

УДК 615.361.013: 616.5-003.93

Н.О. Шевченко^{1*}, О.О. Терехова³, А.І. Каверінська¹,
О.С. Прокопюк¹, В.В. Лазуренко², В.Ю. Прокопюк^{1,2}

Оцінка ефективності кріоекстракту пуповини людини в естетичній медицині (дослідження *in vitro*)

UDC 615.361.013: 616.5-003.93

N.O. Shevchenko^{1*}, O.O. Terekhova³, A.I. Kaverinska¹,
O.S. Prokopiuk¹, V.V. Lazurenko², V.Yu. Prokopiuk^{1,2}

Evaluation of Effectiveness of Umbilical Cord Cryoextract in Aesthetic Medicine (*in Vitro* Study)

Ключові слова: кріоекстракт пуповини людини, кріоконсервування, кондиційоване середовище, фібробласти, мезенхімальні стромальні клітини пуповини людини, гіалуронова кислота.

Key words: cryoextract of human umbilical cord, cryopreservation, conditioned medium, fibroblasts, mesenchymal stromal cells of human umbilical cord, hyaluronic acid.

У сучасному світі все більше уваги приділяється естетичній медицині, яка дозволяє значно підвищити якість життя, важливою складовою якого є попередження старіння шкіри [2]. Застосування гіалуронової кислоти (ГК) та стовбурових клітин визнано ефективними методами відновлення тургору шкіри, компонентів міжклітинного матриксу та проліферації клітин [2]. Кріоекстракція та низькотемпературне зберігання дозволяють виділяти і зберігати похідні, які містять ГК, біостимулятори стовбурових клітин, традиційне джерело яких — тканина пуповини [1, 4].

Мета роботи — визначити вплив синтетичної ГК, кріоекстракту пуповини (КЕП) людини, кондиційованого середовища (КС) культивування мезенхімальних стромальних клітин пуповини людини на ріст та розвиток фібробластів плодів щурів у системі *in vitro*.

Для дослідження застосовували третій пасаж культури фібробластів, які виділяли ферментативним методом зі шкіри плодів щурів та

In the modern world, more and more attention is paid to aesthetic medicine, significantly improving the quality of life, an important aspect of which is the prevention of skin ageing [2]. The use of hyaluronic acid (HA) and stem cells are recognized as effective methods of restoring skin turgor, components of the intercellular matrix, and cell proliferation [2]. Cryoextraction and low-temperature storage make it possible to isolate and store derivatives containing HA, biostimulators of stem cells, the traditional source of which is umbilical cord tissue [1, 4].

The aim of the work was to determine the effect of synthetic HA, cryoextract of the human umbilical cord (CHUC), conditioned medium (CM) for the cultivation of human umbilical cord mesenchymal stromal cells on the growth and development of rat fetal fibroblasts *in vitro*.

For the study, the third passage of fibroblast culture was used, which was isolated by the enzymatic method from the skin of rat fetuses and cultivated in the nutrient medium DMEM-high

¹Інститут проблем кріобіології та кріомедицини НАН України, м. Харків, Україна

²Харківський національний медичний університет, м. Харків, Україна

³Комунальне некомерційне підприємство Харківської обласної ради «Обласний клінічний перинатальний центр»

*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: shevchenko_nadyusha@ukr.net

Надійшла 26.09.2022

Прийнята до друку 17.05.2023

¹Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

²Kharkiv National Medical University, Kharkiv, Ukraine

³Municipal Non-Profit Enterprise of the Kharkiv Regional Council 'Regional Clinical Perinatal Center'

*To whom correspondence should be addressed:

23, Pereyaslavska str., Kharkiv, Ukraine 61016;
tel.: +380 57 373 7435, fax: +380 57 373 5952
e-mail: shevchenko_nadyusha@ukr.net

Received 26, September, 2022

Accepted 17, May, 2023

культивували у живильному середовищі DMEM-high glucose (Biowest, Франція) з додаванням 10% фетальної бичачої сироватки (Lonza, Німеччина) за температури $T = 37^{\circ}\text{C}$ та вмістом CO_2 5% [5].

Усі експерименти узгоджено з основними положеннями Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№ 3447-IV від 21.02.2006), «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986) і обговорені на засіданні комітету з біоетики Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (м. Харків).

Пуповину отримували після операції кесарів розтин з інформованої згоди жінки. Кріоекстракт пуповини отримували шляхом гомогенізації тканини з додаванням фосфатно-сольового буфера у співвідношенні 1:3, триразового заморожування та відтавання шляхом занурення у рідкий азот та переміщення у водяну баню при температурі 37°C , центрифугування протягом 10 хв за 1500 об/хв. Надосад відбирали у стерильні кріопробірки (Starlab, Україна) та зберігали за температури -196°C . Мезенхімальні стромальні клітини пуповини отримували методом експлантів [6]. Для отримання кондиційованого середовища (КС) виділені клітини культивували протягом 24 годин у живильному середовищі DMEM-high glucose (Biowest) без додавання ембріональної сироватки. Кріоекстракт пуповини та КС стандартизували за сіркомукоїдами порівняно з 1%-м розчином ГК (In Lab Medical, Франція) додаванням фосфатно-сольового буфера.

Для визначення біологічної дії досліджуваних речовин фібробласти переносили у 12-лункові планшети (Starlab) по 100 тисяч у кожен лунку та додавали середовище DMEM-high glucose (Biowest), збагачене 10% КЕП, КС та ГК, через 24 години розчин відмивали та продовжували культивування зразків для подальших досліджень. Контролем були клітини, які вирощували у тому ж середовищі з додаванням 10% ембріональної сироватки (Lonza, Німеччина).

Оцінювали форму клітин; конфлюентність моношару за процентом заповнення поверхні лунки протягом 24 годин після видалення досліджуваних речовин; міграційні властивості за допомогою тесту на подряпину (scratch test), для чого наконечником піпетки наносили дефект на поверхні адгезованих клітин, додавали КЕП, КС та 1%-у ГК, через добу визначали ширину дефекту через рівні проміжки від стінки до стінки, піноцитозну активність за тестом поглинання нейтрального червоного; метаболічну — за МТТ-

glucose (Biowest, France) with the addition of 10% fetal bovine serum (Lonza, Germany) at a temperature of $T = 37^{\circ}\text{C}$ and 5% CO_2 content [5].

All experiments are consistent with the main provisions of the Law of Ukraine 'On the Protection of Animals Against Cruelty' (No. 3447-IV dated 21.02.2006), 'European Convention on the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes' (Strasbourg, 1986) and discussed at the meeting of the Bioethics Committee of the Institute for Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine.

The umbilical cord was obtained after cesarean section, with the informed consent of women. CHUC was derived by homogenizing the tissue with the addition of phosphate-salt buffer in the ratio of 1:3, freezing and warming thrice immersion in liquid nitrogen and moving to a water bath at a temperature of 37°C , centrifugation for 10 minutes at 1,500 rpm. The resulted supernatant was collected into sterile cryotubes (Starlab, Ukraine) and stored at a temperature of -196°C . Mesenchymal stromal cells of the umbilical cord were obtained by the explant method [6]. To obtain CM, isolated cells were cultured in a nutrient medium DMEM-high glucose (Biowest, France) without the addition of fetal serum for 24 hours. CHUC and CM were standardized according to seromucoids compared to a 1% solution of HA (In Lab Medical, France) with the addition of phosphate-saline buffer.

To determine the biological effect of the studied substances, the fibroblasts were transferred to 12-well plates (Starlab, Ukraine), 100,000 in each well, and DMEM-high glucose medium (Biowest, France) enriched with 10% CHUC, CM and HA were added, after 24 hours the solution was washed out, and we continued culturing for further studies. The control was the cells grown in the same medium with the addition of 10% fetal bovine serum (Lonza, Germany).

There were evaluated the shape of the cells; confluency of the monolayer by the percentage of filling of the surface of the well within 24 hours after the removal of the investigated substances; migration properties using the scratch test, for which a defect was applied to the surface of adhered cells with the tip of a pipette, CHUC, CM and 1% HA were added, after a day the width of the defect was determined at equal intervals from wall to wall; pinocytotic activity by the neutral red absorption test method; metabolic – according to the MTT test; proliferative –



тестом; проліферативну — за часом подвоєнням популяції (через кожні 24 години після впливу) [5].

Мікроскопічне дослідження проводили із використанням світлооптичного мікроскопа «NIB-100» (Delta Optical, Польща) з камерою «MCMOS 3100» (Sigeta, Китай), біохімічні дослідження — на планшетному спектрофотометрі «CM600» (Utrao, Китай). Для обробки зображень застосовували програмне забезпечення «ToupView V 3.7». (Hangzhou Toup Tek Photonics Co. Ltd, Hangzhou, Китай).

Статистичну обробку даних проводили, використовуючи непараметричні критерії Краскела-Уоліса, програмне забезпечення «Past V.3.15» (Університет м. Осло, Норвегія).

Через добу після культивування ембріональних фібробластів щурів з КЕП, КС та у контролі моношар був щільним, клітини вузькими, проміжки майже не визначалися (рис. 1, А–С). Після додавання ГК знижувалася проліферативна активність клітин, про що свідчило зменшення щільності моношару, спостерігалися проміжки між клітинами (рис. 1, D).

in terms of population doubling over time (every 24 hours after exposure) [5].

Microscopic examination was carried out using a light optical microscope NIB-100 (Delta Optical, Poland) with an MCMOS 3100 camera (Sigeta, China). Biochemical studies – on a CM600 tablet spectrophotometer (Utrao, China). ToupView V 3.7 software was used for image processing. (Hangzhou Toup Tek Photonics Co. Ltd, Hangzhou, China).

Statistical data processing was carried out using non-parametric Kruskal-Wallis tests, software 'Past V.3.15' (University of Oslo, Norway).

A day after the cultivation of embryonic fibroblasts of rats with CHUC, CM and in the control, the monolayer was dense, the cells were narrow, and the gaps were almost undefined (Fig. 1, A–C). After the addition of HA, the proliferative activity of cells decreased, which was evidenced by a decreased density of the monolayer, and gaps between cells were observed (Fig. 1, D).

According to the MTT test, it was determined that HA and CHUC increased the metabolic ac-

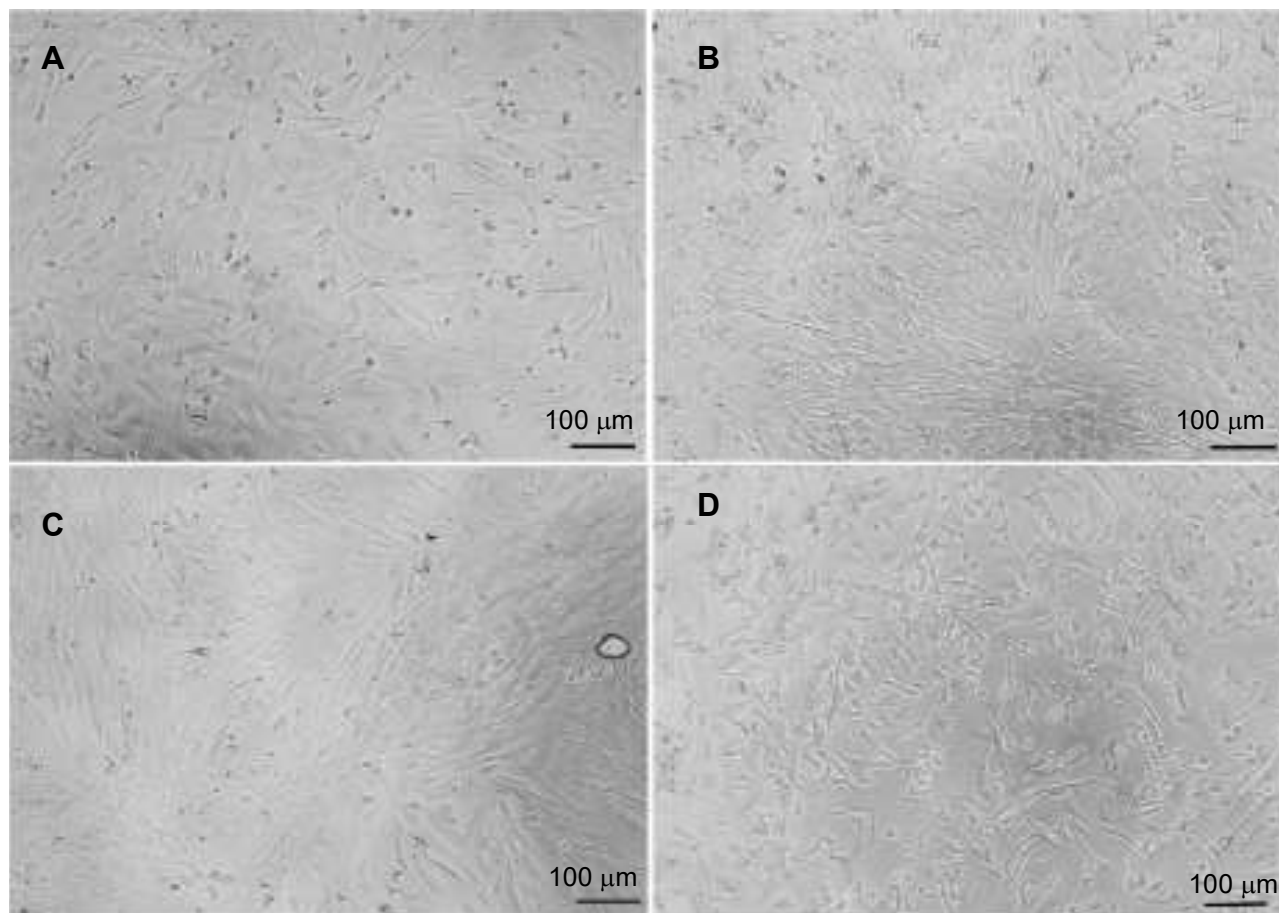


Рис. 1. Фібробласти шкіри плодів щура після культивування за стандартних умов (контроль) (A), з додаванням КЕП (B), КС (C) та ГК (D).

Fig. 1. Rat fetal skin fibroblasts after cultivation under standard conditions (control) (A), with the addition of CHUC (B), CM (C) and HA (D).



За МТТ-тестом було визначено, що ГК та КЕП підвищували метаболічну активність фібробластів (рис. 2, А). Піноцитозна активність клітин за результатами тесту поглинання нейтрально-

tivity of fibroblasts (Fig. 2, A). According to the results of the neutral red absorption test, the pinocytotic activity of cells did not change in all variants of the study (Fig. 2B). Determining

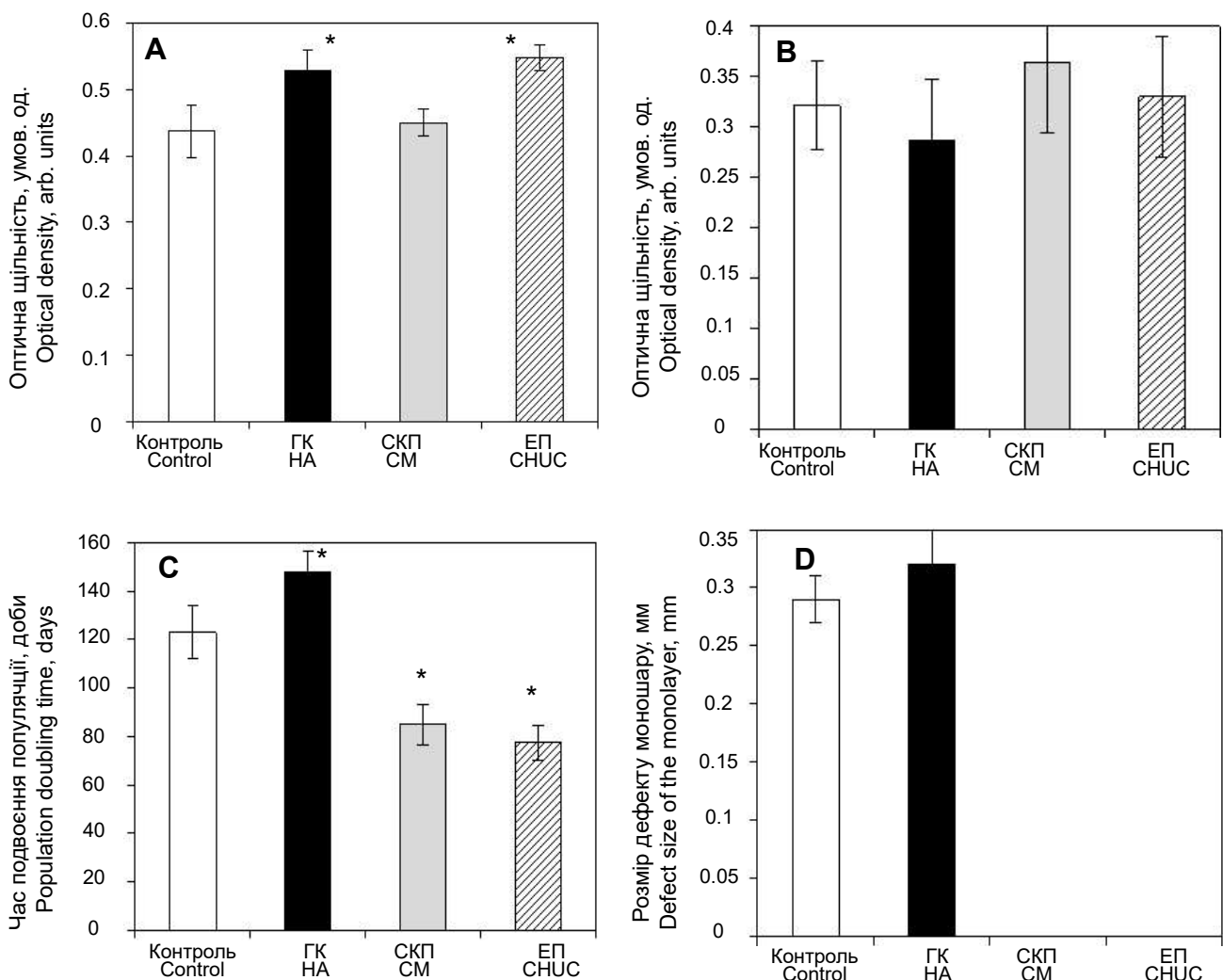


Рис. 2. Функціональні показники культури фібробластів щура, які культивували за різних умов. **А** — МТТ-тест, **В** — піноцитозна активність, за поглинанням нейтрального червоного, **С** — час подвоєння популяції, **Д** — тест на подряпину *in vitro*: ГК — гіалуронова кислота, КС — кондиційоване середовище культивування мезенхімальних стромальних клітин плаценти людини, КЕП — кріоекстракт пуповини людини; * — відмінності значущі відносно контролю, $p < 0,01$.

Fig. 2. Functional parameters of culture of rat fibroblasts cultivated under different conditions. **A** — MTT test, **B** — pinocytotic activity, by absorption of neutral red, **C** — population doubling time, **D** — *in vitro* scratch test: HA — hyaluronic acid, CM — conditioned medium for the cultivation of mesenchymal stromal cells of human placenta, CHUC — cryoextract of human umbilical cord; * — differences are significant relative to the control, $p < 0.01$.

го червоного не змінювалася в усіх варіантах дослідження (рис. 2, В). Визначення часу подвоєння популяції продемонструвало, що додавання КЕП та КС прискорювало проліферативну активність клітин, а ГК — знижувало (рис. 2, С). Дані тесту на подряпину *in vitro* показали, що додавання ГК у середовищі культивування

the population doubling time showed that the addition of CHUC and CM accelerated the proliferative activity of cells, while HA reduced it (Fig. 2C). The data of the *in vitro* scratch test showed that the presence of HA in the culture medium did not affect cell migration, while CHUC and CM significantly increased the migration rate,



не впливало на міграцію клітин, у той час, як КЕП та КС значно підвищували показник міграції, приводячи до повного зникнення дефекту моношару (рис. 2, D).

Відомо, що естетичний вигляд шкіри, відсутність зморшок залежить від її тургору, вмісту міжклітинної рідини, волокон, кількості та функціонування різних типів клітин, перед усім фібробластів, які є основними клітинами дерми [2]. Гіалуронова кислота — природний компонент сполучної тканини, але з віком її кількість зменшується, що стає однією з причин зниження тургору разом зі зміною кількості інших компонентів та клітин [7]. Ін'єкції ГК дозволяють швидко відновити тургор шкіри, але їхня дія є тимчасовою [3, 4]. Мезенхімальні стромальні клітини пуповини людини чинять тривалу дію на організм реципієнта, яка реалізується через синтез біологічно активних речовин [1].

Отримані на культурі фібробластів дані свідчать, що КЕП та КС підвищують метаболічну активність клітин, їхній проліферативний та міграційний потенціал. Вони не мають негативного впливу на культуру фібробластів, який спостерігали після застосування ГК. На нашу думку, збільшення часу подвоєння популяції та величини дефекту (за тестом подряпини) після дії ГК пов'язані з відсутністю біологічно активних речовин або ростових факторів у складі середовища культивування.

Таким чином, КЕП та КС підвищують метаболічну, проліферативну та міграційну активність фібробластів у системі *in vitro*. Поєднання активації проліферації та міграції клітин фібробластів може застосовуватися для загоєння ран. Зрештою дія КЕП може бути визначена в експериментах *in vivo*.

Роботу виконано за підтримки Національного фонду досліджень України, проєкт №2021.01/0414.

Література

1. Abbaszadeh H, Ghorbani F, Derakhshani M, et al. Regenerative potential of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells: A new horizon of stem cell therapy. *J Cell Physiol.* 2020; 235(12): 9230–40.
2. Boismal F, Serron K, Dobos G, et al. [Vieillessement cutané – Physiopathologie et thérapies innovantes]. *Med Sci (Paris).* 2020; 36(12): 1163–72. French.
3. Gutowski K.A. Hyaluronic acid fillers: Science and clinical uses. *Clin Plast Surg.* 2016; 43(3): 489–96.

leading to the complete disappearance of the monolayer defect (Fig. 2D).

It is known that the aesthetic appearance of the skin, and the absence of wrinkles depend on its turgor, the content of an intercellular fluid, fibres, the number and functioning of various types of cells, above all fibroblasts, which are the main cells of the dermis [2]. HA is a natural component of connective tissue, but with age, its amount decreases, which becomes one of the reasons for the decrease in turgor, along with a change in the number of other components and cells [7]. HA injections can quickly restore skin turgor, but their effect is temporary [3, 4]. Mesenchymal stromal cells of the human umbilical cord have a long-term effect on the recipient's body, which is realized through the synthesis of biologically active substances [1].

The findings on the culture of fibroblasts show that CHUC and CM enhance the metabolic activity of cells, their proliferative and migratory potential. They have no negative effect on the culture of fibroblasts in contrast to those observed with the use of HA. In our opinion, the increase in the doubling time of population and the size of the defect (by the scratch test) after the action of HA is associated with the absence of biologically active substances or growth factors in the composition of the culture medium.

Thus, CHUC and CM increase the metabolic, proliferative and migratory activity of fibroblasts *in vitro*. The combination of activation of proliferation and migration of fibroblast cells can be used for wound healing. The final effect of CHUC can be determined in the experiments *in vivo*.

The research was supported by the project 2021.01/0414 of the National Research Foundation of Ukraine.

References

1. Abbaszadeh H, Ghorbani F, Derakhshani M, et al. Regenerative potential of Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells: A new horizon of stem cell therapy. *J Cell Physiol.* 2020; 235(12): 9230–40.
2. Boismal F, Serron K, Dobos G, et al. Vieillessement cutané – Physiopathologie et thérapies innovantes. *Med Sci (Paris).* 2020; 36(12): 1163–72.
3. Gutowski K.A. Hyaluronic acid fillers: Science and clinical uses. *Clin Plast Surg.* 2016; 43(3): 489–96.
4. Juncan AM, Moisa DG, Santini A, et al. Advantages of hyaluronic acid and its combination with other bioactive ingredients in cosmeceuticals. *Molecules* [Internet]. 2021 July 22 [cited



4. Juncan AM, Moisă DG, Santini A, et al. Advantages of hyaluronic acid and its combination with other bioactive ingredients in cosmeceuticals. *Molecules* [Internet]. 2021 July 22 [cited 2022 Sep 19];26(15): 4429. Available from: <https://www.mdpi.com/1420-3049/26/15/4429>
5. Prokopiuk V, Yefimova S, Onishchenko A, et al. Assessing the cytotoxicity of TiO₂-x nanoparticles with a different Ti₃+(Ti₂+)/Ti₄+ ratio. *Biol Trace Elem Res* [Internet]. 2022 Aug 27 [cited 2022 Sep 19]. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12011-022-03403-3>
6. Ranjbaran H, Abediankenari S, Mohammadi M, et al. Wharton's Jelly derived-mesenchymal stem cells: isolation and characterization. *Acta Med Iran*. 2018; 56(1): 28–33.
7. Wong QYA, Chew FT. Defining skin aging and its risk factors: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep* [Internet]. 2021 Nov 11 [cited 2022 Sep 19];11(1):22075. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-021-01573-z>.
- 2022 Sep 19];26(15):4429. Available from: <https://www.mdpi.com/1420-3049/26/15/4429>
5. Prokopiuk V, Yefimova S, Onishchenko A, et al. Assessing the cytotoxicity of TiO₂-x nanoparticles with a different Ti₃+(Ti₂+)/Ti₄+ ratio. *Biol Trace Elem Res* [Internet]. 2022 Aug 27 [cited 2022 Sep 19]. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s12011-022-03403-3>
6. Ranjbaran H, Abediankenari S, Mohammadi M, et al. Wharton's Jelly derived-mesenchymal stem cells: isolation and characterization. *Acta Med Iran*. 2018; 56(1): 28–33.
7. Wong QYA, Chew FT. Defining skin aging and its risk factors: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep* [Internet]. 2021 Nov 11 [cited 2022 Sep 19];11(1):22075. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41598-021-01573-z>.

