

УДК 577.112:577.322:615.36:618.48

Н.М. Моїсєєва, І.І. Щенявський, О.Л. Горіна,
Ю.С. Ахатова*, О.Ю. Семенченко

Дослідження вивільнення біологічно активних речовин з кордової крові за різних умов дії низьких температур

UDC 577.112:577.322:615.36:618.48

N.M. Moisieieva, I.I. Shcheniavskiy, O.L. Gorina,
Yu.S. Akhatova*, O.Yu. Semenchenko

Study of Release of Biologically Active Compounds from Cord Blood Under Different Conditions of Low-Temperature Impact

Реферат: У роботі досліджено вплив методу деструкції кордової крові на склад отриманих з неї низькомолекулярних фракцій та проведено порівняння криодеструкції з іншими способами руйнування клітин перед екстракцією. Кордову кров людини піддавали деструкції шляхом швидкого або повільного охолодження та відігрівання, гіпотонічного лізису та термодеструкції. Отриману сировину використовували для виготовлення фракції кордової крові (ФКК) шляхом багатоступінчастої ультрафільтрації та ліофілізації. Оцінювали суху масу, склад ФКК та вміст в них загального білка за хроматографічними профілями (гель-проникна та зворотно-фазова високоефективна рідинна хроматографія). Встановлено, що ФКК, отримані різними методами деструкції кордової крові, відрізняються за вмістом та молекулярними масами компонентів. Результати досліджень свідчать про те, що використання низьких температур та комбінація різних режимів заморожування-відігрівання кордової крові перед ультрафільтрацією дозволяють варіювати кількість і спектр низькомолекулярних речовин у ліофілізованих фракціях.

Ключові слова: криодеструкція, кордова кров, біологічно активні речовини, низькомолекулярна фракція, низькі температури.

Abstract: Here, we have studied the impact of cord blood destruction method on composition of the cord blood-derived low molecular fractions, and compared the cryodestruction with other methods of cell destruction before extracting. Human cord blood was destroyed by rapid or slow freezing / warming, hypotonic lysis and thermal destruction. The obtained substance was used to produce the cord blood fraction (CBF) by multi-stage ultrafiltration and lyophilization. Dry weight, CBF composition and total protein content in them were evaluated by chromatographic profiles (gel permeation and reverse-phase high-performance liquid chromatography). The CBFs, obtained by different techniques for cord blood destruction were established to differ in the content and molecular weights of the components. These findings suggest the possibility to vary the amount and range of low molecular weight compounds in lyophilized cord blood fractions by using low temperatures and combining different regimens of freezing / warming.

Key words: cryodestruction, cord blood, biologically active substances, low-molecular fraction, low temperatures.

Біологічну активність та терапевтичний потенціал низькомолекулярних речовин, отриманих із тканин фетоплацентарного походження, досліджують вже багато років у різних країнах світу [6]. Результатами численних робіт підтверджено, що найперспективнішими фармакологічними субстратами є плацента [8, 11, 12, 15] і кордова кров (КК) [7, 13, 14], оскільки вони мають особливий склад і функціональні властивості, що дає можливість створювати лікарські препарати нового типу. В процесі руйнування клітин з даного типу тканин вивільняються речовини з вираженими властивостями біогенних регуляторів та стимуляторів, за допомо-

Biological activity and therapeutic potential of low molecular weight substances, derived from fetoplacental tissues have been studied worldwide for many years [2]. Multiple researches have confirmed the placenta [4, 9, 10, 14] and cord blood (CB) [3, 11, 12] to be the most promising pharmacological substrates, because of a special composition and functional properties that enables developing new types of drugs. During cell destruction, the substances with pronounced properties of biogenic regulators and stimulators, which can affect the inflammation intensity, direction of immune response in infectious diseases, as well as the rate and quality

Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України, м. Харків, Україна

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: Julija_Veselovskaja@meta.ua

*To whom correspondence should be addressed:

23, Pereyaslavska str., Kharkiv, Ukraine 61016;
tel.: +380 57 373 7435, fax: +380 57 373 5952
e-mail: Julija_Veselovskaja@meta.ua

Надійшла 14.11.2022
Прийнята до друку 08.11.2023

Received 14, November, 2022
Accepted 08, November, 2023

© Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, 2023
© Publisher Publishing House 'Akadempriodyka' of the National Academy of Sciences of Ukraine, 2023

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.

гою яких можливо впливати на інтенсивність процесу запалення, направленість імунної відповіді при інфекційних захворюваннях, а також на швидкість та якість процесів регенерації [5, 12, 16]. Також суттєвою перевагою такого типу фармакологічних засобів є той факт, що процес деструкції клітин плаценти та КК виключає будь-який ризик розвитку онкологічних захворювань, що зазвичай пов'язують з високим вмістом стовбурових клітин в цих тканинах та їхньою неконтрольованою проліферацією після введення [8, 15, 16]. Однак в процесі обробки сировини при виготовленні таких лікарських засобів, її екстракції та стерилізації залежно від обраних методів може суттєво відрізняться кінцевий склад продукту, що призводить до варіабельності концентрацій діючих речовин [8]. Крім того, тип та концентрація біологічно активних речовин (БАР) в отриманих субстанціях залежать від строку гестації на момент пологів [6]. В літературі описано безліч протоколів обробки тканин плаценти та КК, зокрема з використанням додецилсульфату натрію, трипсину, етилендіамінтетраоцтової кислоти, ДНКаз-І і нейонного агента Triton X-100 у різних концентраціях та різних температурних умовах, що в результаті призводить до різного ступеня деструкції тканин та клітин [8, 10, 12, 15]. При цьому методи екстракції в більшості доступних літературних джерелах описані недостатньо [6].

Можна виділити декілька методів деструкції тканин з метою отримання екстрактів, що містять біологічно активні речовини (БАР) різного типу і молекулярної маси. Найпоширенішими з них є гіпотонічний лізис, нагрівання до високих температур, дія ультразвуку та низьких температур. Слід зазначити, що під час екстрагування в умовах позитивних температур порушується структура багатьох БАР і, як наслідок, значно знижується або повністю втрачається їхня біологічна активність. Повністю уникнути нагрівання, руйнівного для багатьох молекул, дозволить застосування низьких температур. З огляду на це серед наявних методів отримання БАР з плаценти та КК найбільш перспективними є кріотехнології [4].

Згідно з фундаментальними кріобіологічними положеннями основними чинниками пошкодження клітин у процесі заморожування-відігрівання є формування і зростання внутрішньо- і позаклітинних кристалів льоду, утворення гіперконцентрованих розчинів зовні і всередині клітин, зміна іонної сили і рН розчину, а також дегідратація клітин [2, 9]. Основна мішень кріовпливу — плазматичні мембрани та їхні

of regeneration processes are released from this type of tissue [1, 10, 15]. The fact that the destruction of placental cells and CB eliminates any risk of cancer development, being usually associated with a high content of stem cells in these tissues and their uncontrolled proliferation after administration, is also a significant advantage of this type of pharmacological drugs [4, 14, 15]. However, when producing these drugs, the treatment of raw materials, their extraction and sterilization depending on the applied techniques, may significantly affect the final composition of product, resulting in variability of concentrations of active substances [4]. The type and concentration of biologically active compounds (BAC) in the derived substances are also dependent on gestation term at the time of delivery [2]. There have been reported many protocols for placental tissues and CB treatment, in particular, using sodium dodecyl sulfate, trypsin, ethylenediaminetetraacetic acid, DNAase-I and the neonic agent Triton X-100 in various concentrations and temperature conditions, resulting in different degrees of tissue and cell destruction [4, 8, 10, 14]. Herewith, the extraction techniques are poorly described in most available reports [2].

There are several methods for tissue destruction that can be used to obtain the extracts containing BAC of various types and molecular weights. Hypotonic lysis, warming up to high temperatures, ultrasound and low temperatures are the most common among them. Notably, that during extraction under positive temperatures, the structure of many BAC is disrupted and, as a result, their biological activity is significantly reduced or completely lost. The use of low temperatures allows to completely avoid the warming, being destructive for many molecules. Taking this fact into consideration, the cryotechnologies are the most promising among the available methods of BAC procurement from placenta and CB [13].

According to the fundamental cryobiological principles, the main factors of cell injury during freeze-thawing are the formation and growth of intra- and extracellular ice crystals, the formation of hyperconcentrated solutions outside and inside cells, changes in ionic strength and pH of solution, and cell dehydration [5, 16]. The primary target of cryoexposure is the plasma membranes and their lipid components. As a result of a range of physical and chemical factors, the liquid-crystalline state of lipids is changed, which, in turn, affects the structure and function of proteins and lipid-protein interactions. The low temperatures



ліпідні компоненти. В результаті дії спектра фізико-хімічних факторів змінюється рідкокристалічний стан ліпідів, що, в свою чергу, впливає на структуру і функцію білків та ліпід-білкові взаємодії. Також доведено, що низькі температури по-різному впливають на активність ферментативної системи. При цьому найбільше руйнування клітинних компонентів відбувається під час повільного охолодження сировини в діапазоні температур кристалізації води, особливо в точці евтектики розчину і рекристалізації [2, 9]. Отже, використання низьких температур сприяє руйнуванню клітинних структур та створенню оптимальних умов екстрагування БАР з біосубстрату.

Наведені факти свідчать про те, що зміна умов та параметрів низькотемпературної обробки сировини впливає на склад та якість кінцевих фармакологічних субстанцій. Таким чином, вибір та стандартизація методів отримання БАР з тканин фетоплацентарного походження є актуальними і важливими питаннями.

Мета роботи — дослідження та порівняння різних способів деструкції кордової крові для визначення можливості варіювання складу отриманих з неї низькомолекулярних фракцій.

Матеріали та методи

Збір зразків КК людини і маніпуляції з ними проводили згідно з рекомендаціями Гельсінської декларації Всесвітньої медичної асоціації з проведення біомедичних досліджень на людях.

Режими попередньої обробки КК. Кордову кров людини ($V = 50$ мл) без антикоагулянту піддавали кріодеструкції з комбінуванням режимів швидкого або повільного охолодження та відігрівання за допомогою програмного заморозувача ЗП-10 (СКТБ з ДВ при Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків). Для порівняння ефективності низькотемпературних режимів деструкцію клітин КК проводили за загальноприйнятими методами — гіпотонічним лізісом або термодеструкцією. В дослідженнях було використано чотири режими попередньої обробки КК (табл. 1). Отриману після попередньої обробки сировину використовували для виготовлення фракцій кордової крові (ФКК).

Метод отримання ФКК. Фракції з компонентами молекулярною масою (м. м.) до 10 кДа отримували з КК людини після попередньої обробки (табл. 1) за допомогою багатоступінчастої ультрафільтрації на системі фільтрів та мембранних модулів «Sartopure GF2 / Vivaflow-200» (Sartorius, Німеччина) та ліофілі-

have been also proven to affect differently the enzymatic activity. Herewith, the most destruction of cell components occurs when the raw material is cooled slowly within a temperature range of water crystallisation, especially at the eutectic point of solution and recrystallisation [5, 16]. Consequently, the use of low temperatures promotes destruction of cell structures and creation of optimal conditions for BAC extraction from biosubstrate [13].

The above facts suggest that changing the conditions and parameters of low-temperature processing of raw materials affects the composition and quality of the finished pharmacological substances. Thus, the selection and standardization of the methods for BAC procurement from fetoplacental tissues are relevant and crucial issues.

The research aim was to investigate and compare different ways for cord blood destruction to determine the possibility of varying the composition of low-molecular weight fractions derived from it.

Materials and methods

Human CB samples were collected and manipulated in accordance with the recommendations of the World Medical Association Declaration of Helsinki for Medical Research Involving Human Subjects.

Modes of CB pretreatment. The anticoagulant-free human cord blood ($V = 50$ ml) was subjected to cryodestruction by combining the modes of rapid or slow cooling and warming using a ZP-10 programmable freezer (Special Designing and Technological Bureau with Experimental Unit at the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the NAS of Ukraine, Kharkiv). In order to compare the efficiency of low-temperature regimens, the CB cells were destroyed by conventional techniques, *i. e.* hypotonic lysis or thermal destruction. Here, we have used four modes of CB pretreatment (Table 1). The raw material derived after pretreatment was used to produce cord blood fractions (CBF).

Method of CBF procurement. Fractions with the components of molecular weight (MW) below 10 kDa were obtained from human CB after pretreatment (Table 1) by means of multistage ultrafiltration using a system of filters and membrane modules ‘Sartopure GF2 / Vivaflow-200’ (Sartorius, Germany) and freeze-drying with a sublimation unit of LZ-45 type [6]. Before use, a portion of frozen-dried CBF was dissolved in sterile saline to a concentration of 50 mg/ml (Lekhim-Kharkiv, Ukraine).



Таблиця 1. Методи обробки кордової крові людини перед отриманням низькомолекулярних фракцій
Table 1. Methods for human cord blood treatment before obtaining low-molecular fractions

| Режим впливу Mode of exposure | Етапи попередньої обробки КК Stages of cord blood pretreatment |
|--|--|
| Гіпотонічний лізис Hypotonic lysis | Змішування натрій-фосфатного буфера (5 мМ, рН 8,0) зі зразками КК (1 : 4) та 15-хвилинна інкубація на льоду Mixing of sodium phosphate buffer (5 mM, pH 8.0) with CB samples (1 : 4) and a 15-min incubation in ice bath |
| Термодеструкція Thermal destruction | Інкубація зразків цільної КК при 70°C протягом 30 хв Incubation of whole CB samples at 70°C for 30 min |
| Швидке заморожування-швидке відігрівання Rapid freezing-rapid warming | Швидке охолодження зразків КК зі швидкістю 30°C/хв до кінцевої температури -196°C Rapid freezing of CB samples with a rate of 30°C/min down to a final temperature of -196°C. |
| | Етапи швидкого відігрівання: 1) до -7°C зі швидкістю 40°C/хв 2) до 0°C зі швидкістю 1°C/хв 3) до 10°C зі швидкістю 40°C/хв Stages of rapid warming: 1) up to -7°C at a rate of 40°C/min 2) up to 0°C at a rate of 1°C/min 3) up to 10°C at a rate of 40°C/min. |
| Повільне заморожування-повільне відігрівання Slow freezing-slow warming | Етапи повільного охолодження зразків КК: 1) до -2°C зі швидкістю 2°C/хв 2) до -160°C зі швидкістю 7°C/хв Stages of slow freezing of CB samples: 1) down to -2°C at a rate of 2°C/min 2) down to -160°C at a rate of 7°C/min |
| | Етапи повільного відігрівання: 1) до -24°C зі швидкістю 3,25°C/хв 2) до -3°C зі швидкістю 0,7°C/хв 3) до 4°C зі швидкістю 0,15°C/хв Stages of slow warming: 1) up to -24°C at a rate of 3.25°C/min 2) up to -3°C at a rate of 0.7°C/min 3) up to 4°C at a rate of 0.15°C/min. |

зації в сублимаційній установці типу ЛЗ-45 [1]. Перед застосуванням наважку ліофілізованої ФКК розчиняли у стерильному фізіологічному розчині до концентрації 50 мг/мл («Лекхім-Харків», Україна).

Гель-проникну хроматографію проводили на пластиковій колонці (1,6 x 40 см), яку заповнювали полівініловим гелем «Toyopearl HW-40 Fine» (Toyo Soda, Японія), що дозволяє розділити молекули у діапазоні м. м. 0,1–100 кДа. В якості елюенту використовували фосфатно-сольовий буфер (Na₂HPO₄ 30 мМ, NaCl 200 мМ, рН 7,6), який подавався в колонку за допомогою перистальтичного насоса «Microperpex 2132» (LKB, Швеція) зі швидкістю потоку 1,7 мл/хв. Використовували зразки ФКК об'ємом 0,4 мл. Вихід компонентів реєстрували за допомогою ультрафіолетового оптичного монітора «LKB 2238 Uvicord sii» (LKB) при довжині хвилі 260 нм у двох діапазонах відносних оптичних одиниць

Gel permeation chromatography was carried out using a plastic column (1.6 x 40 cm) filled with Toyopearl HW-40 Fine polyvinyl gel (Toyo Soda, Japan), allowing to separate molecules within the range of 0.1-100 kDa. Phosphate-buffered saline (Na₂HPO₄ 30 mM, NaCl 200 mM, pH 7.6) was used as an eluent, which was supplied to the column using a Microperpex 2132 peristaltic pump (LKB, Sweden) at a flow rate of 1.7 ml/min. The CBF samples of 0.4 ml were used. The release of components was registered using an ultraviolet optical monitor 'LKB 2238 Uvicord sii' (LKB) at a wavelength of 260 nm within two ranges of relative optical units of 0–2 and 0–0.02 AUFS. The detector signal was recorded as a chromatogram by a self-recording potentiometer 'LKB 2210 Recoder' (LKB).

Reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) was conducted using a chromatograph with an Agilent 1100 DAD detector



0–2 та 0–0,02 AUFS. Сигнал детектора записували у вигляді хроматограми самописним потенціометром «LKB 2210 Recoder» (LKB).

Зворотньо-фазову високоефективну рідинну хроматографію (ЗФ ВЕРХ) проводили на хроматографі з DAD-детектором «Agilent 1100» (Agilent Technologies, США) на хроматографічній колонці «Discovery BIO Wide Pore C18-5» 4,6 x 250 мм з розміром пор 5,0 мкм (Supelco, США). Для аналізу використовували зразки об'ємом 10 мкл з концентрацією 50 мг/мл. Режим елювання — ізократичний або градієнтний. Рухомо фаза: Solvent A — вода + Trifluoroacetic acid (Supelco, Німеччина); Solvent B — ацетонітрил (Supelco); Solvent C — метанол (Supelco); Solvent D — вода. Температура колонки — 20°C; детектор — 210 нм, однопроменевий режим вимірювання, коефіцієнт пропускання τ — 0,34; тиск — 140,1 бар; швидкість потоку — 1 мл/хв. Зразок наносили в кількості від 5 до 15 нг/мкл. Дані аналізували з використанням програми «Agilent Chemstation» (Agilent Technologies). Вміст білка визначали за методом Лоурі [3].

Статистичний аналіз експериментальних даних проводили за допомогою програми «Statistica 10» (StatSoft, США). Дані наведено у вигляді середнього значення \pm стандартне відхилення. Статистичну значущість відмінностей між групами оцінювали з використанням непараметричного критерію Манна-Уїтні при $p < 0,05$. Кількість повторів у кожній серії експериментів не менше трьох.

Результати та обговорення

На першому етапі досліджень було проведено порівняльний аналіз сухої маси ліофілізованих фракцій до 10 кДа, отриманих після застосування різних методів деструкції клітин. Як видно з табл. 2, найбільша суха маса ліофілізованих фракцій спостерігалась після обох варіантів низькотемпературного впливу і термо-деструкції КК, а найменша суха маса — після деструкції КК в умовах гіпотонії. Виявлений факт, швидше за все, пов'язаний з явищем агрегації та осадження біомолекул під час ультрацентрифугування або відсікання при ультрафільтрації.

Результати порівняння вмісту загального білка у отриманих ФКК показали найменші його значення за умов деструкції клітин шляхом гіпотонічного лізису (табл. 2). Після застосування швидкого та повільного низькотемпературних режимів у фракціях був приблизно однаковий вміст білка, що у 2,8 і 3,3 рази відповідно перевищував показник гіпотонічного лізису.

(Agilent Technologies, USA) with a Discovery BIO Wide Pore C18-5 chromatographic column (4.6 x 250 mm) with a pore size of 5.0 μm (Supelco, USA). Samples of 10 μL volume with a concentration of 50 mg/ml were used for analysis. The elution mode was isocratic or gradient. Mobile phase: Solvent A – water + trifluoroacetic acid (Supelco, Germany); Solvent B – acetonitrile (Supelco); Solvent C – methanol (Supelco); Solvent D – water. Column temperature –20°C; detector –210 nm, single-beam measurement mode, transmission coefficient τ – 0.34; pressure – 140.1 bar; flow rate – 1 ml/min. The sample was applied in an amount of 5 to 15 ng/ μL . The data were analysed using Agilent Chemstation software (Agilent Technologies). Protein content was measured by Lowry protein assay [7].

The experimental data were statistically processed using Statistica 10 software (StatSoft, USA). Data are presented as mean \pm standard deviation. The statistical significance of differences between groups was assessed using the nonparametric Mann-Whitney test at $p < 0.05$. The number of experiments in each series of experiments was at least three.

Results and discussion

At the first stage of the research, a dry weight of frozen-dried fractions below 10 kDa, derived after applying different methods of cell destruction was comparatively analyzed. The Table 2 shows that the highest dry weight of frozen-dried fractions was procured after both variants of low-temperature exposure and thermal destruction of CB, and the lowest dry weight – after CB destruction under hypotonic conditions. This fact is most likely related to the phenomenon of aggregation and precipitation of biomolecules during ultracentrifugation or cut-off during ultrafiltration.

The results of comparison of the total protein content in the obtained CBF showed its lowest values under cell destruction using hypotonic lysis (Table 2). After applying the rapid and slow low-temperature regimens, the fractions had approximately the same protein content that was 2.8 and 3.3 times higher than this index in hypotonic lysis, respectively.

The expected increase in protein content in CBF was observed after thermal destruction. For example, if comparing with hypotonic lysis, the protein content was 11.7 times higher, and when compared to cryodestruction at rapid and slow freezing, it was 3.6 and 4.2 times higher, respectively. This fact was due to formation of a large



Очікуване збільшення вмісту білків у ФКК спостерігали після термодеструкції. Так, у порівнянні з гіпотонічним лізисом вміст білка був вище у 11,7 рази, а у порівнянні з криодеструкцією при швидкому та повільному заморожуванні — у 3,6 та 4,2 рази відповідно. Даний факт зумовлений утворенням великої кількості пептидних фрагментів білків, які зруйнувалися в процесі обробки КК внаслідок теплової денатурації. Тому високий вміст білків та їхніх фрагментів у цьому випадку не забезпечує збереження біологічної активності.

На другому етапі роботи проведено аналіз профілю УФ-поглинальних речовин у ФКК за допомогою гель-проникної хроматографії. На рис. 1

number of peptide fragments of proteins that were destroyed during CB treatment because of thermal denaturation. Therefore, in this case, a high content of proteins and their fragments can not ensure the preservation of their biological activity.

At the second stage of the research, the profile of UV-absorbing substances in CBF was analysed using gel permeation chromatography. Fig. 1 shows the chromatographic profiles of fractions depending on the destruction method for CB cells.

The data presented here show that the profiles of UV-absorbing substances differ significantly if using various modes of CB destruction.

Таблиця 2. Суха маса та вміст загального білка у низькомолекулярних фракціях залежно від методу деструкції КК, $m \pm SD$, $n = 6-8$

Table 2. Dry weight and total protein content in low-molecular fractions depending on method of cord blood destruction, $m \pm SD$, $n = 6-8$

| Метод деструкції КК Method of CB destruction | Суха маса, мг/мл Dry weight, mg/ml | Вміст білка, мкг/мл Protein content, $\mu\text{g/ml}$ |
|--|---------------------------------------|--|
| Гіпотонічний лізис Hypotonic lysis | 16,14 \pm 2,0 | 20,5 \pm 2,7 [#] |
| Термодеструкція Thermal destruction | 50,4 \pm 5,5* | 240,0 \pm 40* |
| Швидке заморожування-швидке відігрівання Rapid freezing-rapid warming | 47,5 \pm 7,0* | 67,3 \pm 20** |
| Повільне заморожування-повільне відігрівання Slow freezing-slow warming | 54,6 \pm 5,5* | 57,1 \pm 22** |

Примітки: * — відмінності значущі порівняно з варіантом деструкції клітин шляхом гіпотонічного лізису ($p < 0,05$); # — відмінності значущі порівняно з варіантом деструкції клітин шляхом термодеструкції ($p < 0,05$).

Notes: * – differences are significant compared to cell destruction by hypotonic lysis ($p < 0.05$); # – differences are significant compared to cell destruction by thermal destruction ($p < 0.05$).

представлено хроматографічні профілі фракцій залежно від методу деструкції клітин КК.

Як видно з наведених даних, профілі УФ-поглинальних речовин при різних режимах деструкції КК істотно відрізняються. Основні відмінності стосуються кількості піків, зокрема при застосуванні термодеструкції (рис. 1, В) виявляються лише 4 піки, в той час, як при інших варіантах — не менше 6. Результати детального аналізу показали, що при деструкції в умовах гіпотонії (рис. 1, А) речовини з більшими молекулярними масами виявляються у вигляді трьох піків (A1.1 (м. м. 5910 Да), A3.1 (м. м. 4088 Да) і A3.2 (м. м. 3474 Да)), при швидкому заморожуванні-швидкому відігріванні (рис. 1, С) — у ви-

The main differences are in the number of peaks, in particular, only 4 peaks are detected during thermal destruction (Fig. 1B), whereas there are at least 6 peaks with other variants. The results of a detailed analysis demonstrate that during destruction under hypotonic conditions (Fig. 1A), the compounds with higher molecular weights are detected as three peaks (A1.1 (MW 5910 Da), A3.1 (MW 4088 Da) and A3.2 (MW 3474 Da)), at rapid freezing – rapid warming (Fig. 1C) there are two peaks (A2 (MW 5404 Da), A3.1 (MW 4113 Da)), while the peaks A1.1 and A3.2 are absent. During destruction by slow freezing – slow warming (Fig. 1D), as in case of using hypotony, the peaks A1.1 and



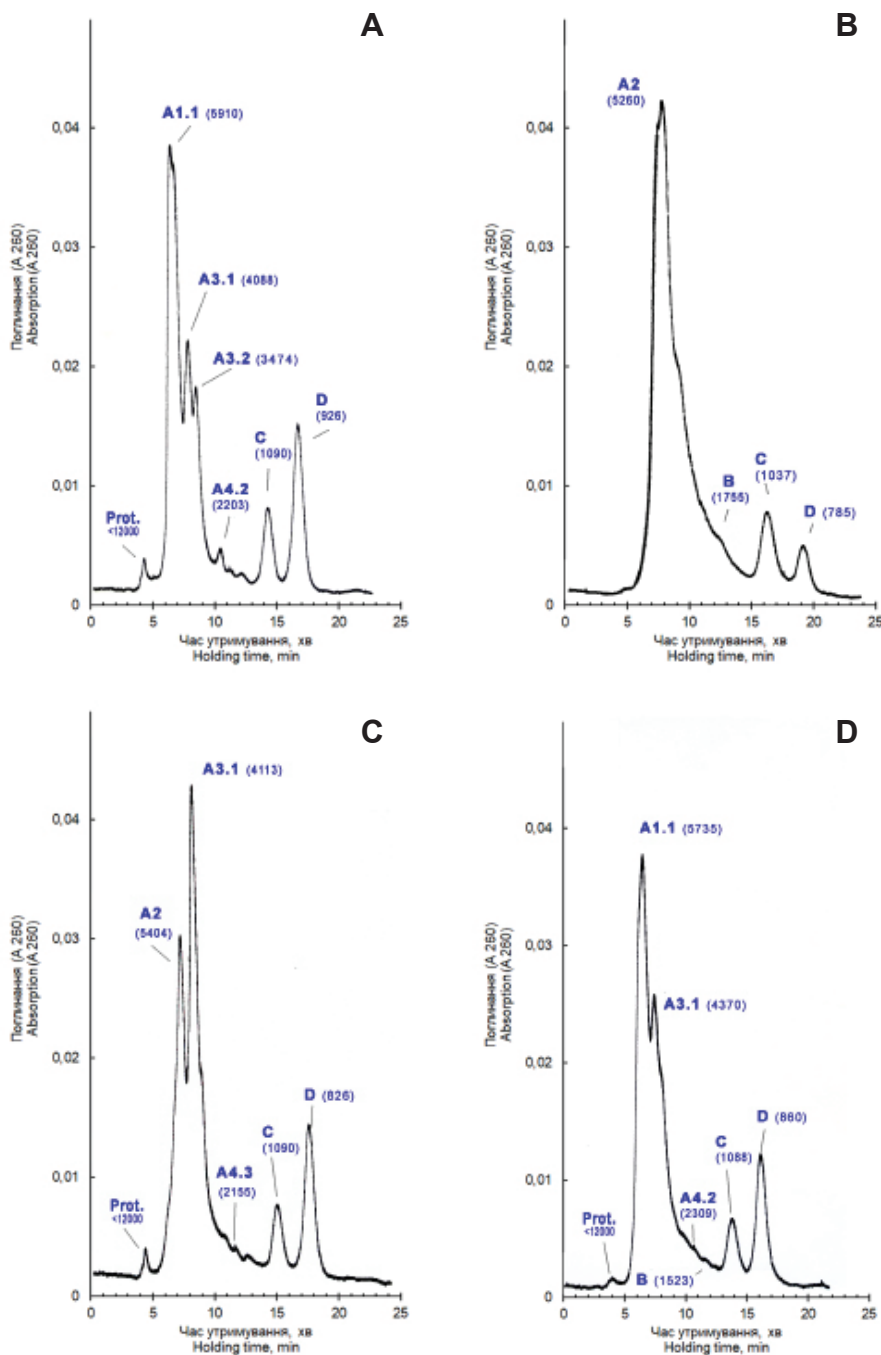


Рис. 1. Типові хроматографічні профілі УФ-поглинальних речовин у ФКК, отриманих після різних способів деструкції КК людини: **A** — гіпотонічний лізис; **B** — термодеструкція; **C** — швидке заморожування-швидке відігрівання; **D** — повільне заморожування-повільне відігрівання.

Fig. 1. Typical chromatographic profiles of UV-absorbing substances in CBF, obtained by various methods of human CB destruction: **A** – hypotonic lysis; **B** – thermal destruction; **C** – rapid freezing – rapid warming; **D** – slow freezing-slow warming.

гляді двох піків (A2 (м. м. 5404 Да), A3.1 (м. м. 4113 Да)), при цьому піки A1.1 і A3.2 відсутні. При деструкції за допомогою повільного заморожування-повільного відігрівання (рис. 1, D), як і в разі застосування гіпотонії, виявляються піки A1.1 і A3.1, в той же час пік A3.2 у даному випадку відсутній.

A3.1 are detected, whereas there is no peak A3.2 in this case.

Thus, during rapid and slow freezing, the UV-absorbing substances with different composition and amount were extracted into the medium. The compounds with lower molecular weights within the peaks C and D (MW 100–



Таким чином, у процесі швидкого і повільного заморожування в середовище екстрагувалися УФ-поглинальні речовини в різному складі і кількості. Речовини з меншими молекулярними масами у складі піків С і D (м. м. 1000–1200 і 600–800 Да відповідно) виявлялися при обох видах кріодеструкції, але мали різний розмір (табл. 3). Отже, одержані дані свідчать про можливе варіювання складом фракцій шляхом зміни режиму заморожування.

При використанні високої температури для деструкції клітин (рис. 1, В) фракція УФ-поглинальних речовин з більшими молекулярними масами виявляється тільки в піку А2 (м. м. 5260 Да), а фракція з меншими молекулярними масами представлена також піками С і D, але їхнє співвідношення протилежне тому, що мало місце при кріодеструкції, тобто маса УФ-поглинальних речовин піка С значно більше, ніж для піка D.

Отримані дані вказують на специфічність екстракції УФ-поглинальних речовин з використанням низьких температур та свідчать про можливість варіювання вмісту низькомолекулярних речовин у фракції до 10 кДа залежно від способу деструкції і режиму заморожування-відігрівання.

Зроблений висновок підтверджується і даними ЗФ ВЕРХ (рис. 2, табл. 3). За різних способів обробки КК на хроматограмах ФКК поряд із подібними виявляються також і унікальні піки. У табл. 3 наведено детальний кількісний аналіз піків хроматографічних профілів досліджених зразків.

Так, на хроматограмах фракції, отриманої після деструкції КК шляхом гіпотонічного лізису з 3,25 по 3,75 хвилину, виявляються чотири чітких піки (рис. 2, А), в той час як при застоуванні обох варіантів кріодеструкції в даному проміжку часу утримання — по 3 піки (рис. 2, С, D). При цьому пік на 3,55 хвилині не відповідає жодному піку на хроматограмах ФКК, отриманих після кріодеструкції. Пік на 5,30 хвилині в разі гіпотонічного лізису в 2 рази вище за відповідний пік після повільного заморожування-повільного відігрівання, площі цих піків дорівнюють 19,84 і 7,87% відповідно від загальної площі піків. У випадку швидкого заморожування-швидкого відігрівання на 5,35 хвилині утримання відносна площа піка становить 33,23% від загального виходу і значно перевищує цей пік на хроматограмі ФКК, отриманій після гіпотонічного лізису (7,87% від загальної площі піка).

Крім того, істотно відрізняються 2 піки на 14,8 і 15,6 хвилинах утримання: при повільному заморожуванні-повільному відігріванні їхні площі

1200 and 600–800 Da, respectively) were detected during both types of cryodestruction, but they had different sizes (Table 3). Thus, these findings suggest the possibility to vary the fraction composition by changing the freezing mode.

When using high temperature for cell destruction (Fig. 1B), the fraction of UV-absorbing substances with higher molecular weights was only revealed in peak A2 (MW 5260 Da), and the one with lower molecular weights was also represented by peaks C and D, but their ratio was the opposite of that observed during cryodestruction, *i. e.* the mass of UV-absorbing substances of peak C was much higher than for peak D.

The data obtained demonstrate the specificity of the extraction of UV-absorbing substances using low temperatures and suggest the possibility to vary the content of low molecular weight compounds in the fraction below 10 kDa, depending on destruction method and freeze-warming mode.

This conclusion is also confirmed by the RP-HPLC data (Fig. 2, Table 3). When using different methods of CB treatment, the CBF chromatograms also show the unique peaks along with the similar ones. The Table 3 demonstrates a detailed quantitative analysis of the peaks of chromatographic profiles for the studied samples.

For example, the chromatograms of the fraction, obtained after CB destruction by hypotonic lysis from 3.25 to 3.75 min show four clear peaks (Fig. 2A), whereas when using both variants of cryodestruction within this holding time interval, three peaks are observed (Fig. 2C, D). Herewith, the peak at 3.55 min does not correspond to any peak in CBF chromatograms obtained after cryodestruction. The peak at 5.30 min in case of hypotonic lysis is 2 times higher than the corresponding peak after slow freezing-slow warming, the areas of these peaks make 19.84 and 7.87% of the total peak area, respectively. In case of rapid freezing – rapid warming at 5.35 min of holding, the relative peak area is 33.23% of the total release, and significantly exceeds this peak in CBF chromatogram obtained after hypotonic lysis (7.87% of the total peak area).

In addition, 2 peaks at 14.8 and 15.6 min of holding differ significantly, *i. e.* during slow freezing-slow warming, their areas are 0.71 and 1.13% of the total area, respectively, being more likely in the noise zone of the device, but after hypotonic lysis they make 14.76 and 15.4%, of the total peak area, respectively (Fig. 2A, D). Another significant difference between these chromatograms is the appearance of a peak at



становлять 0,71 і 1,13% відповідно від загальної площі, що знаходиться скоріше в зоні шумів приладу, а після гіпотонічного лізису вони складають 14,76 і 15,4% відповідно від загальної площі піків (рис. 2, A, D). Ще однією суттєвою різницею між

12.3 min of holding during cryodestruction (Fig. 2C, D) and its absence after hypotonic lysis (Fig. 2A).

When comparing the CBF, obtained after cryodestruction (Fig. 2C, D), similar peaks are

Таблиця 3. Порівняльний кількісний аналіз піків у хроматографічних профілях фракцій кордової крові залежно від способу деструкції клітин, $m \pm SD$, $n = 6-8$

Table 3. Comparative quantitative analysis of peaks in chromatographic profiles of cord blood fractions depending on method of cell destruction, $m \pm SD$, $n = 6-8$

| Хроматографічні параметри Chromatographic parameters | Деструкція КК Cord blood destruction method | | | |
|---|---|------------|-----------------------|-----------------------|
| | A | B | C | D |
| Максимальний час утримання, хв Maximum holding time, min | 21,1 ± 1,5 | 24,5 ± 2,9 | 24,6 ± 2,1 | 20,3 ± 2,5 |
| Загальна кількість піків Total number of peaks | 58 ± 4,2 | 70 ± 5,5 | 48 ± 2,8 [#] | 44 ± 3,3 [#] |
| Площа під піками, % від загальної Area under peaks, % of the total | Кількість піків за перші 10 хв елюції Peak number in the first 10 min of elution | | | |
| ≥ 5% від загальної площі ≥ 5% of the total area | 6 ± 0,7 [#] | 3 ± 0,33 | 5 ± 0,8 | 6 ± 1,1 [#] |
| 1–5% від загальної площі 1–5% of the total area | 8 ± 0,9 | 9 ± 3,4 | 10 ± 3,1 | 8 ± 2,6 |
| ≤ 1% від загальної площі ≤ 1% of the total area | 1 ± 0,2 | 2 ± 0,2 | 4 ± 1,0* | 3 ± 0,5* |
| Площа під піками, % від загальної Area under peaks, % of the total | Кількість піків після 10 хв елюції Peak number after 10 min of elution | | | |
| ≥ 5% від загальної площі ≥ 5% of the total area | 0 ± 0,0 | 1 ± 0,14 | 1 ± 0,2 | 1 ± 0,1 |
| 1–5% від загальної площі 1–5% of the total area | 4 ± 0,5 [#] | 1 ± 1,3* | 4 ± 0,2 [#] | 3 ± 0,1 [#] |
| ≤ 1% від загальної площі ≤ 1% of the total area | 39 ± 2,5 | 4 ± 1,9 | 24 ± 1,7** | 23 ± 2,4** |

Примітки: **A** — гіпотонічний лізис; **B** — термодеструкція; **C** — швидке заморожування-швидке відігрівання; **D** — повільне заморожування-повільне відігрівання. * — відмінності значущі у порівнянні з деструкцією клітин шляхом гіпотонічного лізису ($p < 0,05$); # — відмінності значущі у порівнянні з деструкцією клітин шляхом термодеструкції ($p < 0,05$).

Notes: **A** – hypotonic lysis; **B** – thermal destruction; **C** – rapid freezing–rapid warming; **D** – slow freezing–slow warming. * – differences are significant as compared to cell destruction by hypotonic lysis ($p < 0.05$); # – differences are significant as compared to cell destruction by thermal destruction ($p < 0.05$).

даними хроматограм є поява піка на 12,3 хвилині утримання при кріодеструкції (рис. 2, C, D), та його відсутність після гіпотонічного лізису (рис. 2, A).

detected at 3.30, 3.50 and 3.70 min, but after applying slow freezing regimen, they are almost 2 times more intense than during rapid freezing. Under rapid freezing, the relative areas of these



При порівнянні між собою ФКК, отриманих після криодеструкції (рис. 2, С, D), виявляються подібні піки на 3,30, 3,50 і 3,70 хвилинах, однак після застосування режиму повільного заморожування вони майже в 2 рази інтенсивніші, ніж при швидкому заморожуванні. Відносні площі цих піків склали 7,8, 11,5 і 8,7% відповідно за режиму швидкого заморожу-

вання та 13, 18,6 і 15% відповідно від загальної площі за режиму повільного заморожування. Ідентичні піки знаходились на обох хроматограмах на 5,10 хвилинах (по 20%). Наступний суттєвий пік виявлено на обох хроматограмах на 5,30 хвилині при повільному заморожуванні та на 5,40 хвилині при швидкому заморо-

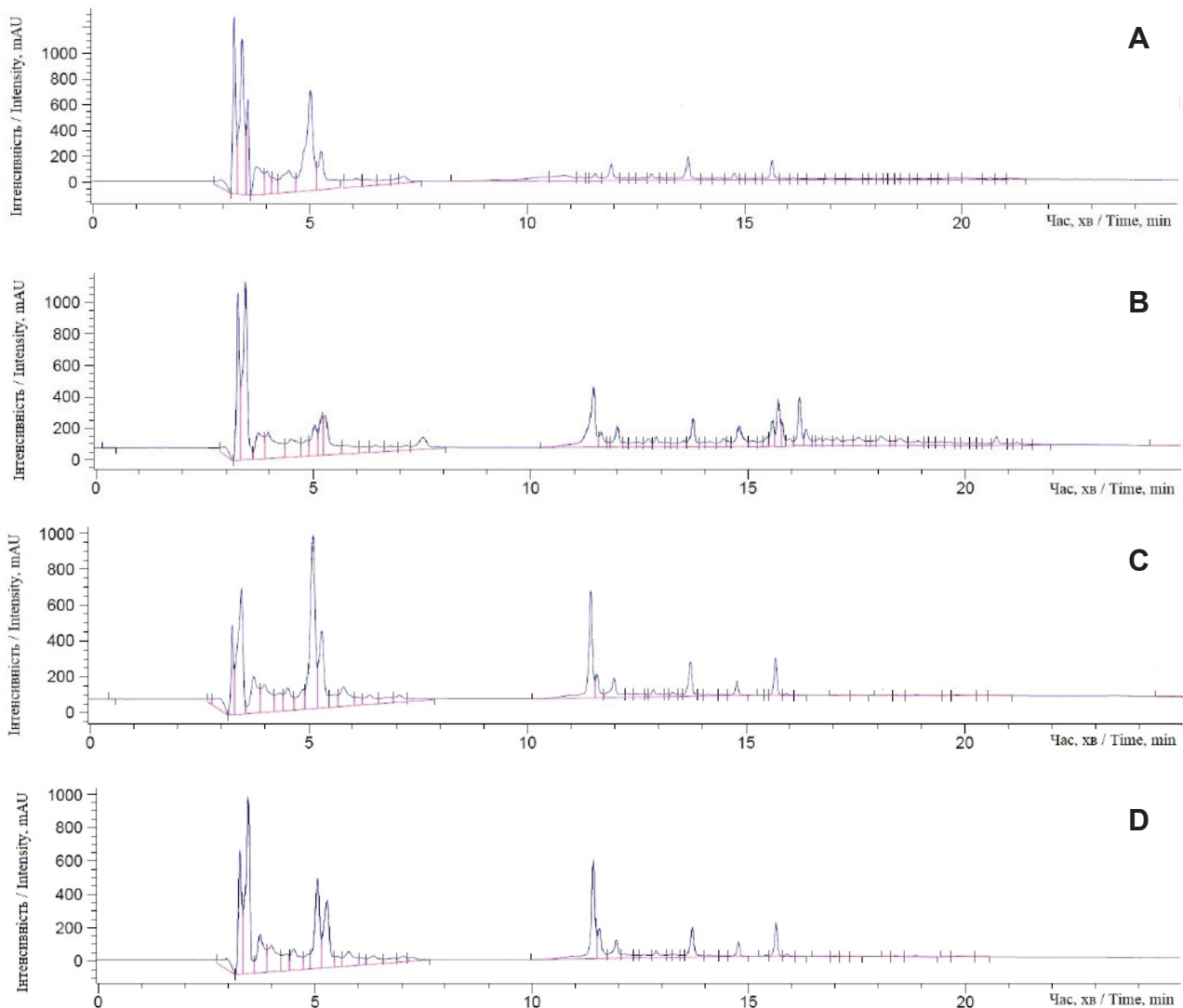


Рис. 2. Типові хроматографічні профілі УФ-поглинальних речовин у ФКК, отриманих після застосування різних способів деструкції КК людини: **A** — гіпотонічний лізис; **B** — термодеструкція; **C** — швидке заморожування-швидке відігрівання; **D** — повільне заморожування-повільне відігрівання.

Fig. 2. Typical chromatographic profiles of CBF UV-absorbing substances obtained by various methods of human cord blood destruction: **A** – hypotonic lysis; **B** – thermal destruction; **C** – rapid freezing–rapid warming; **D** – slow freezing–slow warming.

вання та 13, 18,6 і 15% відповідно від загальної площі за режиму повільного заморожування. Ідентичні піки знаходились на обох хроматограмах на 5,10 хвилинах (по 20%). Наступний суттєвий пік виявлено на обох хроматограмах на 5,30 хвилині при повільному заморожуванні та на 5,40 хвилині при швидкому заморо-

жання та 13, 18,6 і 15% відповідно від загальної площі за режиму повільного заморожування. Ідентичні піки знаходились на обох хроматограмах на 5,10 хвилинах (по 20%). Наступний суттєвий пік виявлено на обох хроматограмах на 5,30 хвилині при повільному заморожуванні та на 5,40 хвилині при швидкому заморо-

жання та 13, 18,6 і 15% відповідно від загальної площі за режиму повільного заморожування. Ідентичні піки знаходились на обох хроматограмах на 5,10 хвилинах (по 20%). Наступний суттєвий пік виявлено на обох хроматограмах на 5,30 хвилині при повільному заморожуванні та на 5,40 хвилині при швидкому заморо-

жуванні. Дані піки незначно відрізняються за часом утримання, однак за відносною площею виявляється істотна різниця: пік при швидкому заморожуванні становить 32%, що майже в 2 рази вище, ніж при повільному (19,5% від загальної площі піків).

При порівнянні хроматографічних профілів ФКК, отриманих після гіпотонічного лізису (рис. 2, А) та термодеструкції (рис. 2, В), видно, що термодеструкція збільшує кількість піків у проміжку від 3 до 5,5 хвилин утримання. При цьому піки на 3,3, 3,45, 3,75 і 5,3 хвилинах збігаються, але відрізняються відносною площею. При гіпотонічному лізисі піки на 11,25, 14,85, 15,7 і 16,25 хвилинах, що характерні для термодеструкції, відсутні.

Аналіз можливих причини різного вмісту і молекулярних мас УФ-поглинальних речовин у ФКК, отриманих різними методами деструкції, дозволив сформулювати наступні припущення. По-перше, це може бути обумовлено розпадом складних комплексів біомолекул (білок-білкових; білок-ліпідних; білок-полісахаридних) під впливом фізико-хімічних чинників, що виникають при тому чи іншому методі деструкції клітин КК, в результаті чого екстрагуються або відокремлюються фрагменти білків чи нові пептиди. По-друге, при деяких методах деструкції можлива участь ензимів, під впливом яких виникають нові пептидні фрагменти. По-третє, має місце вплив агрегації та осадження біомолекул під час ультрацентрифугування або їх відсікання в процесі багатоступінчастої ультрафільтрації.

Отримані результати роботи є суттєвим кроком до подальшого практичного застосування низьких температур у біотехнології, а саме: до керованого виділення низькомолекулярних компонентів з біологічної сировини. В процесі дослідження встановлено, що різні режими низькотемпературного впливу на кордову кров перед ультрафільтрацією змінюють кількісний і якісний склад отриманих низькомолекулярних фракцій. Безперечно, цей факт впливатиме на біологічну активність та терапевтичну ефективність готових фармакологічних препаратів, що є перспективним напрямком наших подальших досліджень.

Висновки

Таким чином, на основі результатів проведення досліджень встановлено:

1. Низькотемпературні методи деструкції КК забезпечують значуще збільшення ($p < 0,05$) сухої маси отриманих низькомолекулярних

thermal destruction to increase the peak number within the range from 3 to 5.5 min of holding. The peaks at 3.3, 3.45, 3.75, and 5.3 min coincide, but differ in relative area. In hypotonic lysis, there are no peaks at 11.25, 14.85, 15.7 and 16.25 min, specific to thermodegradation.

Analysis of possible reasons of different content and molecular weights of UV-absorbing substances in CBF, obtained by different destruction methods enabled to formulate the following assumptions. Firstly, this may be due to the decay of biomolecular complexes (protein-protein, protein-lipid, protein-polysaccharide) under the impact of physical and chemical factors that arise from a particular method of CB cell destruction, resulting in extraction of either isolated protein fragments or new peptides. Secondly, some destruction methods may involve the enzymes, under the effect of which the new peptide fragments appear. Thirdly, the impact of biomolecule aggregation and precipitation during ultracentrifugation or their cut-off during multistage ultrafiltration occur.

These findings are an important step towards further practical implementation of low temperatures in biotechnology, particularly, to the controlled isolation of low molecular weight components from biological raw material. Different modes of low-temperature impact on cord blood before ultrafiltration were established here to change the quantitative and qualitative composition of the obtained low-molecular weight fractions. Undoubtedly, this fact may affect the biological activity and therapeutic efficiency of finished pharmaceutical products, which is a promising trend of our further research.

Conclusions

Thus, based on the findings, the following has been established:

1. Low-temperature methods of CB destruction provide a significant increase ($p < 0.05$) in dry weight of the obtained low-molecular weight CB fractions by an average of 3 times compared to hypotonic lysis.

2. The total protein content in CBF may be varied by changing the method of CB destruction before ultrafiltration, *i. e.* when using rapid and slow freezing, this index is 3.3 and 2.8 times higher, respectively, than after hypotonic lysis.

3. The CB thermal destruction enhanced the content of total protein as compared to hypotonic lysis, rapid freezing and slow freezing by 11.7, 3.5 and 4.2 times, respectively.



фракцій КК в середньому у 3 рази порівняно з гіпотонічним лізісом.

2. Вміст загального білка в ФКК можливо варіювати шляхом зміни методу деструкції КК перед ультрафільтрацією: при використанні швидкого та повільного заморожування цей показник більший у 3,3 та 2,8 рази відповідно, ніж після гіпотонічного лізису.

3. Термодеструкція КК збільшувала вміст загального білка порівняно з гіпотонічним лізісом, швидким заморожуванням та повільним заморожуванням у 11,7, 3,5 та 4,2 рази відповідно.

4. Порівняльний аналіз піків у хроматографічних профілях ФКК (до 10 кДа) залежно від методу деструкції клітин показав, що кількість пептидів змінюється.

4. Comparative analysis of peaks in chromatographic profiles of CBF (below 10 kDa) depending on the method of cell destruction showed a change in the number of peptides.

References

1. Brock J, Golding D, Smith PM, et al. Update on the role of Actovegin in musculoskeletal medicine: a review of the past 10 years. *Clin J Sport Med.* 2020;30(1):83-90.
2. Deus IA, Mano JF, Custódio CA. Perinatal tissues and cells in tissue engineering and regenerative medicine. *Acta Biomater.* 2020; 110: 1–14.
3. Ehrhart J, Sanberg PR, Garbuzova-Davis S. Plasma derived from human umbilical cord blood: Potential cell-additive or cell-substitute therapeutic for neurodegenerative diseases. *J Cell Mol Med.* 2018; 22(12): 6157–66.
4. Emara AK, Anis H, Piuze NS. Human placental extract: the feasibility of translation from basic science into clinical practice. *Ann Transl Med [Internet].* 2020 Mar 17 [cited 2021 Sep 20]; 8(5): 156. Available from: <https://atm.amegroups.org/article/view/35941/html>
5. Fuller BJ, Lane N, Benson EE. *Life in the Frozen State.* London: CRC Press; 2004. 672 p.
6. Gulevsky OK, Moisieieva NN, Abakumova OS, Shchenyavsky II, Nikolchenko AYU, Gorina OL. inventors; Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of NAS of Ukraine, assignee. [Method of obtaining low-molecular fraction from cord blood of cattle]. Ukraine patent № 69652. 2012 May10. Ukrainian.
7. Komarov FI, Korovkin BF, Menshikov VV. [Biochemical studies in clinic]. Elista: APP Dzhangar; 2001. 216 p. Russian.
8. Leonel LCPC, Miranda CMFC, Coelho TM, et al. Decellularization of placentas: establishing a protocol. *Braz J Med Biol Res [Internet].* 2017 Nov 17 [cited 2021 Sep 20]; 51(1): e6382. Available from: <https://www.scielo.br/j/bjmb/a/Dwy7ZQQvjsSZtJXbL5gXJbP/abstract/?lang=en>
9. McIntyre JA, Jones IA, Danilkovich A, et al. The placenta: applications in orthopaedic sports medicine. *Am J Sports Med.* 2018; 46(1): 234–47.
10. Pogozhykh O, Prokopyuk V, Figueiredo C, Pogozhykh D. Placenta and placental derivatives in regenerative therapies: experimental studies, history, and prospects. *Stem Cells Int [Internet].* 2018 Jan 18 [cited 2021 Sep 20]; 2018: 4837930. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/sci/2018/4837930>
11. Querol S, Samarkanova D. Rapid review: next generation of cord blood banks; transplantation and beyond. *Transfusion.* 2019; 59(10): 3048–50.
12. Samarkanova D, Rodríguez L, Vives J, et al. Cord blood-derived platelet concentrates as starting material for new therapeutic blood components prepared in a public cord blood bank: from product development to clinical application. *Blood Transfus.* 2020; 18(3): 208–16.
13. Shabunin SV, Vostroilova GA, Shabanov IE. [Screening of biologically active substances depending on the technological parameters of cryogenic fractionation of the placenta]. *Problems of Cryobiology.* 2005; 15(3): 306–9. Russian.
14. Silini AR, Cargnoni A, Magatti M, et al. The long path of human placenta, and its derivatives, in regenerative medicine. *Front Bioeng Biotechnol [Internet].* 2015 Oct 19 [cited 2021

Література

1. Гулевський ОК, Моїсєєва НН, Абакумова ОС, Щенявський ІЙ, Нікольченко АЮ, Горіна ОЛ, винахідники; Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, патентовласник. Спосіб отримання низькомолекулярної фракції із кордової крові великої рогатої худоби. Патент України № 69652. 10.05.2012.
2. Жмакин АИ. Физические основы кробиологии. Успехи физических наук. 2008; 178(3): 243–66.
3. Комаров ФИ, Коровкин БФ, Меньшиков ВВ. Биохимические исследования в клинике. Элиста: АПП «Джангар»; 2001. 216 с.
4. Шабунин СВ, Вострилова ГА, Шабанов ИЕ. Скрининг биологически активных веществ в зависимости от технологических параметров криогенного фракционирования плаценты. Проблемы кробиологии. 2005; 15(3): 306–9.
5. Brock J, Golding D, Smith PM, et al. Update on the role of Actovegin in musculoskeletal medicine: a review of the past 10 years. *Clin J Sport Med.* 2020; 30(1): 83–90.
6. Deus IA, Mano JF, Custódio CA. Perinatal tissues and cells in tissue engineering and regenerative medicine. *Acta Biomater.* 2020; 110: 1–14.
7. Ehrhart J, Sanberg PR, Garbuzova-Davis S. Plasma derived from human umbilical cord blood: Potential cell-additive or cell-substitute therapeutic for neurodegenerative diseases. *J Cell Mol Med.* 2018; 22(12): 6157–66.
8. Emara AK, Anis H, Piuze NS. Human placental extract: the feasibility of translation from basic science into clinical practice. *Ann Transl Med [Internet].* 2020 Mar 17 [cited 2021 Sep 20]; 8(5): 156. Available from: <https://atm.amegroups.org/article/view/35941/html>.
9. Fuller BJ, Lane N, Benson EE. *Life in the Frozen State.* London: CRC Press; 2004. 672 p.
10. Leonel LCPC, Miranda CMFC, Coelho TM, et al. Decellularization of placentas: establishing a protocol. *Braz J Med Biol Res [Internet].* 2017 Nov 17. [cited 2021 Sep 20]; 51(1): e6382. Available from: <https://www.scielo.br/j/bjmb/a/Dwy7ZQQvjsSZtJXbL5gXJbP/abstract/?lang=en>
11. McIntyre JA, Jones IA, Danilkovich A, et al. The placenta: applications in orthopaedic sports medicine. *Am J Sports Med.* 2018; 46(1): 234–47.



12. Pogozhykh O, Prokopyuk V, Figueiredo C, Pogozhykh D. Placenta and placental derivatives in regenerative therapies: experimental studies, history, and prospects. *Stem Cells Int* [Internet]. 2018 Jan 18 [cited 2021 Sep 20]; 2018: 4837930. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/sci/2018/4837930>
13. Querol S, Samarkanova D. Rapid review: next generation of cord blood banks; transplantation and beyond. *Transfusion*. 2019; 59(10): 3048–50.
14. Samarkanova D, Rodríguez L, Vives J, et al. Cord blood-derived platelet concentrates as starting material for new therapeutic blood components prepared in a public cord blood bank: from product development to clinical application. *Blood Transfus*. 2020; 18(3): 208–16.
15. Silini AR, Cargnoni A, Magatti M, et al. The long path of human placenta, and its derivatives, in regenerative medicine. *Front Bioeng Biotechnol* [Internet]. 2015 Oct 19 [cited 2021 Sep 20]; 3:162. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2015.00162/full>
16. Xia J, Minamino S, Kuwabara K, et al. Stem cell secretome as a new booster for regenerative medicine. *Biosci Trends*. 2019; 13(4): 299–307.
17. Zhmakin AI. Physical aspects of cryobiology. *Physics-Uspekhi*. 2008; 51(3): 231–52.

