



<https://doi.org/10.15407/cryo35.04.226>

УДК: 577.112.083:612.014.46:577.352

**І.Й. Щенявський<sup>1</sup>, Ю.С. Ахатова<sup>1,\*</sup>, Н.М. Моїсеєва<sup>1</sup>,  
О.Л. Горіна<sup>1</sup>, О.П. Ліпко<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України,

м. Харків, Україна

<sup>2</sup> Харківський національний медичний університет,

м. Харків, Україна

\* [Julija\\_Veselovskaja@meta.ua](mailto:Julija_Veselovskaja@meta.ua)

## ДОСЛІДЖЕННЯ ЗАЛЕЖНОСТІ ВМІСТУ АЛЬФА-ФЕТОПРОТЕЇНУ В ЕКСТРАКТАХ ПУПОВИННОЇ КРОВІ ЛЮДИНИ ВІД УМОВ ЕКСТРАГУВАННЯ

*Ключові слова:* кордова кров, альфа-фетопротеїн, кріодеструкція, біологічно активні речовини, кріоекстракт.

Альфа-фетопротеїн (АФП) — багатофункціональний транспортний білок з селективною біологічною активністю, який характерний для кордової крові людини та цінний з точки зору терапевтичного потенціалу [5, 6, 10]. Результати досліджень показали, що АФП здатен модулювати імунну відповідь, стимулювати регенерацію тканин і пригнічувати запальні процеси [5, 9]. Цей білок використовується для лікування таких захворювань, як автоімунні розлади (наприклад, ревматоїдний артрит, розсіяний склероз), печінкова недостатність, а також для прискорення загоєння ран і регенерації нервової тканини [3, 7]. Крім того, АФП демонструє протипухлинну активність, завдяки якій його вважають перспективним для лікування онкологічних захворювань [1, 5]. З огляду на цей факт розробка ліків на основі АФП є актуальним завданням сучасної біотехнології. Використання не лише рекомбінантного АФП, а й екстрактів із таких природних джерел, як кордова кров чи плацента, дозволяє зберегти природну структуру білка та його біологічну активність.

Відомі підходи виділення АФП з кордової або абортівної крові включають її фракціонування з видаленням формених елементів. Однак, літературні дані свідчать про те, що АФП представлений як у вільній, так і у зв'язаній формі, а саме: він асоціюється з рецепторними комплексами на клітинах лейкоцитарного походження та на гемопоетичних стовбурових клітинах, виявляється в цитоплазмі у складі білкових комплексів, а також формує позаклітинні комплекси з низкою лігандів [2, 6]. Крім того доведено, що у нативній молекулі АФП деякі біологічно активні ділянки приховані всередині глобули і стають доступними лише після конформаційної модифікації під впливом таких фізико-хімічних чинників, як температура, рН і сольовий склад середовища [6, 8]. З цієї точки зору перспективним є дослідження ефективності процесу деструкції вихідного матеріалу в різних умовах, що, можливо, дозволить вплинути на кінцевий вихід цільового продукту.

Метою роботи було дослідження ефективності низькотемпературних режимів деструкції

Цитування: Щенявський ІЙ, Ахатова ЮС, Моїсеєва НМ, Горіна ОЛ, Ліпко ОП. Дослідження залежності вмісту альфа-фетопротеїну в екстрактах пуповинної крові людини від умов екстрагування. *Проблеми кріобіології і кріомедицини*. 2025; 35(4): 239—41. <https://doi.org/10.15407/cryo35.04.226>

© Видавець ВД «Академперіодика» НАН України, 2025. Стаття опублікована на умовах відкритого доступу за ліцензією CC BY-NC-ND license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

кордової крові та оцінка залежності виходу АФП в екстракти від сольового складу і рН середовища екстрагування.

Заготівлю кордової крові людини проводили під час фізіологічно нормальних пологів на 38-40-му тижні вагітності за інформованої згоди донорів. Цільну кордову кров ( $n = 3$ ) змішували із середовищами екстрагування різного сольового складу і рН у співвідношенні 1 : 4 та інкубували 30 хв при 18—20 °С. Використовували наступні середовища екстрагування: NaCl 150 мМ (рН 7,4 та 5,0), KCl 150 мМ (рН 7,4 та 5,0) та 10 мМ Трис-НCl (рН 7,4).

Отримані зразки піддавали кріодеструкції шляхом комбінування режимів швидкого-повільного заморожування та подальшого швидкого-повільного розморожування в контейнерах об'ємом 5 мл. Швидке заморожування зразків виконували зі швидкістю 30 °С/хв до кінцевої температури -196 °С, швидке розморожування проводили за допомогою водяної бані при температурі 38 °С. Повільне заморожування проводили зі швидкістю 1 °С/хв у парах рідкого азоту, а повільне розморожування — за кімнатної температури (18—20 °С).

У якості контролю використовували загальноприйняті методи деструкції клітин: гіпотонічний лізис (до зразків додавали 10 мМ Трис-НCl, рН 7,4) та високотемпературну деструкцію (зразки 30 хв витримували при 70 °С). Після цього зразки центрифугували 10 хв при 11 000 g. Супернатанти збирали та використо-

ували для визначення вмісту АФП методом двоцентрового хемілюмінесцентного імунометричного аналізу з використанням набору реагентів «IMMULITE 2000 AFP» (Siemens Healthineers, США).

Дані представлені як середнє  $\pm$  стандартне відхилення (mean  $\pm$  SD,  $n = 3$  донори на групу). Для кожного донора значення було усереднено з трьох технічних реплікатів. Статистичне порівняння між групами проводили за допомогою непараметричного U-критерію Манна-Уїтні.

Результати дослідження показали, що використання обох низькотемпературних режимів дозволило суттєво підвищити вміст АФП в екстрактах порівняно не лише з термодеструкцією, а й з гіпотонічним лізисом. З таблиці видно, що вміст АФП в екстрактах за використання гіпотонічного лізису складає ( $47,7 \pm ,052$ ) МО/мг білка, що, як мінімум, удвічі менше, ніж після застосування кожного з 8 варіантів низькотемпературного впливу. У результаті проведення термодеструкції АФП очікувано залишається в екстрактах в залишковій кількості.

Відмінності досліджуваного показника спостерігались за використання режимів швидкого заморожування-швидкого розморожування та повільного заморожування-повільного розморожування після застосування розчину NaCl, рН 7,4. Так, кількість АФП в екстракті, отриманому після застосування режиму повільного заморожування-повільного розморожування, була на 32,2 % більшою, ніж у екстракті, отримано-

**Вміст АФП в екстрактах кордової крові людини в залежності від режиму деструкції клітин та сольового складу і рН середовища екстрагування**

Розчин екстрагування	Вміст АФП, МО/мг білка		
	Швидке заморожування — швидке розморожування	Повільне заморожування — Повільне розморожування	Термодеструкція (70 °С)
NaCl			
рН 7,4	109,12 $\pm$ 19,9 <sup>*,#</sup>	160,85 $\pm$ 22,5 <sup>*,#,**</sup>	10,98 $\pm$ 8,3 <sup>#</sup>
рН 5,0	148,26 $\pm$ 21,5 <sup>*,#</sup>	124,16 $\pm$ 51,5 <sup>*,#</sup>	30,39 $\pm$ 3,0 <sup>×</sup>
KCl			
рН 7,4	126,36 $\pm$ 40,6 <sup>*,#</sup>	123,34 $\pm$ 27,0 <sup>*,#</sup>	36,31 $\pm$ 3,3
рН 5,0	136,49 $\pm$ 25,2 <sup>*,#</sup>	177,75 $\pm$ 32,4 <sup>*,#</sup>	13,67 $\pm$ 8,5 <sup>#</sup>
Гіпотонічний лізис	47,7 $\pm$ 7,05		

Примітки: \* — відмінності значущі порівняно з відповідним варіантом термодеструкції ( $p \leq 0,01$ ); # — відмінності значущі порівняно з гіпотонічним лізисом ( $p \leq 0,01$ ); × — відмінності значущі порівняно з гіпотонічним лізисом ( $p \leq 0,05$ ); \*\* — відмінності значущі порівняно зі швидким заморожуванням/швидким розморожуванням у відповідному розчині екстрагування ( $p \leq 0,05$ ).

му після проведення швидкого заморожування-швидкого розморожування ( $p \leq 0,01$ ).

Зважаючи на відому чутливість АФП до конформаційних змін [6, 8], не виключено, що застосовані температурні режими та різні умови рН, ймовірно, сприяли модифікації третинної структури білка, впливаючи на його біологічну активність. У цьому дослідженні функціональну активність АФП не оцінювали, проте літературні дані свідчать про те, що конформаційні зміни можуть як активувати приховані біологічно активні ділянки молекули, так і призводити до її часткової інактивації залежно від фізико-хімічних умов середовища [6, 8]. Отже, оптимізація параметрів екстрагування впливає не лише на кількісний вихід білка, а й може бути пов'язана з модулюванням його функціональних властивостей, що потребує подальших досліджень.

Таким чином, отримані дані підтверджують залежність вивільнення АФП із кордової крові від застосованих режимів охолодження-розморожування зразків, сольового складу і рН середовища екстрагування. Крім того, результати дослідження узгоджуються з даними G.M. Fahy та співавт. [4] стосовно того, що найбільше руйнування клітинних компонентів відбувається при повільному охолодженні біологічної сировини в діапазоні температур кристалізації води (особливо в точці евтектики даного розчину) і рекристалізації. Ці висновки підкреслюють важливість контролю температурних та хімічних параметрів для оптимізації процесів деструкції і екстрагування, що є ключовим фактором для подальшого вдосконалення методів збереження біологічних матеріалів та отримання високоякісних продуктів для медичного і біотехнологічного застосування.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Bei R, Mizejewski GJ. Alpha-fetoprotein is more than a hepatocellular cancer biomarker: from spontaneous immune response in cancer patients to the development of an AFP-based cancer vaccine. *Curr Mol Med*. 2011; 11(7): 564–81.
2. Bogdanov AY, Bogdanova TM, Ilin AI. Endocytic pathway of alpha-fetoprotein in mice bone marrow hematopoietic stem cells: molecular characterization and role in biological activity modification. *Cytol Genet*. 2014; 48: 21–32.
3. Dudich E. MM-093, a recombinant human alpha-fetoprotein for the potential treatment of rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases. *Curr Opin Mol Ther*. 2007; 9(6): 603–10.
4. Fahy GM, Wowk B. Principles of ice-free cryopreservation by vitrification. *Methods Mol Biol*. 2021; 2180: 27–97.
5. Głowska-Ciemny J, Szymański M, Kuszarska A, et al. The role of alpha-fetoprotein (AFP) in contemporary oncology: the path from a diagnostic biomarker to an anticancer drug. *Int J MolSci [Internet]*. 2023 Jan 28 [cited 2025 Feb 04]; 24(3):2539. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/24/3/2539>
6. Gulevskyy AK, Akhatova YuS. Current concep to the structural and functional properties of alfa-fetoprotein and the possibilities of its clinical application. *Biotechnologia Acta*. 2021;14(1): 25–37.
7. Lin B, Liu K, Wang W, et al. Expression and bioactivity of human  $\alpha$ -fetoprotein in a Bac-to-Bac system. *Biosci Rep [Internet]*. 2017 Jan 17 [cited 2025 Feb 06]; 37(1): BSR20160161. Available from: <https://portlandpress.com/bioscirep/article/37/1/BSR20160161/56527/Expression-and-bioactivity-of-human-fetoprotein-in>
8. Mizejewski GJ. Alpha-fetoprotein structure and function: relevance to isoforms, epitopes, and conformational variants. *Exp Biol Med*. 2001; 226: 377–408.
9. Mizejewski GJ. Alpha-fetoprotein: Immunomodulation in autoimmune diseases during pregnancy and puerperium stages. *GSC Biol Pharm Sci*. 2022; 20(2): 102–13.
10. Munson PV, Adamik J, Butterfield LH. Immunomodulatory impact of  $\alpha$ -fetoprotein. *Trends Immunol*. 2022; 43(6): 438–48.

Отримано 20.03.2025

Прийнято до друку 20.11.2025

I.I. Shcheniavskiy<sup>1</sup>, Yu.S. Akhatova<sup>1,\*</sup>, N.M. Moisieieva<sup>1</sup>, O.L. Gorina<sup>1</sup>, O.P. Lipko<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the NAS of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

<sup>2</sup> Kharkiv National Medical University, Kharkiv, Ukraine

\* e-mail: Julija\_Veselovskaja@meta.ua

STUDY ON THE DEPENDENCE OF ALPHA-FETOPROTEIN CONTENT  
IN HUMAN CORD BLOOD EXTRACTS ON EXTRACTION CONDITIONS

**Key words:** cord blood, alpha-fetoprotein, cryodestruction, biologically active substances, cryoextract.