екстрактів плаценти, зокрема кріоекстрактів та ліофілізатів, для подовження часу збереження цих екстрактів (Prokopiuk, Falko et al., 2018; Shen et al., 2022). Використання екстракту пуповини є актуальним для використання в якості

альтернативи мезенхімальним стовбуровим клітинам (МСК), які виділяються з пуповини та згодом використовуються в регенеративній медицині (Li et al., 2014; Chen et al., 2020). Наприклад, було показано, що МСК з пуповини здатні послаблювати запалення та підтримувати відновлення тканин завдяки своїй паракринній дії (Galieva et al., 2017).

Отримання кріоекстракту не потребує використання високотехнологічних умов чи складного обладнання, що робить цей процес доступним і економічно вигідним. Використання доступних лабораторних методів, таких як трипсинізація та центрифугування, дозволяє отримати кріоекстракт із збереженням біоактивних компонентів, необхідних для підтримки життєздатності та функціональної активності клітин. Це відкриває перспективи для широкого застосування кріоекстракту в регенеративній медицині та клітинних технологіях як альтернативного фактору росту, який може замінити фетальну бичачу сироватку (FBS), широко застосовувану для стимуляції адгезії, проліферації та життєздатності клітин. Ліофілізація, як метод збереження біологічних речовин, також дає змогу створювати препарати, стабільні для тривалого зберігання (Ward, Matejschuk, 2021; Akers, 2015), однак вплив ліофілізату пуповини на клітини вивчено недостатньо.

Дослідження було спрямоване на порівняння впливу кріоекстракту пуповини та його ліофілізованої форми на адгезивні, проліферативні, метаболічні та міграційні властивості первинних культур фібробластів, нервових клітин, спленоцитів та клітин фетальної печінки. Кожен тип клітин має свої унікальні характеристики за культивування, відображаючи властивості тих органів з яких виділені клітини, таким чином дослідження дозволить виявити перспективи використання кріоекстракта пуповини та ліофілізата кріоекстракта пуповини. Визначення ефективності цих кріоекстрактів у підтримці росту і функціональності клітин дозволить оцінити їх потенціал у клітинних технологіях та регенеративній медицині як можливих замінників FBS або стовбурових клітин.

Матеріали та методи

Дослідження здійснювали на первинних культурах клітин різних типів, зокрема фібробластів, нервових клітин, спленоцитів та клітин фетальної печінки. Культуру фібробластів отримували з ембріональної шкіри мишей BALB/c (термін гестації 18-20 тижнів) (Prokopyuk, Onishchenko et al., 2021). Після вилучення ембріонів зі шкіри виділяли фрагменти (1-3 мм) та проводили трипсинізацію (0,25 % трипсин і 0,02 % EDTA у фосфатно-сольовому буфері, pH 7,4-7,6) на магнітній мішалці протягом 40 хв. Отриману суспензію фільтрували через 100 мкм стерильний фільтр, ресуспендували у середовищі DMEM («Biowest», Франція) з 10% FBS (Lonza, Німеччина) та 1% розчину антибіотиків та антимікотика («Biowest», Франція), висівали на флакони 25 см² (SPL, Республіка Корея), культивували в стандартних умовах, і, після досягнення моношару, пересівали. Для досліджень використовували клітини третього пасажу. Первинну культуру нервових клітин виділяли з головного мозку новонароджених мишей (Prokopyuk, Chub et al., 2017). Після обробки стерильним PBS - Phosphate buffered saline («Biowest», Франція) та подрібнення, здійснювали трипсинізацію (0,125 % трипсин-EDTA, 10 хв), фільтрували суспензію, ресуспендували у DMEM («Biowest», Франція) з 10% FBS (Lonza, Німеччина) та розчином антибіотиків та антимікотика («Biowest», Франція) і висівали у флакони на 25 см² (SPL, Республіка Корея). Спленоцити отримували з селезінки мишей BALB/c (Prokopiuk, Falko et al., 2018; Nayak, Mengi, 2010; Obaydi et al., 2020), яку після видалення промивали PBS («Biowest», Франція), подрібнювали та фільтрували. Суспензію ресуспендували у DMEM («Biowest», Франція) з 10% FBS (Lonza, Німеччина) та розчином антибіотиків та антимікотика («Biowest», Франція). Для отримання культури клітин фетальної печінки новонароджених мишей BALB/c, тканину подрібнювали та обробляли трипсином. Суспензію фільтрували, ресуспендували у DMEM («Biowest», Франція) з 10% FBS (Lonza, Німеччина) і розчином антибіотиків та антимікотика («Biowest», Франція), висівали на флакони 25 см² (SPL, Республіка Корея) та пересівали після досягнення моношару.

Пуповину отримували в умовно стерильних умовах під час пологів, обробляли фосфатно-сольовим буфером для видалення еритроцитів, гомогенізували з PBS, заморожували до -80°C для руйнування клітин, відтаювали, центрифугували, надосад (кріоекстракт) зберігали при -80°C. Для ліофілізації використовували охолодження до -80°C з подальшим сушінням в установці Alpha 1-2 LDplus, після чого зразки зберігали 3 місяці при +8°C.

Для оцінки впливу досліджуваних речовин клітини переносили у 24-лункові планшети (концентрація 2×10⁵/лунку) та культивували у DMEM при 37°C, 100% вологості і 5% CO₂. У дослідженні виділяли чотири групи: контрольна 1 - група DMEM, 2 - DMEM+FBS, 3 - DMEM з додаванням кріоекстракту пуповини (КП) та 4 - DMEM з додаванням ліофілізованого КП (ЛКП).

Речовини стандартизували за вмістом білка (концентрація 0,1 мг/мл) (Kim et al., 2013).

Оцінку клітинної морфології, конфлюентності та адгезивності проводили через добу культивування (Yildiz et al., 2023). Для дослідження клітинної міграції застосовували скретч-тест (Hulkower, Herber, 2011), а для оцінки життєздатності клітин та функціонального стану мітохондрій використовували МТТ тест (Sukhodub et al., 2024) та тест подвоєння популяції (Culenova et al., 2021; Priyadarshini et al., 2021). Для оцінки впливу кріоекстракту пуповини та ліофілізату кріоекстракту пуповини на різні типи клітин було використано такі методи: для фібробластів проводили оцінку адгезивних характеристик, конфлюентності моношару, тест подвоєння популяції, МТТ-тест та скретч-тест; для нервових клітин застосовували методи оцінки адгезивних характеристик, конфлюентності моношару та МТТ-тест; для спленоцитів використовували лише МТТ-тест. Оцінка впливу зразків на клітини фетальної печінки проводилася тими ж методами, що й для фібробластів. Обробку мікроскопічних зображень здійснювали у програмах ToupView V 3.7 (Hangzhou ToupTek Photonics Co. Ltd, Hangzhou, China) та ImageJ V.1.48. (National Institutes of Health, USA), а статистичний аналіз виконували з використанням Past V.3.15 (University of Oslo, Norway), застосовуючи U критерій Мана-Уїтні.

Результати та обговорення

На мікрофотографіях представлено морфологічні особливості різних типів клітин. На Рис. 1а видно фібробласти з характерною веретеноподібною, витягнутою формою, які рівномірно розподілені й утворюють щільний моношар без видимих проміжків, що свідчить про 100% конфлюентність. У забарвлених за методом Романовського фібробластах (Рис. 2а) чітко візуалізуються їхні витягнуті ядра, що підтверджує їх морфологічну ідентичність. На Рис. 1б показано нервові клітини з типовою морфологією: серед них помітні витягнуті клітини з численними відростками (аксони і дендрити) та округлі клітини, ймовірно, тіла нейронів або гліальні клітини. Розподіл нервових клітин нерівномірний, і вони знаходяться в процесі формування міжклітинних зв'язків, характерного для розвитку нейронної мережі; конфлюентність шару складає менше 100%, оскільки між клітинами помітні проміжки. На забарвлених зразках нервових клітин (Рис. 2б) можна розрізнити окремі морфологічні деталі, зокрема добре помітні відростки, що відповідають аксонам і дендритам. На Рис. 1в продемонстровані клітини фетальної печінки з полігональною формою, які згруповані й оточені радіальними структурами, що свідчить про активне формування міжклітинних зв'язків. Конфлюентність їхнього моношару наближається до 100%, проте залишаються незначні проміжки між окремими групами клітин. При забарвленні за Романовським (Рис. 2в) виявляються чіткі контури клітин фетальної печінки та добре помітні міжклітинні структури, що відображають процеси активного формування міжклітинних контактів у культурі.

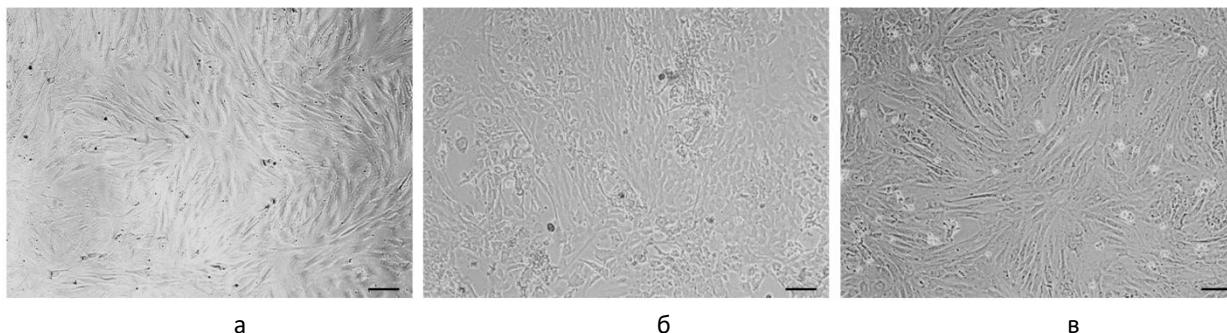


Рис. 1. Мікрофотографії моношарів фібробластів (а), нервових клітин (б), клітин фетальної печінки (в) після доби культивування. Фазовий контраст, масштаб лінійки 100 мкм.

Fig. 1. Microphotographs of fibroblast monolayers (a), nerve cells (б), and fetal liver cells (в) after one day of culture. Phase contrast, scale bar 100 μ m.

Фібробласти. Отримані результати аналізу адгезивних властивостей (Рис. 3а) показали, що ліофілізат кріоекстракту пуповини пригнічує адгезію клітин в 2 рази в порівнянні з клітинами, які культивувались лише у DMEM. Результати тесту подвоєння популяції фібробластів (Рис. 3б) продемонстрували, що час подвоєння клітинної популяції у клітин, культивованих із додаванням FBS та кріоекстракту пуповини, був приблизно однаковим і складав 20 годин. Водночас ліофілізований

кріоекстракт пуповини призвів до подвоєння цього часу, що статистично відрізнялося від обох контрольних груп. Для фібробластів, культивованих лише в середовищі без добавок, час подвоєння склав 55 годин. Було виявлено стимулюючий вплив кріоекстракту пуповини на метаболічну активність фібробластів (Рис 3в). Ліофілізат, у свою чергу, продемонстрував, близькі до контрольного зразка DMEM, без значних змін у метаболічній активності фібробластів. Результати скретч-тесту (Рис. 3г) показали очікуваний ефект для фібробластів, культивованих із додаванням FBS, що прискорила їхню міграцію, досягнувши близько 60% закриття подряпини, тоді як без сироватки цей показник становив близько 10%. Найвищу ефективність продемонстрував кріоекстракт пуповини, який забезпечив закриття подряпини приблизно на 80%, що на 20% перевищує результат культивування фібробластів в DMEM з додаванням FBS. Отже, додавання кріоекстракту пуповини значно посилило здатність до закриття подряпини у фібробластів, перевершуючи ефект FBS. Ліофілізат пуповини показав близький результат до FBS, досягнувши близько 70% закриття подряпини.

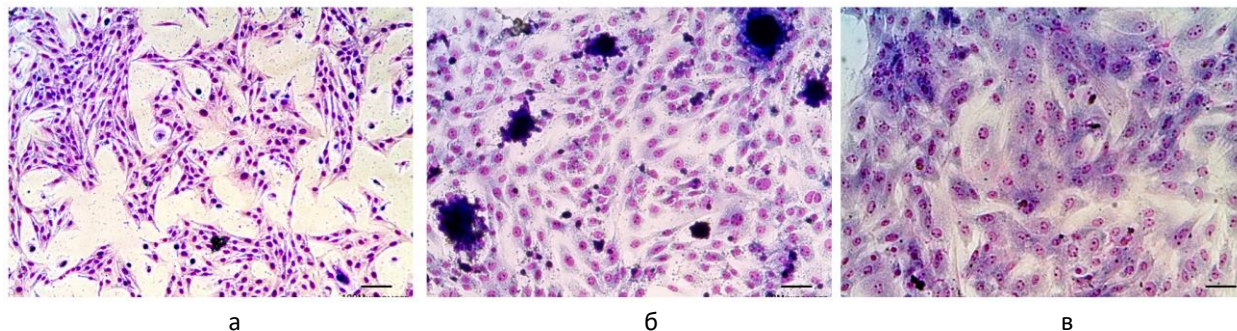


Рис. 2. Мікрофотографія моношарів фібробластів (а), нервових клітин (б), клітин фетальної печінки (в) після доби культивування. Фарбування за Романовським, масштаб лінійки 100 мкм (а) та 50 мкм (б, в).

Fig. 2. Microphotograph of monolayers of fibroblasts (a), nerve cells (б), fetal liver cells (в) after one day of cultivation. Romanowski staining, scale bar 100 μ m (a) and 50 μ m (б, в).

Нервові клітини. Досліджувані речовини позитивно впливали на адгезивні властивості нервових клітин; показник кількості адгезованих клітин при додаванні екстракту пуповини був на рівні з FBS, хоч і трохи нижчий. У той же час, ліофілізат -80 спричинив зменшення кількості адгезованих клітин порівняно з нервовими клітинами, культивованими без додавання FBS та становить 20% (Рис. 4а). Згідно з результатами МТТ-тесту (Рис. 4б), екстракт пуповини та контрольна група з FBS мали однаковий вплив на життєздатність клітин. У той час, як показник МТТ-тесту для ліофілізату залишився на рівні контрольної групи, де клітини культивувалися лише на базовому середовищі без додаткових факторів.

Спленоцити. Оцінка життєздатності спленоцитів проводилась методом МТТ-тесту. Результати контрольних груп показали, що присутність FBS сприяє покращенню функціонального стану мітохондрій, забезпечуючи високу життєздатність спленоцитів (Рис. 5). Подібний позитивний ефект було виявлено в групі з додаванням кріоекстракту пуповини. Додавання ліофілізату продемонструвало середній показник життєздатності порівняно з чистим середовищем та середовищем з FBS. Це свідчить, що екстракт пуповини може використовуватись як фактор росту для культивування спленоцитів.

Клітини фетальної печінки. Найбільш виражений позитивний вплив на адгезивні властивості клітин фетальної печінки був виявлений при застосуванні FBS та кріоекстракту пуповини, тоді як ліофілізат показав найнижчий результат адгезованих клітин (Рис. 6а). Рисунок 6б демонструє результати часу подвоєння популяції клітин фетальної печінки. Найдовший час подвоєння, близько 25 годин, відзначався у клітин, що культивувалися в базовому середовищі, що є очікуваним показником. Для клітин фетальної печінки, вирощених із додаванням FBS та кріоекстракту пуповини, час подвоєння склав приблизно 18 годин, що на 1,4 рази швидше, ніж у середовищі без додаткових факторів. Ліофілізат кріоекстракту показав час подвоєння, подібний до середовища без факторів, становлячи 23 години. Усі досліджувані зразки не продемонстрували значних відмінностей у показниках оптичної щіль-

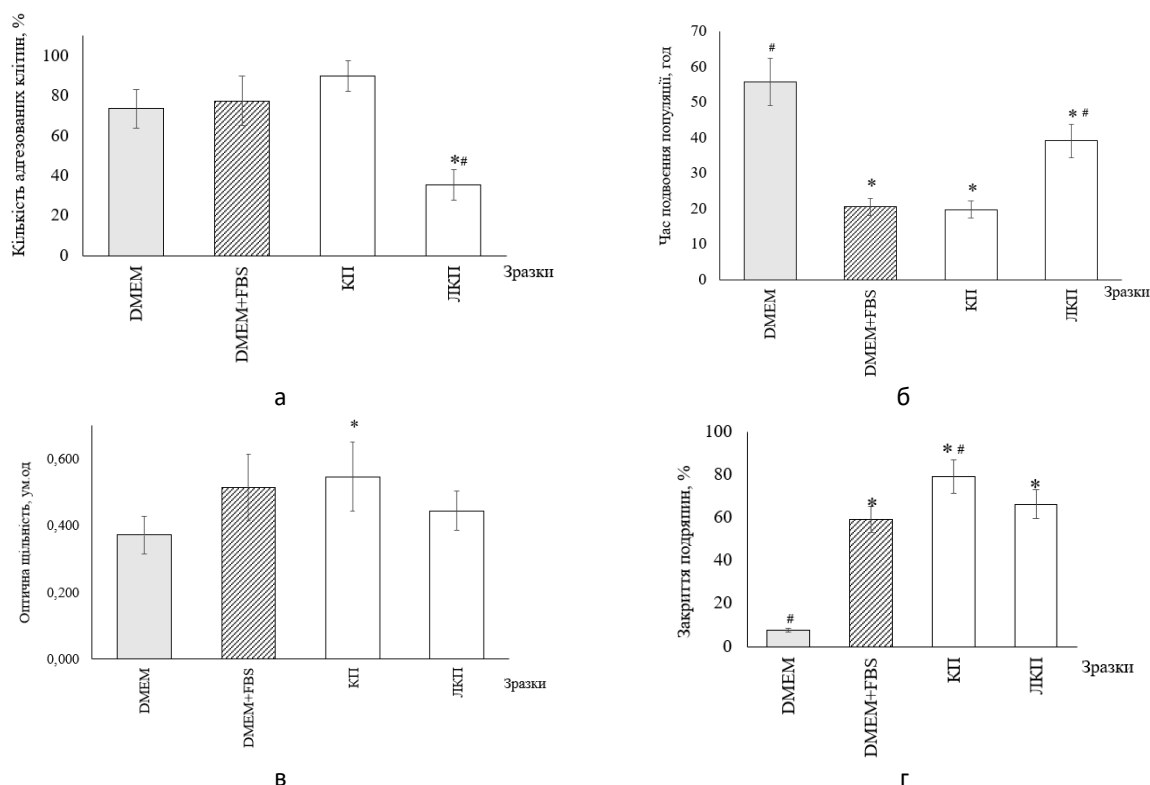


Рис. 3. Результати отримані на фібробластах в присутності досліджуваних речовин: а – адгезія клітин, %; б – тест подвоєння популяції клітин, год; в – МТТ тест, ум.од.; г – скретч тест, %. * – показник статистично значуще відрізняється від контролю, що культивували без додавання речовин, $p < 0,05$; # – показник статистично значуще відрізняється від контролю, що культивували з FBS, $p < 0,05$.

Fig. 3. The results obtained on fibroblasts in the presence of the tested substances: а - cell adhesion, %; б - cell population doubling test, hours; в - MTT test, C.U.; г - scratch test, %. * - the indicator is statistically significantly different from the control cultivated without the addition of substances, $p < 0.05$; # - the indicator is statistically significantly different from the control cultivated with FBS, $p < 0.05$.

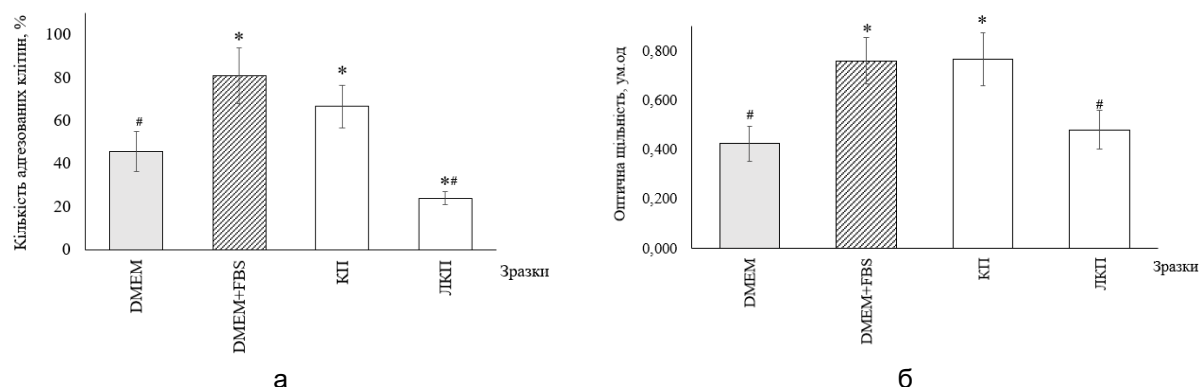


Рис. 4. Результати отримані на нервових клітинах в присутності досліджуваних речовин: а – адгезія клітин, %; б – МТТ тест, ум.од. * – показник статистично значуще відрізняється від контролю, що культивували без додавання речовин, $p < 0,05$; # – показник статистично значуще відрізняється від контролю, що культивували з FBS, $p < 0,05$.

Fig. 4. The results obtained on nerve cells in the presence of the test substances: а - cell adhesion, %; б - MTT test, C.U. * - the indicator is statistically significantly different from the control cultured without the addition of substances, $p < 0.05$; # - the indicator is statistically significantly different from the control cultured with FBS, $p < 0.05$.

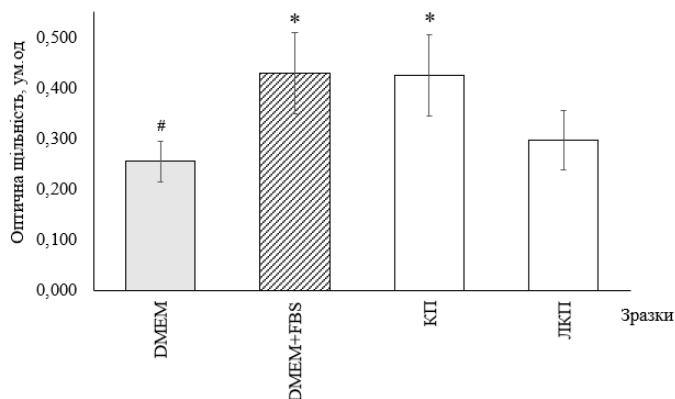


Рис. 5. Показники МТТ тесту спленоцитів в присутності досліджуваних речовин, ум. од. * – показник статистично значуще відрізняється від контролю, що культивували без додавання речовин, $p < 0,05$; # – показник статистично значуще відрізняється від контролю, що культивували з FBS, $p < 0,05$.
Fig. 5. MTT test results of in the presence of the tested substances, C.U. * – the indicator is statistically significantly different from the control cultured without the addition of substances, $p < 0.05$; # - the indicator is statistically significantly different from the control cultured with FBS, $p < 0.05$.

ності (Рис. 6в). Жоден із зразків не спричинив зниження метаболічної активності клітин фетальної печінки, що свідчить про відсутність токсичного впливу на клітини.

Контрольні результати скретч-тесту для клітин фетальної печінки були очікуваними: середовище з FBS майже втричі прискорило міграцію клітин. За допомогою скретч-тесту було встановлено, що ліофілізат пуповини майже не стимулює міграційну активність, так само як і середовище без додавання FBS. Водночас кріоекстракт пуповини підвищує міграцію клітин, забезпечуючи закриття подряпини приблизно на 70%, тоді як клітини, культивовані з FBS, закривають понад 80% (Рис. 6г).

Обговорення

Результати показали, що кріоекстракт пуповини значно перевищує ліофілізовану форму за ефективністю впливу на досліджувані клітини. У фібробластів додавання кріоекстракту пуповини сприяло підвищенню адгезії та міграційної активності, що узгоджується з раніше отриманими даними про позитивний вплив, наприклад екстрактів плаценти на проліферацію фібробластів шкіри, що відображає вплив на регенеративні процеси (Cho et al., 2008), підвищення проліферації та міграційної активності фібробластів при додаванні кріоекстракту пуповини (Shevchenko et al., 2023). Також результати дослідження кріоекстракту пуповини на оваріоектомованих щурах свідчать про зменшення проявів старіння, при цьому описується, що епідерміс та дерма стали товщими та спостерігалась проліферація клітин (Falko et al., 2024). Зокрема, у тесті на подвоєння популяції клітини, оброблені кріоекстрактом пуповини, показали аналогічні результати до групи FBS, що підтверджує його стимулюючий вплив на проліферацію. Ліофілізована форма кріоекстракту демонструє хороший результат міграційної активності клітин, цей показник дещо нижчий від кріоекстракту, однак на рівні з FBS.

Щодо нервових клітин, обидва досліджувані зразки також показали сприятливий вплив на адгезивні та метаболічні властивості. Проте кріоекстракт виявився більш ефективним у підтримці життєздатності клітин, про що свідчать результати МТТ-тесту. Це підтверджує його потенціал як компонента для культивування нейронних культур та підтверджує його нейропротекторний ефект, який також було виявлено у іншому дослідженні при використанні екстракту плаценти на нервові клітини, при цьому підвищувалась метаболічна активність клітин та екстракт плаценти захищав нервові клітини від токсичного впливу глутамату та сприяв відновленню після пошкодження (Prokoryuk, Chub et al., 2017).

Для спленоцитів кріоекстракт пуповини продемонстрував суттєве покращення функціонального стану мітохондрій, що є важливим показником для подальшого використання екстракту в імунологічних дослідженнях. Це збігається з результатами дослідження екстракту плаценти, який у поєднанні з кондиційованими середовищами знижував метаболічну активність спленоцитів та активність реакції бласттрансформації лімфоцитів, особливо при використанні

кріоконсервованих плацентарних клітин і експлантів (Prokopiuk, Falko et al., 2018). Ліофілізат у даному випадку продемонстрував помірний ефект, однак залишався менш ефективним у порівнянні з кріоекстрактом та FBS.

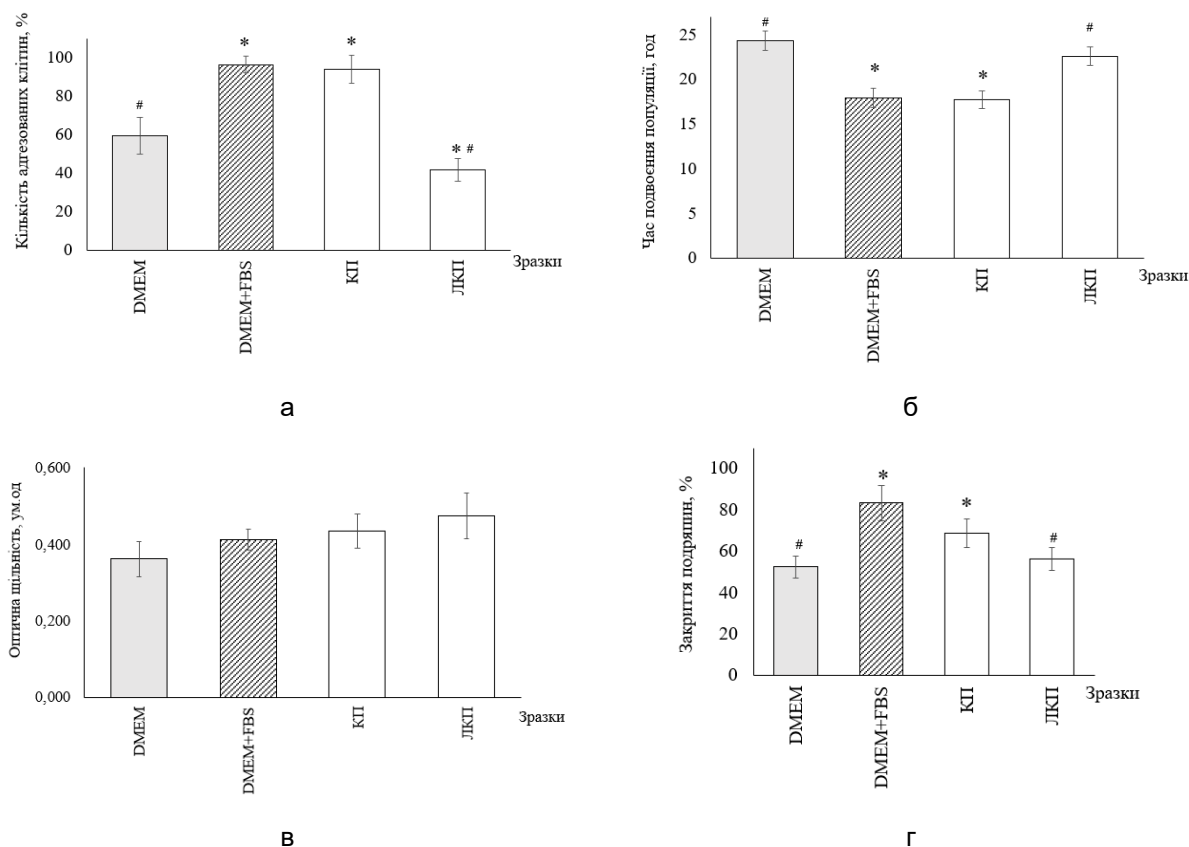


Рис. 6. Результати отримані на клітинах фетальної печінки в присутності досліджуваних речовин: а – адгезія клітин, %; б – тест подвоєння популяції клітин, год; в – МТТ тест, ум.од.; г – скретч тест, %. * – показник статистично значуще відрізняється від контролю, що культивували без додавання речовин, $p < 0,05$; # – показник статистично значуще відрізняється від контролю, що культивували з FBS, $p < 0,05$.

Fig. 6. The results obtained on fetal liver cells in the presence of the test substances: a - cell adhesion, %; б - cell population doubling test, hours; в - MTT test, C.U.; г - scratch test, %. * - the indicator is statistically significantly different from the control cultivated without the addition of substances, $p < 0.05$; # - the indicator is statistically significantly different from the control cultivated with FBS, $p < 0.05$.

Аналіз впливу на клітини фетальної печінки показав, що кріоекстракт пуповини позитивно впливає на адгезію та проліферацію, хоча міграційна активність залишалася дещо нижчою порівняно з групою FBS. Наприклад МСК отримані з пуповини послаблюють вплив аутоімунного гепатиту (Wei et al., 2023). Відомо, що екстракт плаценти має великий терапевтичний потенціал при захворюваннях печінки, таких як гепатит, фіброз та жирова дистрофія печінки (Shen et al., 2022). Результати оцінки здатності до адгезії демонструють пригнічення адгезії при культивуванні в середовищі з додаванням ЛКП. Це може бути пов'язано з денатурацією білків, яка відбувається під час процесу ліофілізації. Видалення водного оточення, що стабілізує природну конформацію білків, призводить до їхньої структурної нестабільності. Внаслідок цього білки втрачають здатність до правильного зв'язування з клітинами, що знижує їхні адгезивні властивості (Matejtschuk, 2007).

Висновки

В результаті проведеного дослідження було виявлено, що кріоекстракт пуповини показав перспективи як заміник FBS, оскільки він значно підсилює адгезію, проліферацію та метаболічну активність клітин, зокрема фібробластів, нервових клітин, клітин фетальної печінки та спленоцитів,

що робить його корисним для відновлення тканин шкіри, нервової та імунної систем. Натомість ліофілізат показав нижчу активність, зокрема у стимулюванні клітинної адгезії, але є ефективним для загоєння ран, завдяки позитивному впливу на фібробласти, і може бути корисним там, де важлива стабільність і тривалий термін зберігання. Перспективи подальших досліджень мають бути зосереджені на вивченні механізмів дії кріоекстракту та оптимізації ліофілізації для ширшого застосування у регенеративній медицині.

Список літератури / References

- Akers M. J. (2015). Basic Principles of Lyophilization, Part 1. International journal of pharmaceutical compounding, 19(6), 471–476.
- Al Obaydi, M. F., Hamed, W. M., Al Kury, L. T., Talib, W. H. (2020). Terfezia boudieri: A Desert Truffle With Anticancer and Immunomodulatory Activities. Frontiers in nutrition, 7, 38. <https://doi.org/10.3389/fnut.2020.00038>
- Chen, K. H., Shao, P. L., Li, Y. C., Chiang, J. Y., Sung, P. H., Chien, H. W., Shih, F. Y., Lee, M. S., Chen, W. F., Yip, H. K. (2020). Human Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cell Therapy Effectively Protected the Brain Architecture and Neurological Function in Rat After Acute Traumatic Brain Injury. Cell transplantation, 29, 963689720929313. <https://doi.org/10.1177/0963689720929313>
- Cho, H. R., Ryou, J. H., Lee, J. W., Lee, M. H. (2008). The effects of placental extract on fibroblast proliferation. Journal of cosmetic science, 59(3), 195–202.
- Culenova, M., Nicodemou, A., Novakova, Z. V., Debreova, M., Smolinská, V., Bernatova, S., Ivanisova, D., Novotna, O., Vasicek, J., Varga, I., Ziaran, S., Danisovic, L. (2021). Isolation, Culture and Comprehensive Characterization of Biological Properties of Human Urine-Derived Stem Cells. International journal of molecular sciences, 22(22), 12503. <https://doi.org/10.3390/ijms222212503>
- Falko O., Shevchenko N., Volina V., Terekhova O., Prokopyuk O., Kaverinska A., Karpenko V., Prokopyuk V. (2024). Cryopreserved Umbilical Cord Extract Restores the Skin Structure in Ovariectomized Rats. Problems of Cryobiology and Cryomedicine, 34(1), 33-44. <https://doi.org/10.15407/cryo34.01.033>
- Galieva, L. R., Mukhamedshina, Y. O., Arkhipova, S. S., Rizvanov, A. A. (2017). Human Umbilical Cord Blood Cell Transplantation in Neuroregenerative Strategies. Frontiers in pharmacology, 8, 628. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00628>
- Hulkower, K. I., Herber, R. L. (2011). Cell migration and invasion assays as tools for drug discovery. Pharmaceutics, 3(1), 107–124. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics3010107>
- Kim, S. M., Moon, S. H., Lee, Y., Kim, G. J., Chung, H. M., Choi, Y. S. (2013). Alternative xeno-free biomaterials derived from human umbilical cord for the self-renewal ex-vivo expansion of mesenchymal stem cells. Stem cells and development, 22(22), 3025–3038. <https://doi.org/10.1089/scd.2013.0067>
- Li, W., Ye, B., Cai, X. Y., Lin, J. H., Gao, W. Q. (2014). Differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells into prostate-like epithelial cells in vivo. PloS one, 9(7), e102657. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102657>
- Matejtschuk P. (2007). Lyophilization of proteins. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.), 368, 59–72. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-362-2_4
- Nayak, S., Mengi, S. (2010). Immunostimulant activity of noni (Morinda citrifolia) on T and B lymphocytes. Pharmaceutical biology, 48(7), 724–731. <https://doi.org/10.3109/13880200903264434>
- Priyadarshini, P., Samuel, S., Kurkalli, B. G., Kumar, C., Kumar, B. M., Shetty, N., Shetty, V., Vishwanath, K. (2021). In vitro Comparison of Adipogenic Differentiation in Human Adipose-Derived Stem Cells Cultured with Collagen Gel and Platelet-Rich Fibrin. Indian journal of plastic surgery : official publication of the Association of Plastic Surgeons of India, 54(3), 278–283. <https://doi.org/10.1055/s-0041-1733810>
- Prokopiuk V. Yu., Falko O. V., Karpenko V. G., Chub O. V., Loginova O. O. (2018). Influence of native and cryopreserved placental derivatives on the splenocyte functional characteristics in vitro. Вісник проблем біології і медицини, Вип. 2 (144), 221–224. [Doi:10.29254/2077-4214-2018-2-144-221-224](https://doi.org/10.29254/2077-4214-2018-2-144-221-224)
- Prokopyuk V., Onishchenko A., Yefimova S., Chumachenko T., Kavok N., Maksimchuk P., Klochkov V., Tkachenko A. (2021). Cytotoxicity Tests on Cultured Rat Skin Fibroblasts Revealed no Toxicity for Low Concentrations of GdYVO4:Eu3+ Nanoparticles. IEEE 11th International Conference Nanomaterials: Applications Properties (NAP), 1-4. [Doi: 10.1109/NAP51885.2021.9568547](https://doi.org/10.1109/NAP51885.2021.9568547).
- Prokopyuk V. Yu., Chub O. V., Shevchenko M. V., Prokopyuk O. S. (2017). Placental stem cells, organotypic culture and human placenta extract have neuroprotective activity in vitro. Cell and Organ Transplantation, 5(1), 39-42. <https://doi.org/10.22494/cot.v5i1.67>
- Shen, L. H., Fan, L., Zhang, Y., Zhu, Y. K., Zong, X. L., Peng, G. N., Cao, S. Z. (2022). Protective Effect and Mechanism of Placenta Extract on Liver. Nutrients, 14(23), 5071. <https://doi.org/10.3390/nu14235071>
- Shevchenko N., Terekhova O., Kaverinska A., Prokopiuk O., Lazurenko V., Prokopiuk V. (2023). Evaluation of Effectiveness of Umbilical Cord Cryoextract in Aesthetic Medicine (in Vitro Study). Problems of Cryobiology and Cryomedicine, 33(2), 133-8. <https://doi.org/10.15407/cryo33.02.133>

- Sukhodub L., Kumeda M., Sukhodub L., Tsyndrenko O., Petrenko O., Prokopiuk V., Tkachenko A. (2024). The effect of carbon and magnetic nanoparticles on the properties of chitosan-based neural tubes: Cytotoxicity, drug release, In Vivo nerve regeneration. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, 8:100528. <https://doi.org/10.1016/j.carpta.2024.100528>
- Ward, K. R., Matejtschuk, P. (2021). The Principles of Freeze-Drying and Application of Analytical Technologies. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 2180, 99–127. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0783-1_3
- Wei, X., Cheng, X., Luo, Y., Li, X. (2023). Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells Attenuate S100-Induced Autoimmune Hepatitis via Modulating Th1 and Th17 Cell Responses in Mice. *Stem cells international*, 2023, 9992207. <https://doi.org/10.1155/2023/9992207>
- Yildiz, H., Sen, E., Dalcik, H., Meseli, S. E. (2023). Evaluation of cell morphology and adhesion capacity of human gingival fibroblasts on titanium discs with different roughened surfaces: an in vitro scanning electron microscope analysis and cell culture study. *Folia morphologica*, 82(1), 63–71. <https://doi.org/10.5603/FM.a2022.0072>

Comparison of the effects of umbilical cord cryoextract and lyophilized form on the adhesive, proliferative, and metabolic properties of various cell types

A.I. Kaverinska, V.Yu. Prokopiuk

The objective was to ascertain the potential of cryo-umbilical cord extract as an alternative to fetal bovine serum (FBS), which is conventionally employed to stimulate cell growth but is subject to ethical and safety constraints. The umbilical cord cryo-extract is a rich source of bioactive components that have been demonstrated to enhance the adhesive, proliferative and metabolic activity of cells. Furthermore, it has been shown to be an effective substitute for serum in the cultivation of various cell types, making it a promising candidate for use in cellular technology and regenerative medicine. The findings of the experimental study demonstrated that the cryoextract of the umbilical cord exhibited a notable enhancement in the adhesive and proliferative attributes of the cells, when compared to the other conditions that were investigated. The fibroblasts demonstrated high adhesion and rapid migration in the presence of the cryoextract, which provides advantages for potential use in the restoration of the connective tissue stroma of various organs and skin. The nerve cells demonstrated enhanced viability and stability in comparison to FBS, which renders the umbilical cord cryoextract a promising candidate for incorporation into neuroregenerative technologies. Furthermore, the cryoextract exhibited a substantial beneficial impact on fetal liver cells, augmenting their metabolic activity and adhesion, thereby opening avenues for investigation into liver regeneration. The effect on splenocytes was also favorable, indicating that it can be employed to bolster immune function in circumstances where immune response regulation is necessary. The lyophilized cryoextract demonstrated a limited positive effect, particularly in relation to its adhesive and proliferative properties. However, this effect was less pronounced than that observed in the cryoextract. The addition of the lyophilized cryoextract to nerve cells and fibroblasts resulted in a reduction in adhesion and migration activity, indicating the necessity for optimization of the lyophilization process to preserve the biological activity of the extract. However, the stability of the lyophilized cryoextract and its capacity for long-term storage render it a valuable resource in situations where the preservation of bioactive components and a prolonged shelf life are of significance. Thus, cord cryoextract represents a promising alternative to FBS, which has the potential to provide the necessary support for cell growth, adhesion and proliferation. Nevertheless, the technology employed in the production of cryo-umbilical cord extract lyophilization must undergo further refinement in order to attain the same efficacy as that observed in cryoextract. Further research should concentrate on a comprehensive examination of the mechanisms of action of cryoextract, in addition to the optimization of lyophilization techniques to adapt this product to the requirements of cell technology and regenerative medicine. This will facilitate its wider application in the stimulation of tissue regeneration and the restoration of functional activity in various organs.

Key words: primary cell culture, umbilical cord, cryoextract, lyophilization.

Cite this article: Kaverinska A.I., Prokopiuk V.Yu. (2024). Comparison of the effects of umbilical cord cryoextract and lyophilized form on the adhesive, proliferative, and metabolic properties of various cell types. *The Journal of V. N. Karazin Kharkiv National University. Series Biology*, 43, p. 96-104. <https://doi.org/10.26565/2075-5457-2024-43-8> (in Ukrainian)

About the authors:

A.I. Kaverinska — Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, 23 Peryaslavska St., Kharkiv, Ukraine, 61016, kaverinskaanna@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-3414-1656>
 V.Yu. Prokopiuk — Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, 23 Peryaslavska St., Kharkiv, Ukraine, 61016, v.yu.prokopiuk@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0003-4379-4130>

Received: 02.10.2024 / Revised: 10.11.2024 / Accepted: 19.11.2024