

УДК 57.086.13;57:536.483

М.В. Репін*, Ю.О. Чиж, Л.М. Марченко, Т.П. Говоруха, С.В. Нарожний

Склад та біологічна активність кріоекстрактів із тканин фетоплацентарного походження за різних умов виготовлення

UDC 57.086.13;57:536.483

M.V. Repin*, Yu.O. Chizh, L.M. Marchenko, T.P. Govorukha, S.V. Narozhnyy

Composition and Biological Activity of Fetoplacental Tissues-Derived Cryoextracts Being Differently Obtained

Реферат: Методом гель-проникної хроматографії досліджено білково-пептидний склад кріоекстрактів фетальних тканин (КЕФТ) та плаценти (КЕП) щурів. Кріоекстракти одержували із гомогенатів тканин за режимами заморожування-відігріву: 1 — одноразовим (–20°C); 2 — дворазовим (–20; –196°C) та 3 — триразовим (–20; –196; –196°C). Біологічну активність кріоекстрактів оцінювали *in vitro* за фагоцитарною активністю нейтрофільних гранулоцитів (НГ) крові інтактних щурів після їх інкубації з інактивованою культурою *Staphylococcus aureus* (2×10^9 кл/мл) протягом 45 та 120 хв для концентрацій екстрактів у середовищі інкубації: 1,6; 3,1; 6 мг/мл у перерахунку на суху речовину. Застосування режиму 3 забезпечувало більший вихід загального білка та низькомолекулярних сполук білково-пептидної природи у кріоекстракти. Вміст низькомолекулярних фракцій у КЕФТ перевищував такий у КЕП незалежно від режиму виготовлення. Інкубація НГ з кріоекстрактами значуще не збільшувала кількість нейтрофілів, які вступили в фагоцитоз. Однак для всіх зразків КЕП і КЕФТ було характерне дозозалежне підвищення поглинальної активності НГ протягом 45-хвилинної інкубації порівняно з контролем.

Ключові слова: кріоекстракт плаценти, кріоекстракт фетальних тканин; гель-проникна хроматографія; фагоцитарна активність нейтрофілів.

Abstract: The protein-peptide composition of fetal tissues (FTCEs) and placenta (PCE) cryoextracts of rats was investigated by gel permeation chromatography. Cryoextracts were derived from tissue homogenates using the freeze-warming modes: 1 – single (–20°C); 2 – double (–20; –196°C) and 3 – triple (–20; –196; –196°C) ones. The biological activity of cryoextracts was *in vitro* evaluated by the phagocytic activity of neutrophil granulocytes (NG) of the blood of intact rats after incubation with an inactivated culture of *Staphylococcus aureus* (2×10^9 cells/ml) for 45 and 120 min for the concentrations of extracts in the incubation medium: 1.6; 3.1; 6 mg/ml in terms of dry substance. The use of mode 3 ensured a greater yield of total protein and low molecular weight compounds of a protein-peptide nature in the composition of cryoextracts. The content of low-molecular-weight fractions in FTCE exceeded that in PCE, regardless of the obtaining mode. Incubation of NG with cryoextracts did not significantly increase the number of neutrophils which entered into phagocytosis. However, all the samples of PCE and FTCE were characterized by a dose-dependent rise in the NG absorption activity during the 45-minute incubation compared to the control.

Key words: placental cryoextract, cryoextract of fetal tissues; gel permeation chromatography; phagocytic activity of neutrophils.

Використання біологічно активних речовин фетоплацентарного походження, які містять регуляторні пептиди, гормони, фактори росту, цитомедіни, може бути перспективним методом впливу на регенераційний потенціал власних стовбурових клітин органів [10, 11, 20, 22]. Доведена ефективність низькомолекулярних пептидних препаратів, які одержані з культивованих клітин кісткового мозку [8], секретому з плацентарних та мезенхімальних стовбурових клітин [16, 21], мікрооточення метанефроса з плодів щурів [17], а також алогенного кріоекстракту плаценти для лікування ниркової недостатності у експериментальних тварин [5].

The use of biologically active substances of fetoplacental origin, which contain regulatory peptides, hormones, growth factors, cytomedins, can be a promising tool of influencing the regenerative potential of the organs' own stem cells [1, 2, 19, 22]. The effectiveness of low-molecular-mass peptide products obtained from cultured bone marrow cells [10], secretome from placental and mesenchymal stem cells [11, 21], microenvironment of metanephros from rat fetuses [12] has been proven as well as allogeneic placenta cryoextract for treatment of renal failure in experimental animals [15].

The substantiation of cryogenic technologies for obtaining biologically active compounds from

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини 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: 1nvrepin@gmail.com

*To whom correspondence should be addressed:

23, Pereyaslavska str., Kharkiv, Ukraine 61016;
tel.: +380 57 373 7435, fax: +380 57 373 5952
e-mail: 1nvrepin@gmail.com

Надійшла 02.07.2022

Прийнята до друку 27.02.2023

Received 02, July, 2022

Accepted 27, February, 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.

Обґрунтування криогенних технологій для отримання біологічно активних сполук із тканин фетоплацентарного походження є актуальним питанням кріобіології. Використання низьких температур у процесі переробки біологічної сировини сприяє повнішому руйнуванню клітин та їх мембран і зрештою виходу у розчин біологічно активних речовин. Згідно з сучасними кріобіологічними уявленнями основними чинниками, що призводять до кріопошкодження клітин у процесі заморожування-відігріву, вважають формування і зростання внутрішньо- і позаклітинних кристалів льоду, підвищення концентрації речовин зовні та всередині клітини, зміну іонної сили та рН розчину, а також дегідратацію клітин [1]. Отже, використання низьких температур і різних режимів заморожування у процесі переробки біологічної сировини дозволяє досягти більшої екстрактивності біологічно активних компонентів, що сприятиме високій активності кінцевого продукту.

З огляду на вищенаведене проведення фундаментальних досліджень механізмів дії кріоекстрактів тканин фетоплацентарного походження є перспективним і потребує вивчення білково-пептидного складу екстрактів та біологічної активності їхніх окремих фракцій.

Мета роботи — визначення кількісного та якісного складу, біологічної активності кріоекстрактів із фетальних тканин та плаценти залежно від умов їх отримання.

Матеріали та методи

Усі маніпуляції з тваринами були узгоджені з Комітетом із біоетики при ІПКіК НАН України (протокол №2 від 26.04.2022) та виконувалися відповідно до положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986) і «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», схвалених 1 Національним конгресом з біоетики (Київ, 2001).

Матеріалом дослідження були кріоекстракти, які отримували з гомогенатів внутрішніх органів плодів та плаценти білих безпородних щурів самиць ($n = 5$) на 18-ту добу вагітності.

Кріоекстракти з фетальних тканин (КЕФТ) та плаценти (КЕП) отримували модифікованим методом на основі описаного раніше [5]. Після відмивання біоматеріалу від крові ізотонічним розчином NaCl (150 мМ) та подрібнювання в гомогенізаторі гомогенати піддавали трьом різним режимам низькотемпературної обробки:

tissues of fetoplacental origin is an urgent issue of cryobiology. The use of low temperatures in processing biological raw materials contributes to a more complete destruction of cells and their membranes and, ultimately, the release of biologically active substances into the solution. According to current concepts in cryobiology, the formation and growth of intracellular and extracellular ice crystals, an increase in the concentration of substances outside and inside the cell, a change in the ionic strength and pH of the solution, as well as dehydration of cells are considered to be the main factors that lead to cryoinjury of cells during freezing and warming [3]. Therefore, the use of low temperatures and different freezing modes during processing the biological raw materials allows to achieve greater extractability of biologically active components, which will contribute to the high activity of the final product.

Based on the above, performing the fundamental studies of action mechanisms of fetoplacental tissues-derived cryoextracts is promising and necessitates the study of the protein-peptide composition of the extracts and biological activity of their individual fractions.

The purpose of this research was to determine the quantitative and qualitative compositions of fetal tissues' and placental cryoextracts depending on their obtaining conditions, as well as the biological activity of the resulted cryoextracts.

Materials and methods

All manipulations with animals were carried out in agreement with the Committee on Bioethics at the IPC&C of the National Academy of Sciences of Ukraine (protocol No. 2 dated 26/04/2022) and in accordance with the provisions of the 'European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes' (Strasbourg, 1986) as well as 'General ethical principles of animal experiments', approved by the 1st National Congress in Bioethics (Kyiv, 2001).

The research material was the cryoextracts obtained from fetal and placental homogenates of white outbred female rats ($n = 5$) on day 18 of pregnancy.

Cryoextracts derived from fetal tissues (FTCE) and placenta (PCE) were obtained by a previously described modified method [15]. After washing the biomaterial from blood with an isotonic NaCl solution (150 мМ) and grinding in a homogenizer, the homogenates were subjected to three different modes of low-temperature processing:



- режим 1 (КЕП-1; КЕФТ-1) — охолодження до -20°C зі швидкістю 1–2 град/хв з подальшим відігрівом на водяній бані за температури 37°C ;

- режим 2 (КЕП-2; КЕФТ-2) — охолодження до -20°C зі швидкістю 1–2 град/хв; відтавання; заморожування до -196°C зі швидкістю 200 град/хв з наступним відігрівом на водяній бані за температури 37°C ;

- режим 3 (КЕП-3; КЕФТ-3) — охолодження до -20°C зі швидкістю 1–2 град/хв; двократне заморожування до -196°C зі швидкістю 200 град/хв; відігрів на водяній бані за температури 37°C після кожного етапу охолодження.

Після низькотемпературної обробки гомогенати змішували з ізотонічним розчином NaCl (150 мМ) у співвідношенні 1:2, центрифугували 20 хв при 4500g. Супернатанти збирали і фільтрували крізь мембранний фільтр 0,22 мкм (Millipore Corp. Carrigtwohill, Co. Cork, Ірландія). Для подальшого застосування отримані супернатанти (кріоекстракти) зберігали в рідкому азоті.

Окремі фракції кріоекстрактів одержували методом гель-хроматографії на колонці 27×2 см з сефадексом G-100 (Pharmacia Fine Chemicals Uppsala, Швеція). На колонку наносили 3 мл кріоекстракту, об'єм окремих фракцій складав 3 мл. Для калібрування колонки використовували сироватковий альбумін бика молекулярною масою (м. м.) 66 кДа (Sigma, США), цитохром С з м. м. 12 кДа (Sigma).

Вміст білка у кріоекстрактах та їхніх фракціях вимірювали спектрофотометричним методом [13] на спектрофотометрі Unicam SP8000 (Pye Unicam Ltd, Велика Британія).

Біологічну активність кріоекстрактів оцінювали *in vitro* за фагоцитарною активністю нейтрофільних гранулоцитів (НГ) крові інтактних щурів після їх інкубації з інактивованою культурою *Staphylococcus aureus* (2×10^9 кл/мл) протягом 45 та 120 хв [6] для концентрацій екстрактів у середовищі інкубації: 1,6; 3,1; 6 мг/мл у перерахунку на суху речовину. Підраховували відсоток НГ, які вступили в фагоцитоз — фагоцитарний індекс (ФІ), фагоцитарне число (ФЧ) — середню кількість бактерій, поглинутих клітиною, а також обчислювали коефіцієнт завершення фагоцитозу (КЗФ) — відношення ФЧ 45 хв / ФЧ 120 хв.

Аналіз мазків крові на предметному склі проводили в оптичному мікроскопі «Granum R 4003» (Granum, Китай). Фотореєстрацію виконували за допомогою відеокамери «UCMOS 03100 КРА» (3.1 Mpix) з адаптером «Touptek photonica FMA 050» (TouptCam, Китай).

- mode 1 (PCE-1; FTCE-1) — cooling to -20°C at a rate of 1–2 deg/min with subsequent warming in a water bath at a temperature of 37°C ;

- mode 2 (PCE-2; FTCE-2) — cooling to -20°C at a rate of 1–2 deg/min; thawing; freezing to -196°C at a rate of 200 deg/min followed by rewarming in a water bath at a temperature of 37°C ;

- mode 3 (PCE-3; FTCE-3) — cooling to -20°C at a rate of 1–2 deg/min; double freezing to -196°C at a rate of 200 deg/min; warming in a water bath at a temperature of 37°C after each stage of cooling.

After low-temperature treatment, the homogenates were mixed with an isotonic NaCl solution (150 mM) in a ratio of 1:2, centrifuged for 20 min at 4500g. Supernatants were collected and filtered through a 0.22 μm membrane filter (Millipore Corp. Carrigtwohill, Co. Cork, Ireland). For further use, the resulting supernatants (cryo-extracts) were stored in liquid nitrogen.

Separate fractions of cryoextracts were obtained by gel chromatography using a 27×2 cm column with Sephadex G-100 (Pharmacia Fine Chemicals Uppsala, Sweden). Three milliliters of cryoextract were applied to the column; the volume of individual fractions was 3 ml. To calibrate the column, we used bovine serum albumin with a molecular mass (m. m.) of 66 kDa (Sigma, USA), cytochrome C with m. m. of 12 kDa (Sigma).

The protein content in cryoextracts and their fractions was measured by the spectrophotometric method [7] with a Unicam SP8000 spectrophotometer (Pye Unicam Ltd, Great Britain).

The biological activity of cryoextracts was evaluated *in vitro* by the phagocytic activity of neutrophil granulocytes (NG) of the blood of intact rats after their incubation with an inactivated culture of *Staphylococcus aureus* (2×10^9 cells/ml) for 45 and 120 min [16] for the concentrations of the extracts in the incubation medium: 1.6; 3.1; 6 mg/ml in terms of dry substance. The percentage of NG that entered phagocytosis was calculated – the phagocytic index (PhI), the phagocytic number (PhN) – the average number of bacteria absorbed by the cell, as well as the phagocytosis completion ratio (PhCR) – the ratio of PhN 45 min / PhN 120 min.

Blood smears were analyzed on a glass slide with a Granum R 4003 optical microscope (Granum, China). Photo registration was performed using a video camera UCMOS 03100 KPA (3.1 Mpix) with a Touptek photonica FMA 050 adapter (TouptCam, China).

The results were statistically processed using the Statgraphics Plus program for the Windows operating system (Manugistics Inc., Rockville, MD, USA). Data are presented as mean \pm standard deviation.

Статистичну обробку результатів проводили з використанням програми «Statgraphics Plus» для Windows (Manugistics Inc., Rockville, MD, США). Дані наведено як середнє значення \pm стандартне відхилення. Значущість оцінювали за критерієм Краскала-Уолліса ($n = 5, p < 0,05$).

Результати та обговорення

За допомогою гелі-проникної хроматографії було досліджено склад та розподіл за молекулярною масою речовин білково-пептидної природи кріоекстрактів із фетальних тканин та тканини плаценти щура.

Об'ємна частка білка з м. м. від 20 до 150 кДа в кріоекстрактах плаценти залежно від режиму виготовлення для КЕП-1 складала 80,28%; КЕП-2 — 79,22%; КЕП-3 — 72,78%, а сумарна концентрація білка у цих кріоекстрактах дорівнювала ($23,81 \pm 1,03$); ($22,92 \pm 1,17$) та ($25,01 \pm 1,19$) мг/мл відповідно. Як видно з хроматограм (рис. 1), частка низькомолекулярних фракцій з м. м. 4–12 кДа залежала від режиму кріоекстракції, для КЕП-1 вона складала 19,60%, КЕП-2 — 20,78%, КЕП-3 — 27,04%. При цьому режим 3 забезпечував на 30% більший вихід цих речовин у порівнянні з режимом 1.

Встановлено декілька причин збільшення об'ємної частки низькомолекулярних речовин у кріоекстрактах. Ймовірно, одна з них пов'язана з кріодеструкцією високомолекулярних протеїнів та їхнім розпадом на мономери з меншою молекулярною масою. Результати хроматографії також свідчать про те, що КЕП практично не мали у своєму складі фракцій з м. м. 14–24 кДа, які за даними літератури містять секреторні [18]

Significance was assessed by the Kruskal-Wallis test ($n = 5, p < 0.05$).

Results and discussion

Using gel permeation chromatography, the composition and molecular mass distribution of protein-peptide substances of cryoextracts derived from rats' fetal tissues and placenta tissue was investigated.

The volume fraction of protein with molecular mass from 20 to 150 kDa in the placenta cryoextracts, depending on the mode of their obtaining, for PCE-1 was 80.28%; PCE-2 – 79.22%; PCE-3 – 72.78%, and the total protein concentration in these cryoextracts was equal to (23.81 ± 1.03); (22.92 ± 1.17) and (25.01 ± 1.19) mg/ml, respectively. As the chromatograms demonstrate (Fig. 1), the share of low molecular mass fractions with a molecular mass of 4–12 kDa depended on the cryoextraction mode, for PCE-1 it was 19.60%, 20.78% for PCE-2, 27.04% for PCE-3. At the same time, mode 3 provided a 30% higher yield of these substances compared to mode 1.

Several reasons of the increased volume fraction of low molecular mass substances in cryoextracts have been established. Probably, one of them is related to the cryodestruction of high-molecular proteins and their disintegration into monomers with a lower molecular mass. Chromatography results also indicate that PCE had practically no fractions with molecular mass of 14–24 kDa, which, according to the published data contain secretory [13] and prolactin-like [2] proteins, as well as some types of placental lactogen [8].

For FTCE, a different distribution of fractions by protein concentration was noted, as well as the

ratio between high- (20–150 kDa) and low-molecular-mass (4–20 kDa) fractions (Fig. 2).

Protein concentrations in cryoextracts of fetal tissues had the following values: FTCE-1 — (20.16 ± 1.04) mg/ml; FTCE-2 — (21.17 ± 1.01) mg/ml; FTCE-3 — (22.17 ± 0.95) mg/ml. The volume fraction of protein with a molecular mass of 20–150 kDa, depending on the mode of obtaining, was 67.77% for FTCE-1; FTCE-2 — 62.93%; FTCE-3 — 62.51%, and low molecular mass proteins and peptides (m. m. less than

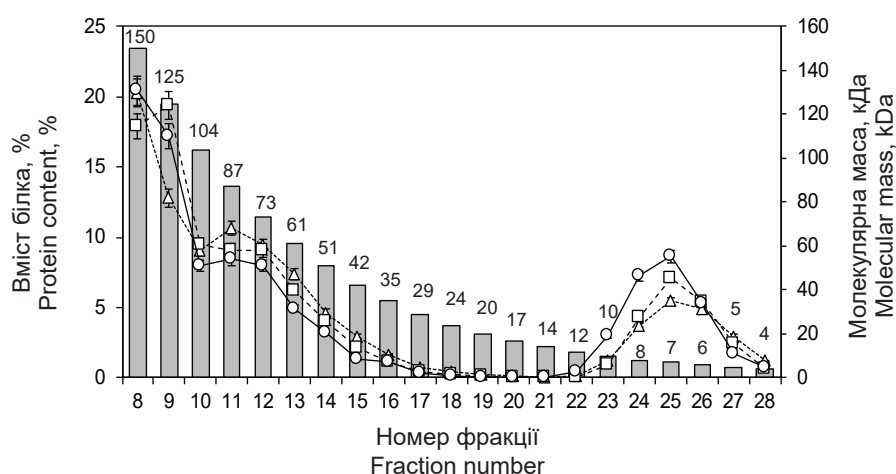


Рис. 1. Гелі-хроматограми кріоекстрактів плаценти, отриманих за різних режимів низькотемпературної обробки: Δ — КЕП-1, \square — КЕП-2, \circ — КЕП-3, \blacksquare — молекулярна маса фракції.

Fig. 1. Gel chromatograms of placenta cryoextracts obtained with different modes of low-temperature processing: Δ – PCE-1, \square – PCE-2, \circ – PCE-3, \blacksquare – is the fraction molecular mass.



та пролактиноподібні [11] білки, а також деякі види плацентарного лактогену [14].

Для КЕФТ відмічено інший розподіл фракцій за концентраціями білка, а також співвідношення між високо- (20–150 кДа) та низькомолекулярними (4–20 кДа) фракціями (рис. 2).

Концентрації білка в кріоекстрактах фетальних тканин мали такі значення: КЕФТ-1 — (20,16 ± 1,04) мг/мл; КЕФТ-2 — (21,17 ± 1,01) мг/мл; КЕФТ-3 — (22,17 ± 0,95) мг/мл. Об'ємна частка білка з м. м. 20–150 кДа залежно від режиму виготовлення складала для КЕФТ-1 67,77%; КЕФТ-2 — 62,93%; КЕФТ-3 — 62,51%, а низькомолекулярні білки і пептиди (м. м. менше 20 кДа), що містяться в цих екстрактах, становили 32,23; 37,12 та 37,54% відповідно.

20 кДа) contained in these extracts were 32.23%; 37.12 and 37.54%, respectively.

During the analysis of the chromatogram data, it was established that in three types of PCE the content of proteins with a molecular mass greater than 100 kDa was from 42 to 46% (see Fig. 1), but in FTCE these proteins made 24–35% (Fig. 2). As a rule, such proteins are a constituent part of the cytoskeleton of cells, the protein base of myofilaments and microtubules.

Proteins with molecular mass of 20–100 kDa, depending on the obtaining conditions, accounted for 27–38% in the PCE group and about 27–43% in the FTCE one. Proteins with such a molecular mass are functionally represented mainly by protein-enzymes involved in the vital activity of cells and tissues.

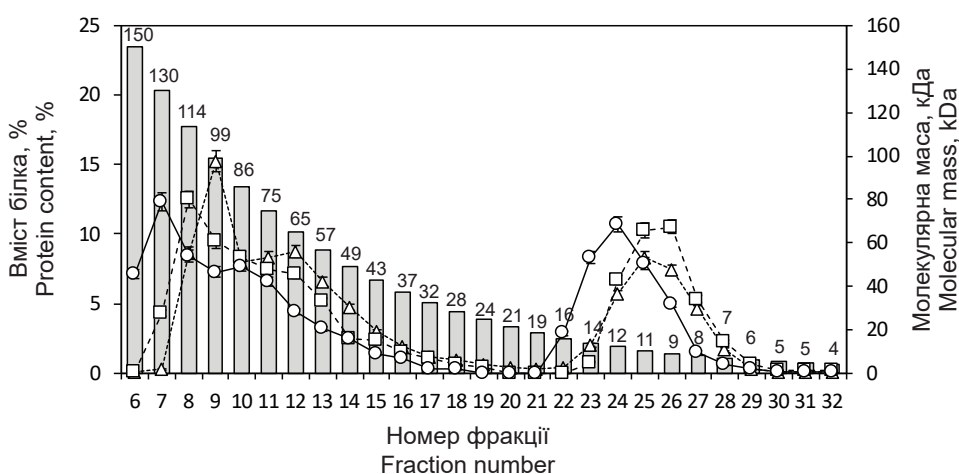


Рис. 2. Гель-хроматограми кріоекстрактів фетальних тканин щурів, отриманих за різних режимів низькотемпературної обробки: Δ — КЕФТ-1, \square — КЕФТ-2, \circ — КЕФТ-3, \blacksquare — молекулярна маса фракції.

Fig. 2. Gel chromatograms of cryoextracts of rat fetal tissues obtained with different modes of low-temperature processing: Δ – FTCE-1, \square – FTCE-2, \circ – FTCE-3, \blacksquare – fraction molecular mass.

Під час аналізу даних хроматограм встановлено, що в трьох видах КЕП вміст білків з м. м. більше 100 кДа складав від 42 до 46 % (див. рис. 1), але у КЕФТ цих білків було 24–35 % (рис. 2). Як правило, такі білки є складовою частиною цитоскелета клітин, білковою основою міофіламентів і мікротрубочок.

Білки з м. м. 20–100 кДа залежно від умов отримання складала 27–38% у групі КЕП і близько 27–43% у групі КЕФТ. Білки з такою молекулярною масою функціонально представлено в основному білками-ферментами, що беруть участь у життєдіяльності клітин і тканин.

Вихід низькомолекулярних сполук у КЕФТ збільшувався на 19% від режиму 1 до режиму 3 (рис. 3). Однак вміст пептидів з м. м. менше 6 кДа

The output of low molecular mass compounds in FTCE increased by 19% from mode 1 to mode 3 (Fig. 3). However, the content of peptides with molecular mass less than 6 kDa was only 0.67%, in contrast to PCE, in which the content of such peptides was 9.1%.

Low-molecular-mass proteins and peptides with molecular mass less than 20 kDa can be classified as regulatory biologically active tissue components. It is believed that they can perform the functions of mediators, modulators and hormones [18].

In addition, certain fractions of low molecular mass substances in the studied extracts may be regulatory peptides containing from 4 to 50 amino acid residues, assuming the fact that the molecular mass of one amino acid is approximately 140 Da. We believe that the largest number of such peptides can be contained in cryoextracts prepared with mode 3.

Therefore, a three-time cycle of the freeze-warming of the placental and fetal tissues homogenates ensured a greater yield of total protein and low-molecular-mass compounds of a protein-peptide nature in the cryoextracts. The content of low-molecular fractions in FTCE was significantly higher than in PCE, regardless of the cryoextract manufacturing mode.

складав всього 0,67% на відміну від КЕП, у якому вміст таких пептидів був 9,1%.

Низькомолекулярні білки і пептиди з м. м. менше 20 кДа можна віднести до регуляторних біологічно активних компонентів тканин. Вважається, що вони можуть виконувати функції медіаторів, модуляторів і гормонів [9].

Крім того, певні фракції низькомолекулярних речовин в досліджуваних екстрактах можуть бути регуляторними пептидами, що містять у своєму складі від 4 до 50 амінокислотних залишків, виходячи з того, що молекулярна маса однієї амінокислоти дорівнює приблизно 140 Да. На нашу думку, найбільша кількість таких пептидів може міститися в кріоекстрактах, виготовлених за режимом 3.

Отже, триразовий цикл заморожування-відігріву гомогенатів плаценти та фетальних тканин забезпечував більший вихід загального білка та низькомолекулярних сполук білково-пептидної природи у кріоекстракти. Вміст низькомолекулярних фракцій у КЕФТ був значно більший за КЕП незалежно від режиму виготовлення кріоекстракту.

Зважаючи на те, що КЕП і КЕФТ можуть мати імуномодельований вплив не тільки на організм, а і на клітини, які беруть участь у фагоцитозі, було доцільним оцінити біологічну активність кріоекстрактів за фагоцитарною активністю НГ крові інтактних щурів *in vitro* після інкубації з кріоекстрактами.

Фагоцитарна активність лейкоцитів периферичної крові є важливим діагностичним критерієм і може використовуватися для оцінки імунокоригувальної дії ліків (*ex vivo*) та розробки скринінгових тест-систем для створення нових імуномодельованих препаратів (*in vitro*) [4]. Найбільш інформативними для оцінки активності фагоцитозу вважають ФІ — відсоток клітин, що беруть участь у фагоцитозі, від загальної кількості підрахованих нейтрофілів; ФЧ, що характеризує поглинальну активність НГ та КЗФ, який дозволяє оцінити перетравлювальну здатність НГ. На рис. 4 представлені фотографії препаратів мазків крові інтактного щура (після додавання фізіологічного розчину в середовище інкубації) та після інкубації НГ із КЕП та КЕФТ. Як видно, після стимуляції кріоекстрактами в цитоплазмі НГ спостерігалася значно більша кількість фагоцитованих стафілококів.

Слід зазначити, що кількість фагоцитуючих НГ щурів без додавання кріоекстрактів (конт-

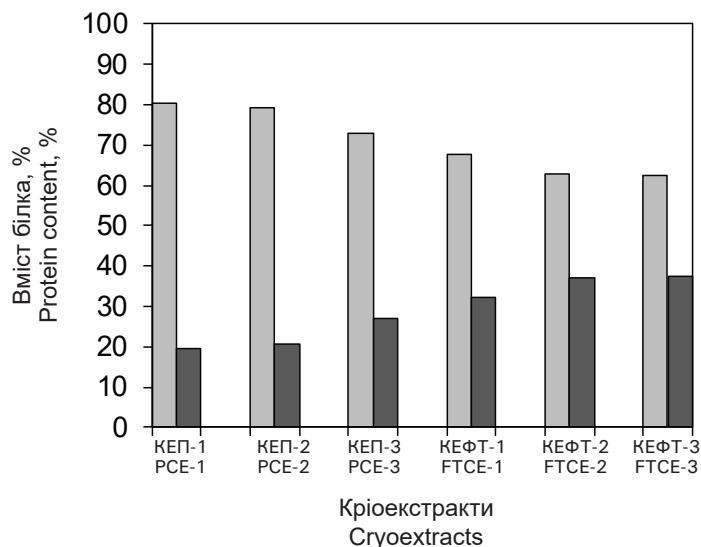


Рис. 3. Процентний вміст високомолекулярних (■) та низькомолекулярних (■) речовин (площі під відповідними кривими на рис. 1 та 2) у кріоекстрактах плаценти та фетальних тканин.

Fig. 3. Percentage content of high-molecular (■) and low-molecular (■) substances (areas under the corresponding curves in Figs. 1 and 2) in cryoextracts of placenta and fetal tissues.

Considering the fact that PCE and FTCE can have an immune modulating effect not only on the body, but also on cells involved in phagocytosis, it was reasonable to evaluate the biological activity of cryoextracts by the phagocytic activity of blood NG of intact rats *in vitro* after incubation with cryoextracts.

The phagocytic activity of peripheral blood leukocytes is an important diagnostic criterion and can be used to evaluate the immune corrective effect of drugs (*ex vivo*) and to develop screening test systems for the creation of new immune modulating products (*in vitro*) [14]. PhI is considered to be the most informative for assessing phagocytosis activity, *i. e.* the percentage of cells involved in phagocytosis from the total number of counted neutrophils; PF, which characterizes the absorption activity of NG and PhCR, which allows the evaluation of the NG digestibility. Fig. 4 presents the photographs of the samples of blood smears of an intact rat (after adding saline to the incubation medium) and after incubation of NG with PCE and FTCE. As it can be seen, after stimulation with cryoextracts, a significantly larger number of phagocytosed staphylococci was observed in the NG cytoplasm.

It should be noted that the number of phagocytic NG in rats with no cryoextracts (control) was quite high and made $(82.22 \pm 5.05)\%$ of the total amount of NG (Table 1).



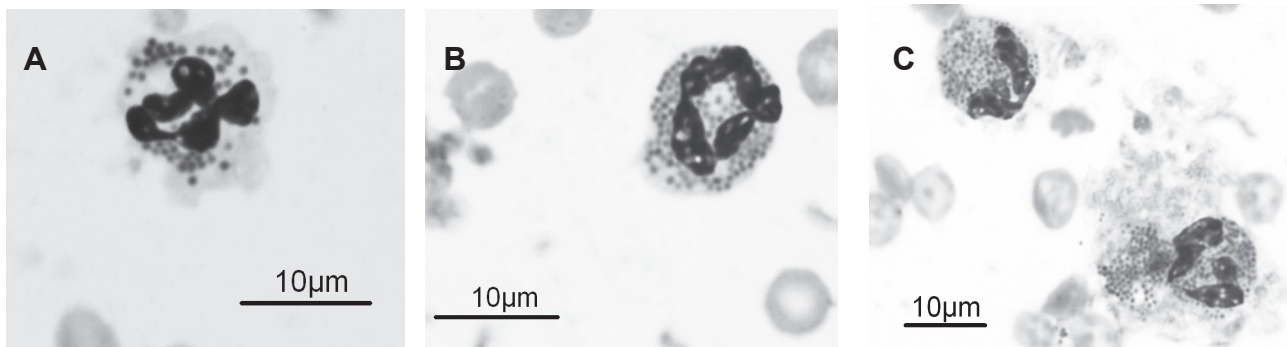


Рис. 4. Нейтрофільні гранулоцити крові інтактного щура без стимуляції криоекстрактами (А) та після інкубації з КЕП-3 (В) та КЕФТ-3 (С).

Fig. 4. Neutrophil granulocytes from the blood of an intact rat without stimulation with cryoextracts (A) and after incubation with PCE-3 (B) and FTCE-3 (C).

роль) була досить високою і складала ($82,22 \pm 5,05$)% від загальної кількості НГ (табл. 1).

З табл. 1 видно, що інкубація нативних лейкоцитів з КЕП незалежно від концентрації та режиму виготовлення екстракту значуще не збільшувала кількість фагоцитуючих нейтрофілів (ФІ).

Результати дослідження поглинальної активності НГ показали характерне підвищення ФЧ

Table 1 demonstrates that the incubation of native leukocytes with PCE, regardless of the concentration and mode of obtaining the extract, did not significantly enhance the number of phagocytizing neutrophils (PhI).

The findings on the absorbing activity of NG showed a characteristic increase in the PhN in all specified types of PCE after a 45-minute incu-

Таблиця 1. Фагоцитарна активність НГ під впливом КЕП

Table 1. Phagocytic activity of NG under the PCE influence

Тип криоекстракту Type of cryoextract	Концентрація екстракту, мг/мл Extract concentration, mg/ml	Показники фагоцитарної активності Phagocytic activity indexes				
		ФІ, % 45 хв інкубації PhI, % 45 min incubation	ФІ, % 120 хв інкубації PhI, % 120 min incubation	ФЧ, 45 хв інкубації PhN 45 min incubation	ФЧ, 120 хв інкубації PhN 120 min incubation	КЗФ, ФЧ45/ФЧ120 PhCR, PhN45/PhN120
Контроль Control	0	$82,22 \pm 5,05$	$82,89 \pm 6,3$	$24,64 \pm 5,89$	$21,13 \pm 5,98$	$1,17 \pm 0,02$
КЕП-1 PCE-1	1,6	$88,00 \pm 1,1$	$85,40 \pm 5,1$	$33,19 \pm 3,15$	$29,93 \pm 6,73$	$1,11 \pm 0,01^*$
	3,1	$85,40 \pm 2,2$	$90,67 \pm 4,9$	$36,19 \pm 4,35^*$	$33,51 \pm 7,43$	$1,08 \pm 0,02^*$
	6	$89,34 \pm 3,1$	$85,40 \pm 4,7$	$40,43 \pm 5,23^*$	$35,52 \pm 6,83^*$	$1,14 \pm 0,03$
КЕП-2 PCE-2	1,6	$76,67 \pm 2,9$	$72,67 \pm 3,9$	$30,68 \pm 5,37$	$29,80 \pm 6,00$	$1,03 \pm 0,02^*$
	3,1	$78,67 \pm 3,2$	$75,33 \pm 5,1$	$32,83 \pm 5,34$	$30,75 \pm 8,67$	$1,07 \pm 0,01^*$
	6	$82,67 \pm 4,1$	$72,67 \pm 4,8$	$35,02 \pm 3,18^*$	$31,38 \pm 8,59$	$1,12 \pm 0,02$
КЕП-3 PCE-3	1,6	$80,00 \pm 4,5$	$80,00 \pm 3,9$	$28,19 \pm 5,65$	$23,43 \pm 5,44$	$1,20 \pm 0,01^*$
	3,1	$83,33 \pm 3,9$	$80,67 \pm 4,5$	$30,33 \pm 4,66$	$28,61 \pm 5,93$	$1,06 \pm 0,01^*$
	6	$80,00 \pm 3,7$	$82,67 \pm 5,0$	$36,85 \pm 5,11^*$	$33,11 \pm 4,83^*$	$1,11 \pm 0,04$

Примітка: * — значення значуще порівняно з групою контролю, $p < 0,05$.

Note: * – differences are significant if compared with the control, $p < 0.05$.

у всіх вказаних видів КЕП після 45-хвилинної інкубації у порівнянні з контролем. Необхідно відзначити дозозалежний ефект КЕП для усіх режимів його виготовлення (збільшення ФЧ з підвищенням концентрації КЕП у середовищі інкубації).

Через 120 хв інкубації ФЧ зменшувалося на 13% у контролі та для КЕП-1, тоді як для екстрактів КЕП-2 та КЕП-3 — на 7–9%, що може свідчити про інгібування перетравлювання мікробних частинок під впливом екстрактів. Аналіз КЗФ також підтвердив пригнічення перетравлювальної здатності НГ під впливом КЕП-1 та КЕП-2. Тільки інкубація з КЕП-3 у концентрації 1,6 мг/мл приводила до підвищення КЗФ.

У табл. 2 представлені показники фагоцитарної активності НГ після додавання в інкубаційне середовище кріоекстрактів фетальних тканин. Інкубація нативних НГ із КЕФТ протягом 45 та 120 хв не впливала на кількість фагоцитуючих лейкоцитів, при цьому ФІ відповідав контролю.

Аналіз поглинальної активності НГ показав, що всі види КЕФТ, крім КЕФТ-3 у концен-

bation in comparison with the control. It is necessary to note the dose-dependent effect of PCE for all modes of its obtaining (rise in PhN with increasing concentration of PCE in the incubation medium).

After 120 min of incubation, PF decreased by 13% in the control and for PCE-1, while for PCE-2 and PCE-3 extracts, the PhN decreased by 7–9%, likely indicating the inhibition of digestion of microbial particles under the influence of the extracts. Analysis of PhCR also confirmed the inhibition of NG digestibility under the influence of PCE-1 and PCE-2. Only incubation with PCE-3 at a concentration of 1.6 mg/ml led to an increase in PhCR.

Table 2 shows the indices of NG phagocytic activity after adding cryoextracts of fetal tissues to the incubation medium. Incubation of native NG with FTCE for 45 and 120 min did not affect the number of phagocytic leukocytes, while the PhI corresponded to the control.

The analysis of absorption activity of NG showed that all types of FTCE, excluding FTCE-3 at a concentration of 6 mg/ml, showed a stimulating

Таблиця 2. Фагоцитарна активність НГ під впливом КЕФТ
Table 2. Phagocytic activity of NG under the FTCE influence

Тип кріоекстракту Type of cryoextract	Концентрація екстракту, мг/мл Extract concentration, mg/ml	Показники фагоцитарної активності Phagocytic activity indexes				
		ФІ, % 45 хв інкубації PhI, % 45 min incubation	ФІ, % 120 хв інкубації PhI, % 120 min incubation	ФЧ, 45 хв інкубації PhN 45 min incubation	ФЧ, 120 хв інкубації PhN 120 min incubation	КЗФ, ФЧ45/ФЧ120 PhCR, PhN45/PhN120
Контроль Control	0	80,67 ± 2,40	80,00 ± 0,67	25,98 ± 6,70	23,03 ± 6,77	1,14 ± 0,03
КЕФТ-1 FTCE-1	1,6	84,67 ± 3,1	81,33 ± 1,2	35,65 ± 3,25*	32,75 ± 6,50	1,09 ± 0,01*
	3,1	78,00 ± 3,5	80,00 ± 2,2	38,88 ± 5,15*	33,92 ± 7,79	1,15 ± 0,02
	6	78,67 ± 4,1	84,00 ± 2,5	36,99 ± 6,19*	34,27 ± 7,41	1,08 ± 0,01*
КЕФТ-2 FTCE-2	1,6	78,00 ± 2,9	72,00 ± 2,8	31,71 ± 3,02	30,36 ± 8,66	1,02 ± 0,03*
	3,1	82,67 ± 2,8	78,67 ± 2,1	37,62 ± 4,93*	33,99 ± 8,06	1,11 ± 0,02
	6	82,00 ± 3,5	80,00 ± 0,9	38,83 ± 5,84*	30,93 ± 8,33	1,26 ± 0,03*
КЕФТ-3 FTCE-3	1,6	78,67 ± 4,1	79,33 ± 1,1	31,39 ± 6,00	29,59 ± 4,98	1,06 ± 0,01*
	3,1	80,67 ± 3,8	80,00 ± 0,9	30,66 ± 5,42	28,88 ± 5,38	1,06 ± 0,02*
	6	80,00 ± 4,1	80,00 ± 1,3	25,65 ± 4,00	24,35 ± 4,00	1,05 ± 0,02*

Примітка: * — значення значуще порівняно з групою контролю, $p < 0,05$.

Note: * – differences are significant if compared with the control, $p < 0.05$.

трації 6 мг/мл, виявляли стимулювальний вплив на поглинальну здатність НГ (ФЧ) через 45 хв інкубації.

Для КЕФТ-1 та КЕФТ-2 спостерігалось дозозалежне підвищення ФЧ. Через 120 хв інкубації ФЧ НГ у контролі знижувалось у середньому на 14%. За показником завершеності фагоцитозу тільки один екстракт фетальних тканин значуще підвищував перетравлювальну здатність НГ — це КЕФТ-2 у найвищій концентрації 6 мг/мл. Треба відзначити, що КЕФТ-3 суттєво пригнічував перетравлювальну активність НГ, особливо в концентрації 6 мг/мл, про що свідчить КЗФ.

Підтвердження отриманим даним є у літературі. Так показано, що низькомолекулярні фракції кордової крові мали імуномодельовальну дію *in vivo*, а стимулювальний ефект пояснювався безпосередньою участю її компонентів у реакціях енергетичного метаболізму клітин. Зберігання низькомолекулярної фракції кордової крові при -80°C , а також у ліофілізованому стані не знижувало її біологічної активності як *in vivo*, так і *in vitro*. Також авторами було доведено, що низькомолекулярні фракції кордової крові нижче 5 кДа, а також крові молочних телят підвищували фагоцитарну активність нейтрофілів *in vitro* [12]. Деякі автори показали дозозалежний ефект низькомолекулярних фракцій кордової крові [2, 3]. За даними літератури кріоекстракти плаценти та фетальних тканин відрізняються за вмістом таких гормонів, як естрадіол та пролактин, кількість яких у кріоекстрактах фетальних тканин була вище в 2–4 рази, ніж у кріоекстрактах плаценти людини [7]. Це зумовлює різний вплив цих кріоекстрактів на метаболічні процеси як індукторів біосинтезу ряду ферментних білків: естрадіол індукуює біосинтез лактатдегідрогенази, а естрогени стимулюють активність нуклеаз.

Можливо, високий вміст саме таких фракцій (5–10 кДа) у КЕП порівняно з КЕФТ пояснює більш виражений стимулювальний вплив КЕП на фагоцитарну активність НГ у наших експериментах.

Підвищення фагоцитарної активності НГ за умов введення екстрактів рослинного походження та плаценти пояснюється дослідниками наявністю в їхньому складі біологічно активних речовин з антиоксидантними властивостями [15, 19].

Отже, інкубація нативних лейкоцитів з КЕП та КЕФТ незалежно від концентрації та режиму виготовлення екстракту значуще не збільшувала кількість фагоцитуючих нейтрофілів протягом 45 та 120 хв інкубації. Для всіх досліджуваних видів КЕП та КЕФТ було характерне дозозалежне

effect on the absorption capacity of NG (PhN) after 45 min of incubation.

For FTCE-1 and FTCE-2, a dose-dependent increase in PhN was observed. After 120 min of incubation, the PhN of NG in the control decreased by an average of 14%. According to the index of the completion of phagocytosis, only one extract of fetal tissues significantly increased the digestibility of NG — it was FTCE-2 at the highest concentration of 6 mg/ml. It should be noted that FTCE-3 significantly inhibited the digestive activity of NG, especially at a concentration of 6 mg/ml, as evidenced by PhCR.

The obtained data are confirmed with the published reports cited. Thus the low-molecular fractions of cord blood were shown to have an immune modulating effect *in vivo*, and the stimulating effect was explained by the direct participation of its components in the reactions of energy metabolism of cells. Storage of the low-molecular fraction of cord blood at -80°C , as well as in a lyophilized state, did not reduce its biological activity both *in vivo* and *in vitro*. The authors also proved that low molecular mass fractions of cord blood below 5 kDa, as well as the blood of dairy calves, increased the phagocytic activity of neutrophils *in vitro* [5]. Some authors have shown a dose-dependent effect of low molecular fractions of cord blood [4, 6]. According to the publications the cryoextracts of placenta and fetal tissues differ in the content of such hormones as estradiol and prolactin, the amount of which in cryoextracts of fetal tissues was 2–4 times higher than in cryoextracts of human placenta [20]. This determines the different effects of this cryoextracts on metabolic processes as inducers of the biosynthesis of a number of enzyme proteins: estradiol induces the biosynthesis of lactate dehydrogenase, and estrogens stimulate the activity of nucleases.

It is likely that the higher content of the very these fractions (5–10 kDa) in PCE compared to FTCE explains the more pronounced stimulating effect of PCE on the phagocytic activity of NG in our experiments.

The increase in the phagocytic activity of NG when introducing the extracts of plant origin and placenta is explained by researchers with the presence of biologically active substances with antioxidant properties in their composition [9, 17].

Therefore, incubation of native leukocytes with PCE and FTCE, regardless of the concentration and the way of making the extract, did not strongly enhance the number of phagocytizing neutrophils during 45 and 120 min of incubation. A dose-dependent increase in the absorption acti-

підвищення поглинальної активності НГ після 45-хвилинної інкубації у порівнянні з контролем. Показник перетравлювальної здатності НГ свідчить про її пригнічення під впливом КЕП-1, КЕП-2 та активацію після інкубації з КЕП-3, у той час як під впливом КЕФТ-2 показник завершеності фагоцитозу підвищувався, а КЕФТ-3 пригнічував перетравлювальну активність НГ.

Надалі планується досліджувати вплив кріоекстрактів фетоплацентарного походження на процеси регенерації ниркової тканини та функціональний стан нирок щурів в умовах їх гострого ураження різної етіології.

Висновки

Застосування триразового циклу заморожування-відігріву (режим 3) гомогенатів плаценти та фетальних тканин у процесі виготовлення з них кріоекстрактів забезпечувало більшу екстракцію загального білка та більший вихід низькомолекулярних сполук білково-пептидної природи у склад кріоекстрактів.

Інкубація нативних лейкоцитів з КЕП та КЕФТ незалежно від концентрації та режиму виготовлення екстракту не приводила до значущого збільшення кількості фагоцитуючих нейтрофілів протягом 45-та 120-хвилинної інкубації.

Для всіх досліджуваних видів КЕП та КЕФТ було характерне дозозалежне підвищення поглинальної активності НГ після 45-хвилинної інкубації порівняно з контролем.

ivity of NG after a 45-min incubation compared to the control was characteristic of all the studied types of PCE and FTCE. The index of the digestibility of NG indicates its inhibition under the influence of PCE-1 and PCE-2 and activation after incubation with PCE-3, while under the influence of FTCE-2 the index of the completion of phagocytosis increased, and FTCE-3 inhibited the digestive activity of NG.

In future we are planning to investigate the effect of cryoextracts of fetoplacental origin on the regeneration of renal tissue and functional state of the kidneys of rats during their acute damage of various etiologies.

Conclusions

The use of a three-time freezing-warming cycle (mode 3) of placental and fetal tissue homogenates in the process of manufacturing the cryoextracts from them ensured a greater extraction of total protein and a bigger output of low-molecular compounds of protein-peptide nature in the composition of cryoextracts.

Incubation of native leukocytes with PCE and FTCE, regardless of the concentration and method of making the extract, did not lead to a significant rise in the number of phagocytizing neutrophils during the 45- and 120-min incubation.

A dose-dependent increase in the absorption activity of NG after a 45-min incubation compared to the control was characteristic of all the studied types of PCE and FTCE.

Література

1. Гольцев АН, редактор. Актуальные проблемы криобиологии и криомедицины. Харьков; 2012. 767 с.
2. Гулевский АК, Грищенко ВИ, Моисеева НН, Горина ОЛ. Влияние низкомолекулярной фракции (до 5 кДа) из кордовой крови на фагоцитарную активность лейкоцитов *in vivo* и *in vitro*. Доповіді Національної Академії наук України. 2009; (8): 184–8.
3. Гулевский АК, Моисеева НН, Горина ОЛ, и др. Сравнительная оценка биологической активности фракции до 5 кДа из кордовой крови крупного рогатого скота после низкотемпературного хранения (при –80°C) или лиофилизации при лечении ожоговых ран у крыс. Проблемы криобиологии і криомедицини. 2020; 30(1): 47–55.
4. Пастер ІП, Баранова ЛА., Дмитруха НМ, Лагутіна ОС. Імунологічні реакції щурів на трансплантацію мікроінкапсульованої тканини щитоподібної залози людини. Доповіді Національної Академії наук України. 2020; (1): 95–102.
5. Релін МВ, Чиж ЮО, Марченко ЛМ, та ін. Вплив кріоекстракту плаценти та блокади ренін-ангіотензин-альдостеро-

References

1. Altun B, Yilmaz R, Aki T, et al. Use of mesenchymal stem cells and darbepoetin improve ischemia-induced acute kidney injury outcomes. *Am J Nephrol*. 2012; 35(6): 351–9.
2. Conliffe PR, Farmerie WG, Charles GD, et al. Expression and characterization of recombinant rat placental prolactin-like protein C. *Mol Cell Endocrinol*. 1994; 106(1–2): 121–30.
3. Goltsev AN, editor. [Actual problems of cryobiology and cryomedicine]. Kharkiv; 2012. 767 p. Russian.
4. Gulevsky AK, Grischenko VI, Moiseieva NN, Gorina OL. [Influence of low-molecular fraction (less than 5 kD) of cord blood on leukocyte phagocytic activity *in vivo* and *in vitro*]. *Dopov Nac akad nauk Ukr*. 2009; (8): 184–8.
5. Gulevsky AK, Moiseieva NN, Gorina OL, et al. The influence of low-molecular fraction from cord blood (below 5 kDa) on functional and biochemical parameters of cells *in vitro*. *Ukr Biochem J*. 2014; 86(6): 167–74.
6. Gulevskyy O, Moiseyeva N, Gorina O, et al. Comparative evaluation of biological activity of fraction below 5 kDa



- нової системи на розвиток ниркової недостатності у щурів. Проблеми кріобіології і кріомедицини. 2021; 31(3): 223–35.
6. Розанова ОЕ, Серова ЛД, Шабалин ВН. Влияние цитостатических и гормональных препаратов на фагоцитарную активность нейтрофилов больных лейкозом. Гематология и трансфузиология. 1989; 34(4): 15–20.
 7. Суббота НП, Пашинский ПП. Гормональный спектр криоэкстрактов тотального эмбрионального препарата и плаценты разных сроков гестации. Проблеми кріобіології. 1999; (1): 63–4.
 8. Хубутія МШ, Темнов АА, Вагатов АВ, и др. Низкомолекулярные пептидные препараты, полученные из культивированных стволовых клеток, при лечении острой почечной недостаточности. Трансплантология. 2011; (4): 20–5.
 9. Шатаева ЛК, Хавинсон ВХ, Ряднова ИЮ. Пептидная саморегуляция живых систем (факты и гипотезы). Санкт-Петербург: Наука; 2003. 222 с.
 10. Altun B, Yilmaz R, Aki T, et al. Use of mesenchymal stem cells and darbepoetin improve ischemia-induced acute kidney injury outcomes. *Am J Nephrol*. 2012; 35(6): 351–9.
 11. Conliffe PR, Farmerie WG, Charles GD, et al. Expression and characterization of recombinant rat placental prolactin-like protein C. *Mol Cell Endocrinol*. 1994; 106(1-2): 121–30.
 12. Gulevsky AK, Moisieieva NN, Gorina OL, et al. The influence of low-molecular fraction from cord blood (below 5 kDa) on functional and biochemical parameters of cells *in vitro*. *Ukr Biochem J*. 2014; 86(6): 167–74.
 13. Harris DA. Spectrophotometric assays in: *Spectrophotometry & spectrofluorimetry*. Washington: IRL Press; 1987. p. 49–90.
 14. Hattori N, Wakimasu M, Takahashi M, et al. Characterization of rat placental lactogen- α (PL- α) with an antipeptide antibody directed against rat PLs. *Endocr J*. 1993; 40(6), 727–35.
 15. Horbulinska A, Yakubovs'ka A, Khokhla M, et al. The yakon extract influence on morpho-functional state of immune competentive cells under the condition of diabetes mellitus. In: *Proceedings of the international conference «Advances in cell biology and biotechnology»*; 2015 October 11–13 Lviv, Ukraine. Lviv; 2015. p. 118.
 16. Kim JH, Yang H, Kim MW, et al. The delivery of the recombinant protein cocktail identified by stem cell-derived secretome analysis accelerates kidney repair after renal ischemia-reperfusion injury. *Front Bioeng Biotechnol* [Internet]. 2022 May 11 [cited 2022 Jun 11]; 10: 848679. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2022.848679/full>.
 17. Li K, Chen Yu, Zhang J, et al. Microenvironment derived from metanephros transplantation inhibits the progression of acute kidney injury in glycerol-induced rat models. *Renal Fail*. 2020; 42(1): 89–97.
 18. Ogilvie S, Bui WC, Olson JA, Shiverick KT. Identification of a novel family of growth hormone-related proteins secreted by rat placenta. *Endocrinology*. 1990; 126(6): 3271–3.
 19. Rozanova S. Antioxidant properties of extracts derived from placenta of different gestation terms. *Oxid Antioxid Med Sci*. 2014; 3(3): 181–6.
 20. Sotiropoulou PA, Perez SA, Gritzapis AD, et al. Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells. *Stem Cells*. 2006; (24): 74–85.
 21. Vizoso FJ, Eiro N, Cid S, et al. Mesenchymal stem cell secretome: toward cell-free therapeutic strategies in regenerative medicine. *Int J Mol Sci*. 2017;18:1852.
 22. Zamorskii II, Shchudrova TS, Zeleniuk VG, et al. The Influence of peptides on the morphofunctional state of kidneys in old rats. *Adv Gerontol*. 2019; (9): 75–80.
 - from cattle cord blood after low-temperature storage (at -80°C) or lyophilization to treat burn wounds in rats. *Probl Cryobiol Cryomed*. 2020; 30(1): 47–57.
 7. Harris D.A. *Spectrophotometric assays in: Spectrophotometry & spectrofluorimetry*. Washington: IRL Press; 1987. p. 49–90.
 8. Hattori N, Wakimasu M, Takahashi M, et al. Characterization of rat placental lactogen- α (PL- α) with an antipeptide antibody directed against rat PLs. *Endocr J*. 1993; 40(6), 727–35.
 9. Horbulinska A, Yakubovs'ka A, Khokhla M, et al. The yakon extract influence on morpho-functional state of immune competentive cells under the condition of diabetes mellitus. In: *Proceedings of the international conference «Advances in cell biology and biotechnology»*; 2015 October 11–13 Lviv, Ukraine. Lviv; 2015. p. 118.
 10. Khubutia MSh, Temnov AA, Vagatov AV. [Low molecular weight peptide preparations derived from cultured stem cells in the treatment of acute renal failure]. *Transplantologia*. 2011; (4): 20–5. Russian.
 11. Kim JH, Yang H, Kim MW, et al. The delivery of the recombinant protein cocktail identified by stem cell-derived secretome analysis accelerates kidney repair after renal ischemia-reperfusion injury. *Front Bioeng Biotechnol* [Internet]. 2022 May 11 [cited 2022 Jun 11]; 10: 848679. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2022.848679/full>.
 12. Li K, Chen Yu, Zhang J, et al. Microenvironment derived from metanephros transplantation inhibits the progression of acute kidney injury in glycerol-induced rat models. *Renal Fail*. 2020; 42(1): 89–97.
 13. Ogilvie S, Bui WC, Olson JA, Shiverick KT. Identification of a novel family of growth hormone-related proteins secreted by rat placenta. *Endocrinology*. 1990; 126(6): 3271–3.
 14. Pasteur IP, Baranova LA, Dmytrukha NM, Lahutina OS. [Immunological reactions of rats on transplantation of microcapsulated tissue of human thyroid gland]. *Dopov Nac akad nauk Ukr*. 2020; (1): 95–102. Ukrainian.
 15. Repin MV, Chyzh YuO, Marchenko LM, Govorukha TP, Brusentsov OF. Placental cryoextract and renin-angiotensin-aldosterone system blockade mitigate renal failure in rats. *Probl Cryobiol Cryomed*. 2021; 31(3): 223–35.
 16. Rozanova OE, Serova LD, Shabalin VN. [The influence of cytotoxic and hormonal drugs on the phagocytic activity of neutrophils in patients with leukemia]. *Gematologiya i transfuziologiya*. 1989; 34(4): 15–20. Russian.
 17. Rozanova S. Antioxidant properties of extracts derived from placenta of different gestation terms. *Oxid Antioxid Med Sci*. 2014; 39(3): 181–6.
 18. Shataeva LK, Khavinson VKh, Riadnova IYu. [Peptide self-regulation of living systems (Facts and hypotheses)]. St-Petersburg: Nauka; 2003. 222 p. Russian.
 19. Sotiropoulou PA, Perez SA, Gritzapis AD, et al. Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells. *Stem Cells*. 2006; (24): 74–85.
 20. Subbota NP, Pashinsky PP, Pitko VA. Cryoextraction hormonal spectrum of total embryonic preparation and placenta of different gestation terms. *Problems of Cryobiology*. 1999; (1): 63–4.
 21. Vizoso FJ, Eiro N, Cid S, et al. Mesenchymal stem cell secretome: toward cell-free therapeutic strategies in regenerative medicine. *Int J Mol Sci*. 2017;18:1852.
 22. Zamorskii II, Shchudrova TS, Zeleniuk VG, et al. The Influence of peptides on the morphofunctional state of kidneys in old rats. *Adv Gerontol*. 2019; (9): 75–80.