

## Влияние низкомолекулярной фракции кордовой крови на метаболизм аденилатов в клетках лейкоконцентрата после криоконсервирования

Ю.С. Ахатова<sup>1</sup>, А.А. Сысоев<sup>2</sup>, И.В. Сысоева<sup>2</sup>, А.К. Гулевский<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

<sup>2</sup>Институт биологии южных морей им. А.О. Ковалевского НАН Украины, г. Севастополь

### Effect of Cord Blood Low Molecular Fraction on Adenylate Metabolism in Leukoconcentrate Cells after Cryopreservation

Yu.S. Akhatova<sup>1</sup>, A.A. Sysoyev<sup>2</sup>, I.V. Sysoyeva<sup>2</sup>, A.K. Gulevsky<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

<sup>2</sup>Institute of Biology of Southern Seas

of the National Academy of Sciences of Ukraine, Sevastopol, Ukraine

Ранее нами было показано, что низкомолекулярная фракция кордовой крови (ФКК) до 5 кДа в составе реабилитирующей среды оказывает выраженное стимулирующее действие на функциональную активность лейкоцитов крови человека после криоконсервирования, а также способствует накоплению глюкозы клетками деконсервированного лейкоконцентрата [А.К. Гулевский и др., 2011–2013]. Мы предположили, что механизм действия ФКК направлен на энергетический обмен клеток и в связи с этим было исследовано влияние ФКК на аденилатную систему нативных и деконсервированных клеток лейкоконцентрата.

Объект исследования – лейкоконцентрат донорской крови человека (ЛКЧ), полученный седиментационным методом [Гришина В.В., 2004]. Для криоконсервирования ЛКЧ использовали режим медленного охлаждения под защитой 5% диметилацетамида (ДМАц) [В.А. Аграненко и др., 1986]. Содержание аденилатов (АТФ, АДФ и АМФ) в клетках оценивали с помощью хемилюминесцентного анализа. Фракцию из кордовой крови крупного рогатого скота выделяли методом ультрафильтрации. Ультрафильтрат лиофилизировали и хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$ . В среду инкубации ФКК вносили в количестве 0,15 мг/мл.

Установлено, что после криоконсервирования ЛКЧ энергетический статус клеток существенно ухудшался. Так, аденилатный пул клеток ЛКЧ уменьшался на 42,7% по сравнению с контролем. Содержание АТФ в нативном ЛКЧ составляло  $(23,42 \pm 2,9)$  нмоль/мг белка, после криоконсервирования данный показатель значительно снижался в 2,6 раза и составлял  $(8,9 \pm 0,93)$  нмоль/мг белка. При этом после инкубации в среде с ФКК происходило значимое увеличение концентрации АТФ в 1,34 раза по сравнению с контролем. Содержание АДФ в клетках деконсервированного ЛКЧ не изменялось, однако инкубация с ФКК способствовала повышению его количества в 2 раза по сравнению с контролем. Такой эффект, безусловно, следует считать положительным, так как увеличение количества АДФ в клетке является сигналом для синтеза АТФ. Криоконсервирование ЛКЧ не приводило к значимому изменению содержания АМФ. Однако после реабилитации ЛКЧ в среде с ФКК наблюдалось повышение концентрации АМФ в 2 раза по сравнению с контролем. По-видимому, такой эффект ФКК связан с синтезом АМФ *de novo*, что подтверждается стимулирующим действием ФКК на общий аденилатный пул деконсервированных клеток.

Таким образом, ФКК способствует повышению аденилатного пула клеток ЛКЧ до и после криоконсервирования, что выражается в увеличении содержания АТФ, АДФ и АМФ.

We have previously shown that the low molecular cord blood fraction (CBF) (below 5 kDa) as a part of rehabilitating medium has a strong stimulating effect on functional activity of human blood leukocytes after cryopreservation, as well as contributes to glucose accumulation by cells of frozen-thawed leukoconcentrate [A.K. Gulevsky *et al.*, 2011–2013]. Therefore, we hypothesized the mechanism of CBF action as targeted to an energy metabolism of cells and we investigated CBF effect on adenylate system of native and frozen-thawed cells of leukoconcentrate.

The research object was donor human blood leukoconcentrate (HBL) procured by sedimentation [Grishin V.V., 2004]. HBL was cryopreserved by slow cooling regimen with 5% dimethyl acetamide (DMAc) [V.A. Agranenko *et al.*, 1986]. Adenylate contents (ATP, ADP and AMP) in cells were evaluated by chemiluminescent analysis. The fraction was isolated from cattle cord blood using ultra-filtration method. The ultrafiltrate was lyophilized and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . CBF was added into incubation medium in the amount of 0.15 mg/ml.

It was established that after HBL cryopreservation the energy status of cells was significantly worse. Thus, the adenylate pool of HBL cells decreased by 42.7% compared with the control. ATP content in native HBL was  $(23.42 \pm 2.9)$  nmol/mg protein, after cryopreservation this index significantly decreased by 2.6 times and made up  $(8.9 \pm 0.93)$  nmol/mg protein. After incubation in medium with CBF a significant 1.34 times increase in ATP concentration occurred as compared to the control. The ADP content in cells of frozen-thawed HBL remained unchanged, but the incubation with CBF contributed to 2-fold increase in its content as compared to the control. This effect should be certainly considered as a positive, since an increase in ADP amount in a cell is a signal for ATP synthesis. HBL cryopreservation did not result in a significant change in AMP content. However, after HBL recovery in the medium with CBF there was observed a significant 2-fold augmentation of AMP concentration if compared to the control. Apparently, such effect of CBF is associated with AMP synthesis *de novo*, as confirmed by a stimulating effect of CBF on total adenylate pool of frozen-thawed cells.

Thus, CBF was established as contributing to the augmentation of adenylate pool of HBL cells prior to and after cryopreservation, manifested in an increase of ATP, ADP and AMP contents.

