

UDC 612.649.011.87:611.018.2/6:615.014.41:599.323.4

А.К. Гулевский\*, А.А. Лаврик, А.В. Трифонова, В.Г. Карпенко

## Влияние низкомолекулярной фракции (до 5 кДа) кордовой крови человека на ростовые свойства культуры мезенхимальных стромальных клеток, подвергнутых криоконсервированию

UDC 612.649.011.87:611.018.2/6:615.014.41:599.323.4

A.K. Gulevsky\*, A.A. Lavrik, A.V. Trifonova, V.G. Karpenko

## Influence of Low-Molecular Fraction (Up To 5 kDa) of Human Cord Blood on Growth Properties of Culture of Mesenchymal Stromal Cells Subjected to Cryopreservation

**Реферат:** Исследовано влияние криоконсервирования на ростовые свойства мезенхимальных стромальных клеток (МСК) человека и крысы, а также способность фракции (до 5 кДа) кордовой крови человека (ФККЧ) влиять на эти показатели в деконсервированных культурах. Показано, что под действием фракции до 5 кДа кордовой крови человека происходит нормализация индекса пролиферации культуры деконсервированных МСК крысы, чего не наблюдалось в культуре МСК человека. Также при включении в ростовую среду фракции до 5 кДа кордовой крови человека в культурах МСК крысы и человека происходит увеличение относительного содержания колониобразующих единиц фибробластов (КОЕ-Ф) большего размера (КОЕ-Ф<sub>>50</sub>). Использование сред, содержащих фракцию до 5 кДа кордовой крови человека, также способствует повышению сниженного после криоконсервирования митотического индекса культур МСК крысы и человека. Эффективность действия низкомолекулярной фракции кордовой крови человека зависела от состояния самих клеток и ее концентрации в среде культивирования.

**Ключевые слова:** криоконсервирование, фракция до 5 кДа кордовой крови человека, колониобразование, мезенхимальные стромальные клетки, митотический индекс, человек, крыса.

**Реферат:** Досліджено вплив криоконсервування на ростові властивості мезенхімальних стромальних клітин (МСК) людини і щура, а також здатність фракції (до 5 кДа) кордової крові людини (ФККЛ) впливати на ці показники у деконсервованих культурах. Показано, що під дією фракції до 5 кДа кордової крові людини відбувається нормалізація індексу проліферації культури деконсервованих МСК щурів, чого не спостерігалось в культур МСК людини. Також при включенні в ростове середовище фракції до 5 кДа кордової крові людини в культурах МСК щура та людини відбувається збільшення відносного вмісту колонієутворюючих одиниць фібробластів (КУО-Ф) більшого розміру (КУО-Ф<sub>>50</sub>). Використання середовищ, що містять фракцію до 5 кДа з кордової крові людини, також сприяє підвищенню зниженого після криоконсервування митотичного індексу культур МСК щура та людини. Ефективність дії низкомолекулярної фракції кордової крові людини залежала від стану самих клітин та її концентрації в середовищі культивування.

**Ключові слова:** криоконсервування, фракція до 5 кДа кордової крові людини, колонієутворення, мезенхімальні стромальні клітини, проліферація, митотичний індекс, людина, щур.

**Abstract:** The influence of cryopreservation on the growth characteristics of human and rat mesenchymal stromal cells (MSCs) and the ability of a fraction (up to 5 kDa) of human cord blood to influence these indices in frozen-thawed ed cultures has been investigated. It is shown that under the effect of the human cord blood fraction (HCBF) of up to 5 kDa, the index of culture proliferation of the preserved rat MSC was normalized, which was not observed in the culture of human MSCs. As well, when a fraction of up to 5 kDa derived from the human cord blood is included into the growth medium, in the cultures of rat and human MSCs, an increase in the relative content of CFU-F was found (CFU-F<sub>>50</sub>). The use of media containing the human cord blood fraction of up to 5 kDa also contributed to an increase in the reduced after cryopreservation mitotic index of the rat and human MSCs. The efficiency of the effect of low weight molecular fraction of human cord blood depended on the state of the cells themselves and on their concentration in the culture medium.

**Key words:** cryopreservation, human cord blood fraction of up to 5 kDa, colony formation, mesenchymal stromal cells, proliferation, mitotic regimen.

Известно, что низкотемпературное криоконсервирование является одним из этапов технологии клеточной терапии. В процессе криоконсервирования многие клетки могут получить нелетальные повреждения: обратимое нарушение барьерной, транспортной и рецепторной функ-

Low-temperature preservation is known to be one of the stages in the cell-based therapy. During cryopreservation many cells can be non-lethally damaged. These are reversible disorders in the barrier, transport and receptor functions of the plasma membrane; changes in the ratio of membrane-bound

Відділ холодової адаптації, Інститут проблем кріобіології та кріомедицини НАН України, Харків

Department of Cold Adaptation, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

\*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:

вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61016;  
тел.: (+38 057) 373-74-35, факс: (+38 057) 373-59-52  
електронна пошта: profgulevskyy@gmail.com

\*To whom correspondence should be addressed:

23, str. Pereyaslavska, Kharkiv, Ukraine 61016;  
tel.: +380 57 373 7435, fax: +380 57 373 5952,  
e-mail: profgulevskyy@gmail.com

Надійшла 04.04.2017

Прийнята до друку 22.05.2018

Received April, 04, 2017

Accepted May, 22, 2018

© 2018 A.K. Gulevsky et al. Published by the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ций плазматической мембраны; изменение баланса мембраносвязанных и растворенных ферментов, а также некоторых субстратов биохимических реакций; нарушение целостности внутриклеточных мембранных структур и процесса синтеза белка [13]. С целью предотвращения повреждения клеток, кроме адекватного выбора криопротекторов и оптимального режима криоконсервирования, после замораживания-отогрева клеточных суспензий используют регенерирующие среды [4]. Для восстановления жизнедеятельности клеток важно быстро нормализовать их энергетический обмен. Клетки, перенесенные из целостного организма в условия *in vitro*, не контролируются нейрогуморальной системой. При этом они приобретают метаболические, морфологические и генетические особенности, обусловленные как самим фактом их извлечения, так и условиями существования вне организма.

Известно, что применяемые в регенеративной медицине для лечения широкого спектра патологий методы, которые основаны на трансплантации мезенхимальных стромальных клеток (МСК), зачастую предусматривают неоднократное их введение реципиенту, иногда со значительным временным интервалом [7, 8]. В сфере биотехнологии и клеточной трансплантологии весьма актуальна разработка универсальной питательной среды для культивирования клеток, включающей стандартный комплекс различных ростовых факторов и цитокинов. После добавления в бессывороточную среду для культивирования сыворотки крови крупного рогатого скота, фетальной сыворотки крови животных, сыворотки крови человека, в том числе и сыворотки кордовой крови, изменяется пролиферативная активность клеток [12].

В наших предыдущих работах [6] было показано, что способностью повышать пролиферативные показатели различных деконсервированных клеточных культур, в том числе и культуры МСК [5], а также функциональную активность лейкоцитов человека после криоконсервирования обладает низкомолекулярная фракция (до 5 кДа) из криогемолизата кордовой крови крупного рогатого скота [4]. Вероятно, что наблюдаемые эффекты имеют место не только из-за содержания в указанных фракциях необходимых для нормального метаболизма клеток субстратов, но и влияния неидентифицированных факторов, которые, воздействуя на рецепторы клеточных мембран, ферменты цитоплазмы и митохондрий, способствуют сохранению структурно-функциональных свойств клеток, даже в условиях дефицита энергетических и пластических субстратов. Установлено [10], что фракция до 5 кДа, полученная из кордовой крови человека,

and solubilized enzymes, as well as of certain substrates for biochemical reactions; impaired integrity of intracellular membrane structures and protein synthesis [5]. To prevent cell damage, in addition to an adequate choice of cryoprotective agents (CPAs) and optimal cryopreservation regimen, regenerating media are used after freeze-thawing of cell suspensions [8]. It is crucial to normalize quickly the energy metabolism inside the cells for recovery of their functions. The cells transferred from a whole organism to *in vitro* conditions are not controlled by the neurohumoral system. In this case, the cells acquire metabolic, morphological and genetic peculiarities, pre-determined both by the fact of their isolation and by the conditions of existence beyond the body.

It is known that the methods used in regenerative medicine for the treatment of a wide range of pathologies, which are based on the transplantation of mesenchymal stromal cells (MSCs), often require their repeated administration to the recipient, sometimes with a significant time interval [11, 12]. In biotechnology and cell transplantation, it is very important to develop an optimal nutrient medium for cell culture, including a standard combination of various growth factors and cytokines. After adding into serum-free medium for culturing of bovine blood serum, animal fetal blood serum, human blood serum, including the serum of cord blood, the proliferative activity of cells is changed [2].

We have shown previously [10] that the low molecular weight fraction (up to 5 kDa) derived from cryohemolysate of bovine cord blood has increased the proliferative indices of various frozen-thawed cell cultures, including the culture of MSCs [9], as well as functional activity of human leukocytes after cryopreservation [8]. The observed effects likely occur not only due to the content of substrates in the specified fractions, but also because of the influence of unidentified factors, affecting the receptors of cell membranes, cytoplasm and mitochondrial enzymes and in this way contributing to the preservation of the structural and functional properties of cells, even if energetic and structural substrates are insufficient. It has been established [13] that the fraction up to 5 kDa, obtained from human cord blood, also has a pronounced biological activity and stimulated the growth of MSC cultures, not subjected to cryopreservation. Due to the results obtained, we can assume that a regenerating medium, in which a low molecular weight fraction derived from human cord blood is present, will be effective for the recovery of cryopreserved MSCs.

The purpose of this work was to study the ability of the fraction up to 5 kDa, obtained from human



также обладает выраженной биологической активностью и стимулирует рост культур МСК, не подвергавшихся криоконсервированию. На основании полученных результатов можно предположить, что регенерирующая среда, в которой присутствует низкомолекулярная фракция, полученная из кордовой крови человека, будет эффективна для восстановления криоконсервированных МСК.

Цель данной работы – изучение способности фракции до 5 кДа, полученной из кордовой крови человека, восстанавливать свойства культур мезенхимальных стромальных клеток человека и крысы после криоконсервирования.

### Материалы и методы

Объектом исследования служили МСК, выделенные из костного мозга человека и костного мозга лабораторной крысы по стандартному протоколу [14]. Для проведения экспериментов клетки криоконсервировали после 3–4-х пассажей и использовали сразу после размораживания. Криоконсервирование МСК осуществляли в среде с фетальной телячьей сывороткой (FBS) под защитой 5% ДМСО по стандартной двухэтапной программе, предусматривающей замораживание клеточной суспензии со скоростью 1 град/мин до  $-80^{\circ}\text{C}$  с последующим погружением в жидкий азот [10]. Культивирование МСК проводили в среде DMEM/F12 (1:1) с добавлением 10% FBS при посевной концентрации  $10^4$  кл/см<sup>2</sup>.

Фракцию с м. м. компонентов ниже 5 кДа получали методом ультрафильтрации из цельной кордовой крови человека, подвергнутой криодеструкции путем медленного замораживания до  $-80^{\circ}\text{C}$  и последующего медленного отогрева при комнатной температуре [5]. Перед применением лиофилизированную фракцию кордовой крови человека (ФККЧ) разводили средой DMEM из расчета 40 мг/мл и добавляли в среду культивирования до конечного ее содержания в среде 56, 112, 224 и 400 мкг/мл. Контролем служили культуры деконсервированных МСК, которые культивировали без добавления ФККЧ. Показатели криоконсервированных МСК (индекс пролиферации, процентное содержание колониеобразующих единиц фибробластов большого и малого размеров) сравнивали с аналогичными показателями культур МСК, не подвергавшихся криоконсервированию.

Сохранность клеток после криоконсервирования определяли экспресс-методом окрашивания витальным красителем трипановым синим [9].

Ростовые свойства культуры оценивали на 3-и сутки культивирования по индексу пролифе-

cord blood, to restore the properties of cultures of human and rat mesenchymal stromal cells after cryopreservation.

### Materials and methods

The research was done in the MSCs, isolated from human bone marrow and bone marrow of laboratory rats according to the standard protocol [14]. For the experiments the cells were cryopreserved after 3–4 passages and used immediately after the thawing. MSCs were cryopreserved in a medium with fetal bovine serum (FBS) under the protection of 5% DMSO according to a standard two-stage program, which foresees the cell suspension freezing at a cooling rate of 1 deg/min down to  $-80^{\circ}\text{C}$  followed by an immersion into liquid nitrogen [13]. The MSCs were cultured in DMEM / F12 medium (1:1) supplemented with 10% FBS at a seeding concentration of  $10^4$  cells/cm<sup>2</sup>.

A fraction with the molecular weight of the components below 5 kDa was obtained by ultrafiltration from the whole human cord blood, subjected to cryodestruction by slow freezing down to  $-80^{\circ}\text{C}$  and subsequent slow warming at room temperature [9]. Before use, the lyophilized human cord blood fraction (HCBF) was diluted with DMEM to concentration of 40 mg/ml and added to the culture medium to final concentrations of 56, 112, 224 and 400  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . The controls were the cultures of frozen-thawed MSCs, cultured without adding the HCBF. The indices of cryopreserved MSCs (proliferation index, percentage of colony-forming units of large and small fibroblasts) were compared with those of the MSCs cultures not subjected to cryopreservation.

The preservation rate of cells after cryopreservation was determined by the express method of staining with Trypan Blue Dye [3].

Growth properties of the culture were assessed to day 3 of culturing according to the proliferation index (PI), mitotic index (MI), and the number of colony-forming fibroblast units (CFU-F), *i. e.* at the time of activation of cell division under the influence of HCBF [9]. PI and MI were calculated by B. Blyumkin and V.M. Zhdanov [10]. Colony formation was examined at a seed density of  $2 \times 10^3/\text{cm}^2$  cells. The number of colonies formed in the fixed preparations was counted using a light microscope with the objective magnification of  $\times 40$ . Colonies from 20 to 49 cells (CFU-F <sub>$\geq 20$</sub> ), as well as from 50 or more cells (CFU-F <sub>$\geq 50$</sub> ) were separately considered, determining their percentage in all the samples.

For statistical analysis of the experimental data a nonparametric Mann-Whitney test was used with  $p \leq 0.05$ .



рации (ИП), митотическому индексу (МИ) и количеству колониобразующих единиц фибробластов (КОЕ-Ф), т. е. на момент активации клеточного деления под влиянием ФККЧ [5]. ИП и МИ рассчитывали по В.Н. Блюмкину и В. М. Жданову [6]. Колониобразование исследовали при плотности посева клеток  $2 \times 10^3/\text{см}^2$ . Количество образованных колоний в фиксированных препаратах подсчитывали с помощью светового микроскопа при 40-кратном увеличении объектива. Отдельно учитывали колонии от 20 до 49 клеток (КОЕ-Ф<sub>≥20</sub>), а также от 50 и более клеток (КОЕ-Ф<sub>≥50</sub>), определяя во всех образцах их процентное соотношение.

Для статистического анализа экспериментальных данных использовали непараметрический критерий Манна-Уитни при  $p < 0,05$ .

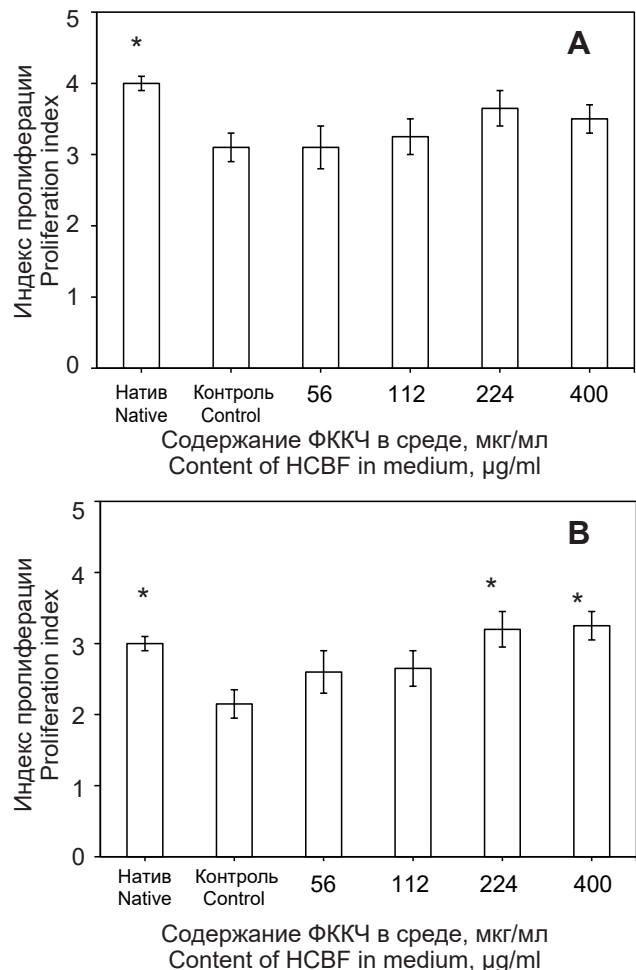
### Результаты и обсуждение

В наших экспериментах после криоконсервирования, отогрева и удаления криопротектора показатель сохранности клеток во всех образцах составлял не менее 85%.

Индекс пролиферации в культуре МСК человека после криоконсервирования составил  $3,1 \pm 0,16$ , а в культуре МСК крысы –  $2,18 \pm 0,13$ , что на 22 и 28% соответственно ниже, чем у культур, которые не подвергались замораживанию.

После добавления ФККЧ в ростовую среду МСК человека данный показатель значимо не увеличился (рис. 1, А). В деконсервированной культуре МСК крысы после добавления ФККЧ в концентрации 224 и 400 мкг/мл ИП увеличился относительно контроля на 46–48%, что свидетельствует о нормализации ростовых показателей культуры (рис. 1, В). При этом ИП значимо не отличался от данного показателя культуры МСК, не подвергавшейся криоконсервированию.

В проведенных исследованиях значимых отличий ИП культуры МСК, не подвергавшейся криоконсервированию, по отношению к криоконсервированным образцам обнаружено не было. При культивировании криоконсервированных МСК по отношению к контролю наблюдалось уменьшение общего количества и размера колоний, что может быть следствием нарушения как адгезии клеток к пластику, так и их митотического деления. В частности было установлено, что в обеих культурах деконсервированных МСК (крысы и человека) количество КОЕ-Ф<sub>≥50</sub> снижалось приблизительно в 2 раза по сравнению с данным показателем в культурах МСК, не подвергавшихся криоконсервированию (рис. 2). При культивировании деконсервированных МСК без ФККЧ значимо увеличивалось количество колоний мень-



**Рис. 1.** Индекс пролиферации деконсервированных культур МСК человека (А) и крысы (В) на 3-и сутки культивирования при добавлении в ростовые среды разных концентраций ФККЧ; \* – различия статистически значимы относительно контроля ( $p < 0,05$ ).

**Fig. 1.** Proliferation index of frozen-thawed cultures of human (A) and rat (B) MSCs to day 3 of culturing with adding different concentrations of HCBF into growth media; \* – differences are statistically significant vs. the control ( $p < 0.05$ ).

### Results and discussion

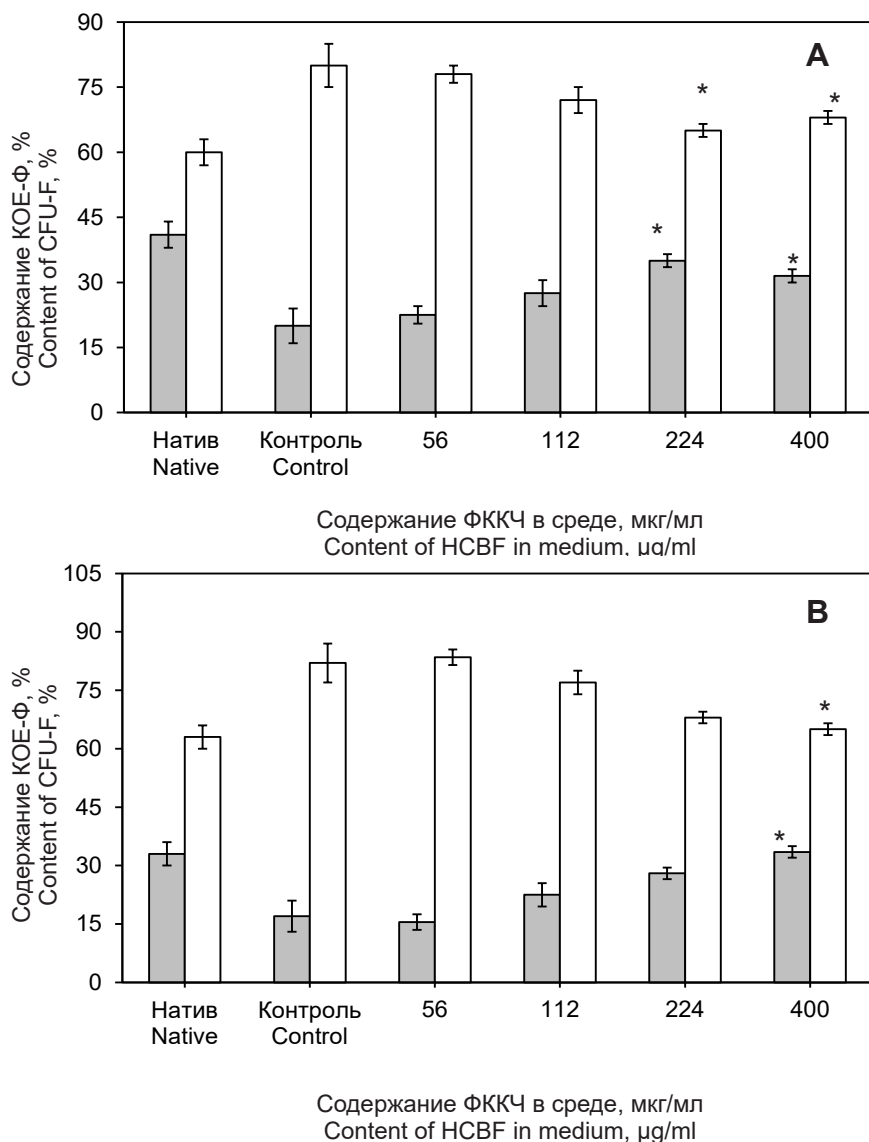
In our experiments after cryopreservation, warming and removal of the CPA, the cell survival for all the samples made at least 85%.

The proliferation index in human MSCs culture after cryopreservation was  $3.1 \pm 0.16$ , and in rat MSCs culture it made  $2.18 \pm 0.13$ , which was 22 and 28% lower, respectively, than in the cultures not subjected to freezing.

After the addition of HCBF to the growth medium of MSCs, this index did not increase significantly (Fig. 1A). In the frozen-thawed culture of rat MSCs, when HCBF was added at a concentration of 224 and 400 µg/ml, the PI increased with respect to the control (by 46–48%) and the growth parameters of the culture were normalized (Fig. 1B).







**Рис. 2.** Соотношение разных по размеру КОЕ-Ф<sub>≥50</sub> (■) и КОЕ-Ф<sub>≥20</sub> (□) деконсервированных культур МСК человека (А) и крысы (В) на 3-и сутки культивирования в средах, содержащих различные концентрации ФККЧ. За 100% принято общее количество КОЕ-Ф; \* – различия статистически значимы относительно соответствующего показателя контроля после деконсервирования ( $p < 0,05$ ).

**Fig. 2.** Ratio of different in size CFU-F<sub>≥50</sub> (■) and CFU-F<sub>≥20</sub> (□) of frozen-thawed cultures of human (A) and rat (B) MSCs to day 3 of culturing in media containing various concentrations of HCBF. Total amount of CFU-F is assumed as 100%; \* – the differences are statistically significant vs. the corresponding control index after freeze-thawing ( $p < 0.05$ ).

шего размера (КОЕ-Ф<sub>≥20</sub>), а после культивирования деконсервированных МСК человека в среде, содержащей 224–400 мкг/мл ФККЧ, значимо увеличивалось количество КОЕ-Ф<sub>≥50</sub> и уменьшалось количество КОЕ-Ф<sub>≥20</sub>. Сходная тенденция отмечалась и в отношении деконсервированных МСК крысы в среде культивирования, содержащей ФККЧ. При концентрации ФККЧ в среде культивирования 400 мкг/мл установлено значимое увеличение количества КОЕ-Ф<sub>≥50</sub> и одновременное уменьшение количества КОЕ-Ф<sub>≥20</sub>.

At the same time, the PI did not significantly differ from this index of the culture of MSCs, not subjected to cryopreservation.

In the performed studies no significant differences of PI were found between non-cryopreserved cultures of MSCs versus the cryopreserved samples. When thawed MSCs were cultured, the total number and size of colonies decreased with respect to the control, that could result from an impairment of both an adhesion of cells to plastic and their mitotic division. In particular, it was found that in both cultures of frozen-thawed MSCs (of rat and human), the amount of CFU-P<sub>≥50</sub> decreased approximately twice if compared to that in the cultures of MSCs, which were not frozen-thawed (Fig. 2). During culturing of the frozen-thawed MSCs without HCBF, the number of smaller colonies (CFU-P<sub>≥20</sub>) was significantly increased, and after culturing of the frozen-thawed MSCs in the medium containing 224–400 µg/ml of HCBF, the amount of CFU-F<sub>≥50</sub> was significantly increased and the amount of CFU-F<sub>≥20</sub> decreased. A similar trend was noted for the frozen-thawed MSCs in a culture medium containing HCBF. At a concentration of HCBF in a culture medium of 400 µg/ml, a significant increase in the amount of CFU-P<sub>≥50</sub> and a simultaneous decrease in the amount of

CFU-P<sub>≥20</sub> have been established.

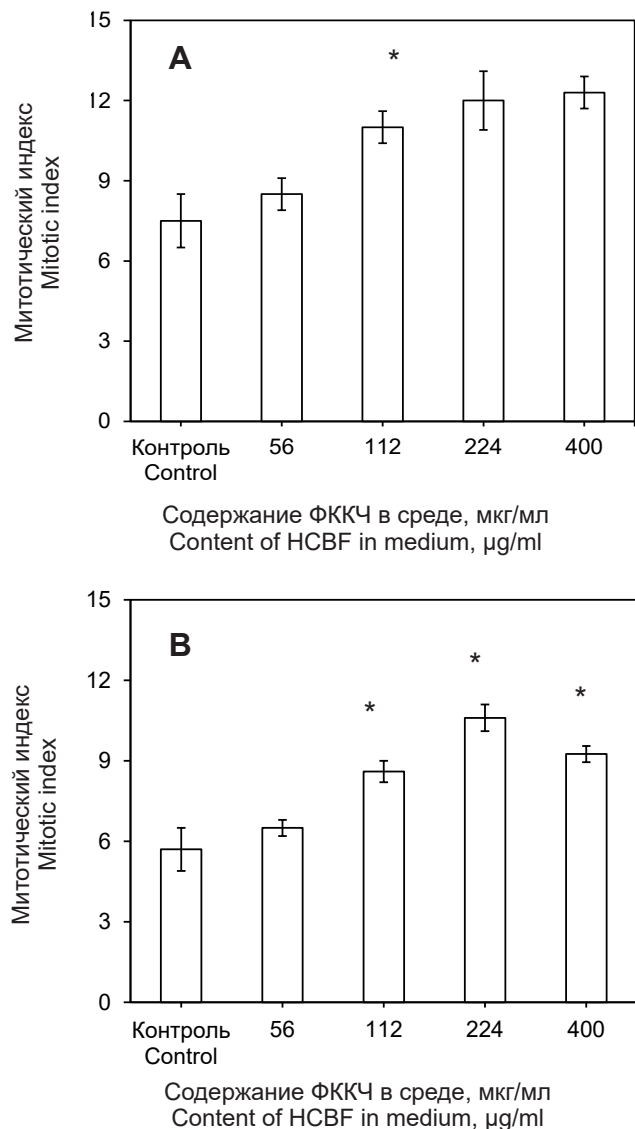
The results show that the HCBF did not affect the ability of MSCs to attach to plastic and stimulated a mitotic division of cells.

The influence of HCBF on MI of the cultures of the frozen-thawed human and rat MSCs, being one of the main indices of their growth properties, was investigated. The Fig. 3 shows a significant increase in MI with respect to the cultures of human and rat MSCs even at the HCBF concentration of 112 µg/ml in the incubation medium. An increase

Полученные результаты свидетельствуют о том, что ФККЧ не влияет на способность МСК прикрепляться к пластику и стимулирует митотическое деление клеток.

В работе исследовали влияние ФККЧ на МИ культур деконсервированных МСК человека и крысы, являющийся одним из основных показателей ростовых свойств клеток. На рис. 3 видно значимое увеличение МИ в отношении культур МСК человека и крысы уже при концентрации ФККЧ в среде инкубации 112 мкг/мл. Повышение в инкубационной среде концентрации ФККЧ до 224 или 400 мкг/мл не приводило к дальнейшему повышению этого показателя.

Для объяснения полученных результатов мы приняли во внимание результаты исследований [11, 15], показавших, что после криоконсервирования снижается энергетический потенциал клеток, высокий уровень которого является необходимым условием для протекания восстановительных процессов [13]. В работе А.Д. Гордиенко, Е.В. Кудокотевой [2] было показано, что быстрый и двухэтапный режимы замораживания лимфоцитов до  $-196^{\circ}\text{C}$  приводят к полному разобщению процессов окисления и фосфорилирования в их митохондриях. В этом исследовании было также обнаружено, что при криоконсервировании лимфоцитов с использованием быстрого и двухэтапного режимов замораживания до  $-196^{\circ}\text{C}$  с 10% ПЭО-400 и ДМСО происходит значимое снижение активности гликолиза. По данным А.Д. Гордиенко и О.И. Федец [3] содержание свободных адениловых нуклеотидов в лимфоцитах снижается независимо от режимов замораживания. Сходные данные были получены в исследовании А. К. Гулевского и др. [4], которые продемонстрировали, что после криоконсервирования клеток лейкоконцентрата под защитой 5% ДМАЦ содержание АТФ в них значимо снижается, а количество АДФ и АМФ остается на уровне контрольных значений, что приводит к снижению аденилатного пула и соответственно энергетического потенциала. Дальнейшие исследования позволили установить, что добавление в реабилитирующую среду низкомолекулярной фракции кордовой крови позволяет увеличить в клетках деконсервированного лейкоконцентрата содержание АТФ, АДФ и АМФ, что приводит к увеличению их аденилатного пула на 76,5%. Исследование механизма стимулирующего действия низкомолекулярной фракции кордовой крови человека (до 5 кДа) на энергетический потенциал клеток лейкоконцентрата показало, что он связан с активацией гликолиза и гликогенолиза. Принимая во внимание вышеизложенное, можно



**Рис. 3.** Митотический индекс деконсервированных культур МСК человека (А) и крысы (В) на 3-и сутки культивирования в средах, содержащих различные концентрации ФККЧ. \* – различия статистически значимы относительно контроля ( $p < 0,05$ ).

**Fig. 3.** Mitotic index of frozen-thawed cultures of human (A) and rat (B) MSCs to day 3 of culturing in media containing various concentrations of HCBF. \* – differences are statistically significant vs. the control ( $p < 0.05$ ).

in the concentration of HCBF in the incubation medium up to 224 or 400 µg/ml did not lead to a further rise of this index.

After cryopreservation the energy potential of cells is reduced [4, 15], nevertheless its high level is a necessary condition for the course of recovery processes [5]. It was shown by A.D. Gordienko and E.V. Kudokotseva [6] that rapid freezing and two-stage freezing regimens for lymphocytes down to  $-196^{\circ}\text{C}$  led to a complete uncoupling of oxidation and phosphorylation processes in their mitochondria. The authors reported also that the cryopreservation

предположить, что ФККЧ способна также влиять на энергетический метаболизм культивируемых клеток, чем можно объяснить ее способность восстанавливать нарушенную в ходе криоконсервирования функциональную активность МСК.

Таким образом, полученные результаты подтверждают эффективность применения фракции до 5 кДа кордовой крови человека при ее включении в среду культивирования деконсервированных клеток МСК в концентрации 224–400 мкг/мл.

### Выводы

1. Установлено, что после деконсервирования МСК человека и крысы на 3-и сутки культивирования значимо снижается индекс пролиферации. Добавление в среду инкубации ФККЧ в концентрации 56–400 мкг/мл статистически не влияет на значение этого показателя относительно МСК человека. В то же время присутствие в среде инкубации 224–400 мкг/мл ФККЧ значимо увеличивает индекс пролиферации в культуре МСК крысы.

2. Показано, что после деконсервирования на 3-и сутки культивирования значимо уменьшалось количество КОЕ-Ф<sub>≥50</sub> и одновременно увеличивалось количество КОЕ-Ф<sub>≥20</sub> как МСК человека, так и крысы. Добавление в среду культивирования МСК человека ФККЧ в концентрации 224 и 400 мкг/мл стимулирует образование КОЕ-Ф<sub>≥50</sub> и уменьшает образование КОЕ-Ф<sub>≥20</sub>. В культуре МСК крысы значимое увеличение КОЕ-Ф<sub>≥50</sub> и одновременное уменьшение КОЕ-Ф<sub>≥20</sub> наблюдается только при содержании ФККЧ в инкубационной среде 400 мкг/мл.

3. После деконсервирования МСК человека и крысы значимое увеличение митотического индекса на 3-и сутки культивирования наблюдалось при содержании ФККЧ в среде культивирования 122 мкг/мл. Дальнейшее повышение ФККЧ в среде культивирования до 224 или 400 мкг/мл существенно не влияло на данный показатель.

4. Нормализация соотношения КОЕ-Ф<sub>≥50</sub>/КОЕ-Ф<sub>≥20</sub> и увеличение митотического индекса на 3-и сутки культивирования МСК человека и крысы свидетельствуют о том, что внесение в среду культивирования ФККЧ в концентрации 112–400 мкг/мл увеличивает ее ростовые свойства.

5. Выявлено, что биологическая активность ФККЧ не является видоспецифической.

### Литература

1. Белоус А.М., Бондаренко В.А., Гулевский А.К. Молекулярно-клеточная концепция криоповреждения клетки: роль трансмембранных дефектов. Криобиология 1987; 2: 3–11.
2. Гордиенко А. Д., Кудокоцева Е. В. Изучение функционального состояния митохондрий в клеточных суспензиях, экспо-

of lymphocytes using rapid freezing and two-stage freezing down to  $-196^{\circ}\text{C}$  with 10% PEO-400 and DMSO led to a significant decrease in glycolysis activity. According to the data, the content of free adenylyl nucleotides in lymphocytes decreased regardless of the freezing regimens. Similar data were obtained in our previous study [8], it was shown that cryopreservation of leukoconcentrate cells under the protection of 5% DMAC resulted in a significant decrease in ATP content, amount of ADP and AMP remained thereat at the control level, which led to a decrease in the adenylate pool and, accordingly, the energy potential. Our further studies showed that the introduction of a low-molecular fraction of the cord blood to the rehabilitating medium allowed to increase the content of ATP, ADP and AMP in the cells of the frozen-thawed leukoconcentrate, which resulted in a rise in their adenylate pool by 76.5%. Investigation of the mechanism of stimulating action of human cord blood low molecular weight fraction (up to 5 kDa) on the energy potential of leukoconcentrate cells showed that it was associated with activation of glycolysis and glycogenolysis. In view of the findings, it is possible that HCBF is also capable of influencing the energy metabolism of the cultured cells, which explains its ability to restore the functional activity of MSCs impaired during cryopreservation.

Thus, the obtained results confirm the efficiency of applying the human cord blood fraction of up to 5 kDa when it is included into the medium for culture of frozen-thawed cells in a concentration of 224–400  $\mu\text{g/ml}$ .

### Conclusions

1. It was found that after freeze-thawing of human and rats' MSCs to day 3 of culturing, a significant decrease in the proliferation index was observed. Adding the HCBF to an incubation medium to a concentration of 56–400  $\mu\text{g/ml}$  statistically does not affect the value of this index relative to the human MSC. At the same time, the presence of 224–400  $\mu\text{g/ml}$  HCBF in the incubation medium significantly increased the proliferation index in rat MSC culture.

2. It has been shown that after freeze-thawing to day 3 of culturing, the amount of CFU-P<sub>≥50</sub> was significantly decreased and simultaneously the amount of CFU-P<sub>≥20</sub>, both human MSC and rat, was increased. The addition of HCBF to a culture medium of human MSCs in the concentrations of 224 or 400  $\mu\text{g/ml}$  stimulated the formation of CFU-P<sub>≥50</sub> and reduced the formation of CFU-P<sub>≥20</sub>. In the rat MSC culture, a significant rise in CFU-P<sub>≥50</sub> and a simultaneous decrease in CFU-P<sub>≥20</sub> was observed only with 400  $\mu\text{g/ml}$  HCBF in the incubation medium.



нированных в растворе криопротектора. Криобиология и криомедицина 1980; 7: 32–34.

3. Гордиенко А.Д., Федец О.И. Содержание АТФ, АДФ и АМФ при низкотемпературном консервировании лимфоидных клеток. Вопросы медицинской химии 1981; 6: 746–749.
4. Гулевский А.К., Лаврик А.А., Трифонова А.В. Влияние ДМСО и фракции (до 5 кДа) кордовой крови на ростовые свойства культуры МСК. Вісник проблем біології і медицини 2014; 3(3): 96–99.
5. Гулевский А.К., Трифонова А.В., Лаврик А.А. Стимуляция восстановления криоконсервированных клеточных культур фракцией (до 5 кДа) кордовой крови крупного скота или препаратом актовегин. Цитология 2013; 55(9): 619–625.
6. Гулевский А.К., Щенявский И.И., Абакумова Е.С. Клеточная трансплантация в кардиомиопластике при ишемическом повреждении сердца. Біотехнологія 2011; 4(1): 60–73.
7. Гулевский А.К., Щенявский И.И., Никольченко А.Ю. Кордовая кровь и ее компоненты: биологические особенности, клиническое применение, хранение в криобанках. Харьков; 2017. – 373 с.
8. Дьяконов Л.П., Ситьков В.И. Животная клетка в культуре. М.: Компания Спутник+; 2000. – 400 с.
9. Лаврик А.А., Трифонова А.В., Гулевский А.К. Выбор сред для культивирования и криоконсервирования стромальных клеток костного мозга. Проблемы криобиологии и криомедицины 2015; 25(1): 81–85.
10. Фуллер Б., Грин К., Грищенко В.И. Охлаждение, криоконсервирование и экспрессия генов в клетках млекопитающих. Проблемы криобиологии 2004; 3: 58–71.
11. Bernardo M.E., Avanzini M. A., Perotti C. et al. Optimization of in vitro expansion of human multipotent mesenchymal stromal cells for cell-therapy approaches: Further insights in the search for a foetal calf serum substitute. J Cell Physiol 2007; 211: 121–130.
12. Fuller B.J., Rubinacci A. et al. The bioenergetics of mitochondria after cryopreservation. Cryobiology 1989; 26(4): 333–340.
13. Owen M. Marrow stromal stem cells. J Cell Science Suppl 1988; 10: 63–76.
14. Sowemimo-Coker S.O., Zerez C.R. et al. Preservation of metabolic activity in lyophilized human erythrocytes. Proc Natl Acad Sci USA 1992; 89(3): 967–971.

3. After freeze-thawing of human and rat's MSCs, a significant increase in the mitotic index to day 3 of culture was observed if the HCBF content in the culture medium was 122 µg/ml. Further increase in HCBF in the culture medium up to 224 or 400 µg/ml did not significantly affect this index.

4. Normalization of the  $CFU-F_{\geq 50}/CFU-F_{\geq 20}$  ratio and an increased mitotic index to day 3 of culturing of human and rat's MSCs indicated that the introduction of the culture medium at the HCBF concentration of 112–400 µg/ml enhanced its growth properties.

5. It was revealed that the biological activity of HCBF was not species-specific.

## References

1. Belous A.M., Bondarenko V.A., Gulavsky A.K. The molecular-cellular concept of cell cryoinjury: The role of transmembrane defects. Cryobiology 1987; 2: 3–11.
2. Bernardo M.E., Avanzini M.A., Perotti C. et al. Optimization of in vitro expansion of human multipotent mesenchymal stromal cells for cell-therapy approaches: Further insights in the search for a foetal calf serum substitute. J Cell Physiol 2007; 211: 121–130.
3. Diakonov L.P., Sitkov V.I. Biology of animal cells. Stavropol; 2000.
4. Fuller B., Green C., Grischenko V.I. Cooling, cryopreservation and gene expression in mammalian cells. Probl Cryobiol 2004; 3: 58–71.
5. Fuller B.J., Rubinacci A. et al. The bioenergetics of mitochondria after cryopreservation. Cryobiology 1989; 26(4): 333–340.
6. Gordienko A.D., Kudokotseva E.V. Study of functional state of mitochondria in cell suspensions, exposed in cryoprotectant solution. Kriobiologiya i kriomeditsina 1980; 7: P. 32–34.
7. Gordienko A.D., Fedets O.I. ATP, ADP and AMP content in the low-temperature preservation of lymphoid cells. Vopr Med Khim 1981; 27(6): 746–749.
8. Gulevsky A.K., Lavrik A.A., Trifonova A.V. The Influence of DMSO and a fraction (below 5 Kda) from cord blood on MSC culture growth. Bulletin of problems biology and medicine 2014; 3(3): 96–99.
9. Gulevsky A.K., Trifonova A.V., Lavrik A.A. Stimulation of cell cultures recovery after cryopreservation by the cattle cord blood fraction (below 5 kDa) or Actovegin. Tsitologiya 2013; 55(9): 619–625.
10. Gulevsky A.K., Schenyavsky I.I., Abakumova Ye.S. Cell transplantation in the cardiomyoplasty of ischemic heart injury. Biotechnol Acta 2011; 4(1): 60–73.
11. Gulevsky A.K., Schenyavsky I.I., Nikolchenko A.Yu. Cord blood and its components: biological features, clinical application, storage in cryobanks. Kharkiv: Raider; 2017.
12. Lavrik A.A., Trifonova A.V., Gulevskiy A.K. Choice of media for cultivation and cryopreservation of bone marrow stromal cells. Probl Cryobiol Cryomed 2015; 25(1): 81–85.
13. Owen M. Marrow stromal stem cells. J Cell Science Suppl 1988; 10: 63–76.
14. Sowemimo-Coker S.O., Zerez C.R. Preservation of metabolic activity in lyophilized human erythrocytes. Proc Natl Acad Sci USA 1992; 89(3): 967–971.

