

Влияние различных режимов низкотемпературного хранения на содержание гормонов в криоэкстракте плаценты

В.И. Грищенко, О.С. Прокопюк, Н.А. Волкова, О.А. Перчик

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Effect of Various Low Temperature Storage Regimens on Placenta Cryoextract Hormone Content

V.I. GRISCHENKO, O.S. PROKOPYUK, N.A. VOLKOVA, O.A. PERCHIK

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

Результаты свидетельствуют, что различные режимы низкотемпературного хранения оказывают влияние на уровень содержания отдельных гормонов в криоэкстракте плаценты (КЭПл). Наиболее оптимальным режимом хранения, в соответствии с технологическим процессом приготовления КЭПл, является хранение при температуре -20°C одни сутки с последующим длительным хранением при температуре жидкого азота.

Ключевые слова: криоэкстракт плаценты, гормоны плаценты, низкотемпературное хранение.

Результати свідчать, що різні режими низькотемпературного зберігання впливають на рівень вмісту окремих гормонів у криоекстракті плаценти (КЕПл). Найбільш оптимальним режимом зберігання, відповідно до технологічного процесу приготування КЕПл, є зберігання при температурі -20°C одну добу з подальшим тривалим зберіганням при температурі рідкого азоту.

Ключові слова: криоекстракт плаценти, гормони плаценти, низькотемпературне зберігання.

Results proved the different low temperature storage regimens to affect the level of certain hormones content in cryopreserved placenta extract (CPE). According to the technological protocol of CPE preparing a one-day storage at -20°C with further-long term storage under liquid nitrogen temperature was found to be the optimum regimen.

Key-words: placenta cryoextract, placenta hormones, low temperature storage.

Интерес клинической медицины к биопрепаратам эмбриофетоплацентарного происхождения вызван их высокой и многосторонней биологической активностью. Одним из широко используемых источников получения подобных препаратов является плацента – провизорный орган, служащий природным барьером, который защищает плод от вредного влияния окружающей среды [1]. Фармакопейный препарат “экстракт плаценты для инъекций” представляет собой водный экстракт, полученный из консервированной на холоде (4°C) плаценты человека, стерилизованный при 120°C в течение 1 часа и применяемый в клинической практике для стимуляции обменных и регенеративных процессов [3].

Развитие низкотемпературных технологий получения иммунобиологических препаратов, в том числе и КЭПл, направленное на максимальное сохранение исходного состава и активности биоматериала, позволило обогатить практическое здравоохранение новыми эффективными лечебными средствами. Изготовление КЭПл предполагает применение гипотермических и отрицательных температур для более полного разрушения клеточных мембран и выхода практически

Interest towards embryoplacental biopreparations in clinical medicine has been reasoned by their high multiple biological activity. Placenta as a provisory organ, being a natural barrier which protects fetus against a harmful environmental effect [1] is known to be one of the mostly used sources for obtaining such preparations. “Placenta extract for injections” as pharmacopeial preparation is an aqueous extract obtained from cryopreserved in cold (4°C) human placenta sterilized at 120°C for 1 hour and used in clinics to stimulate metabolic and regenerative processes [3].

Development of low-temperature technologies for obtaining immune biological preparations, among those placenta CPE, directed to the maximum preservation of initial content and biomaterial activity enabled us to enrich the practical health care industry with the novel effective medicines. CPE production foresees the application of hypothermic and negative temperatures for more complete cell membrane damage and release of practically unchanged biologically active substances into the extract solution. Quite a significant question thereat is known to be the problem of further storage of procured CPE with the aim of the maximum keeping its content and properties.

Адрес для корреспонденции: Перчик О.А., Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 777-42-84, факс: +38 (057) 772-00-84, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Address for correspondence: Perchik O.A. Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the Natl. Acad. Sci. of Ukraine, 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 777 4284, fax: +380 57 772 0084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

не измененных биологически активных веществ в экстрагирующий раствор. При этом существенным является вопрос последующего хранения полученного КЭПл для максимального сохранения его состава и свойств. Очевидная сложность биохимического, прежде всего белкового состава КЭПл, наличие в нем гормонов, витаминов, ростовых факторов и других биологически активных веществ затрудняют его идентификацию и количественную оценку, в том числе и при хранении, однако эти исследования являются необходимыми.

На первом этапе исследования, конечной целью которого является разработка новых методов коррекции эстрогендефицитных состояний у женщин, целесообразно было оценить состав КЭПл (главных гормонов гипофизарно-гонадной системы, а также гипофизарно-надпочечниковой системы – кортизола) и проследить влияние на него различных режимов хранения.

Материалы и методы

Материалом исследования являлся препарат КЭПл, изготовленный согласно [5] из 9 плацент, взятых во время операции кесарево сечение у здоровых женщин. Содержание в КЭПл фолликулостимулирующего гормона (ФСГ) и лютеинизирующего гормона (ЛГ), пролактина, эстрадиола, тестостерона, прогестерона, кортизола определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа с использованием готовой тест-системы “Алькор-био” (СПб, Россия) [4]. Все абсолютные величины содержания гормонов в КЭПл были пронормированы на концентрацию белка в пробе. Концентрацию гормонов в КЭПл оценивали при следующих режимах хранения: I – сутки при 4°C; II – сутки при –20°C; III – сутки при –20°C, затем 1 год при –196°C; IV – сутки при –196°C, затем 1 год при –20°C. Выбор режимов определялся техническими особенностями получения КЭПл. Контролем являлся свежеполученный экстракт, приготовленный в соответствии с методикой получения КЭПл.

Статистическая обработка материала проведена общепринятыми методами по t критерию Стьюдента-Фишера.

Результаты и обсуждение

Как оказалось, различные условия хранения оказывают влияние на уровень содержания отдельных гормонов в КЭПл при том, что содержание общего белка в пробах остается статистически неизменным (таблица). Так, количество ЛГ в криоэкстракте плаценты после хранения значительно уменьшается по сравнению с исходным при

Обvious complicity of biochemical, and first of all, a protein CPE content, the presence of hormones, vitamins, growth factors and other biologically active substances complicate identification of it, as well as quantitative evaluation, also during storage, these investigations are nevertheless of vital importance.

At the first stage of research, final aim of which is elaborate of the novel methods for estrogen-deficit states correction in women, it was expedient to evaluate CPE content (cortisol known as the major hormones of hypophysis-gonade system, as well as of hypophysis-adrenal one) and to reveal the effect on it of various storage regimens.

Materials and methods

CPE preparation procured according to the paper [5] from 9 placentas derived during Cesarean section of healthy women was the material under study. Contents of follicle-stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH), prolactin, estradiol, testosterone, progesterone, cortisol in CPE were determined by the method of solid-phase immunoenzyme analysis using “Alcor-bio” test-system (Russia) [4]. All the absolute hormone content values in PCE were normalized for protein concentration in a sample. Hormone concentration was evaluated at following storage regimens: I – 1 day at 4°C; II – 1 day at –20°C; III – 1 day at –20°C, then 1 year at –196°C; IV – 1 day at –196°C, and 1 year at –20°C. Regimens were selected according to the technical characteristics of CPE obtaining. Freshly isolated extract prepared according to the method for CPE procurement was assumed as the control.

Statistical processing of the material was accomplished using traditionally assumed Student-Fisher methods on t-criterion.

Results and discussion

Various storage conditions were found to affect the level of certain hormones content in CPE while total protein amount remained statistically unchanged in the samples (Table). Thus amount of LH in placenta cryoextract significantly falls after the storage comparing to the initial content at all the storage variants tried.

The less successful was found to be the regimen III, application of which resulted in more than two-fold fall in LH level ($p < 0.001$).

Similarly to the described above situation the FSH content has also changed in placenta cryo-extract: it falls at all the mentioned storage regimens and it reached the minimum at the regimen III.

Prolactin during storage acts in a different way: its amount sharply falls even at 4°C already in 1 day, and the use of the temperatures lower than 0°C only slightly

Влияние условий хранения на гормональный состав КЭПл
Effect of storage conditions on the CPE hormone content

Режим низкотемпературного хранения Regimen of low temperature storage	Общий белок, мг/мл Total protein, mg/ml	ЛГ, МЕ/л-мг LH, IU/l-mg	ФСГ, МЕ/л-мг FSH, IU/l-mg	Пролактин, мМЕ/л-мг Prolactin, mIU/l-mg	Эстрадиол, нмоль/л-мг Estradiol, nmol/l-mg	Тестостерон, нмоль/л-мг Testosterone, nmol/l-mg	Прогестерон, нмоль/л-мг Progesterone, nmol/l-mg	Кортизол, нмоль/л-мг Cortisol, nmol/l-mg
Контроль Control	18,8±3,6	48,4±7,98	22,1±4,17	1594±357	1,17±0,17	4,81±0,92	48,1±7,6	2485±630
I – 1 сутки при 4°C I – 1 day at 4°C	16,0±2,1	25,7±5,01	14,9±2,05 ¹	815±190	0,950±0,29	2,94±0,074 ¹	31,9±7,9	1150±274
II – 1 сутки при –20°C II – 1 day at –20°C	14,8±1,8	30,7±5,06	13,2±3,06	1553±150 ²	1,01±0,14	3,65±0,60	34,8±7,8 ¹	1533±210
III – 1 сутки при –20°C, затем 1 год при –196°C III – 1 day at –20°C, followed by 1 year at –196°C	15,0±4,2	21,4±3,38 ¹	11,0±2,9	1337±420	1,05±0,23	3,68±1,06	27,0±4,8	1392±515
IV – 1 сутки при –196°C, затем 1 год при –20°C IV – 1 day at –196°C, followed by 1 year at –20°C	17,1±2,2	25,3±4,18	12,3±1,93 ²	1088±310	0,69±0,11 ²	2,80±0,51	21,7±5,7	1293±189 [*]

Примечание: Вероятность разницы (p) контроля с режимами низкотемпературного хранения: ¹ – p<0,001; ² – p<0,05.

Note: Probability of the difference (p) in the control with storage under low temperature regimens: ¹ – p<0.001; ² – p<0.05.

всех опробованных вариантах хранения. Наименее удачным представляется режим III, применение которого привело к падению уровня ЛГ более чем в 2 раза (p<0,001).

Сходно с описанным выше меняется содержание ФСГ в криоэкстракте плаценты: оно уменьшается при всех приведенных режимах хранения и минимально при режиме III.

Пролактин при хранении ведет себя иначе: количество его резко падает при 4°C уже через одни сутки, а использование температур ниже 0°C только незначительно уменьшает его содержание в КЭПл по сравнению с исходным (таблица).

Эстрадиол, как показывают полученные результаты, лучше сохраняется при использовании температуры –20°C, режимы II и III обеспечивают содержание в КЭПл более 80% исходного количества этого гормона. Применение же температур хранения –196°C с переносом в –20°C (режим IV) приводит к заметному уменьшению количества изучаемого гормона.

Содержание тестостерона изменяется в КЭПл при хранении подобным образом: наименее удачным является использование режимов I и IV, однако даже при самом “жестком” хранении количество тестостерона не падает ниже 60% от исходного. Аналогично реагируют на хранение прогестерон и кортизол, для них также наименее удачны режимы I и IV.

Проведенные результаты показывают, что даже кратковременное (1 сутки) хранение КЭПл при 4°C (режим I) нежелательно, поскольку ведет к существенной потере гормональной составляющей изучаемого биологически активного препарата. То же можно отнести к применению режима IV: дли-

reduces its amount in CPE comparing to the initial one (Table).

Estradiol, as the results showed, is better kept when using the temperatures of –20°C, regimens II and III provide the content of more than 80% of the initial amount of this hormone in CPE. Use of the storage temperature of –196°C with the transfer into –20°C (regimen IV) results in a noticeable decrease of the amount of hormone studied.

Testosterone content is changing in CPE if stored in the same way: the less successful was found to be the use of regimens I and IV, although even at the “rigid” storage testosterone content did not fall lower than 60% of the initial one. Progesterone and cortisol respond similarly to the storage, the regimens I and IV are less successful for them.

Obtained results demonstrate that even a short term CPE storage (1 day) at 4°C (regimen I) is unfavorable, for it causes a considerable loss of hormone component in the biological preparation studied. The same was noted for the regimen IV: a long-term storage at –20°C is not able to provide the qualitative integrity of such biologically active substances in extract as hormones are. It is essential thereat that the results presented are not always statistically significant, and noticeable differences in indices depending on storage regimens are only established in several cases (Table). According to the CPE preparing technique the temperature of –20°C was found to be the optimum storage regimen with further long-term storage at liquid nitrogen temperatures.

Question on biological composition of cryopreserved preparations is of great interest, for biological activity of those is not only a certain hormone spectrum [7]. Even more, comparing their physiological concen-

тельное хранение при -20°C не может обеспечить количественную сохранность таких биологически активных веществ в экстракте, как гормоны. При этом важно, что приведенные результаты не всегда статистически достоверны, а значимые различия показателей в зависимости от режимов хранения установлены лишь в отдельных случаях (таблица).

В соответствии с технологическим процессом приготовления КЭПл наиболее оптимальный режим хранения – температура -20°C с последующим длительным хранением при температуре жидкого азота.

Вопрос о биологическом составе криоконсервированных препаратов представляет значительный интерес, поскольку биологическая активность их далеко не исчерпывается содержанием определенного спектра гормонов [7]. Более того, сопоставление физиологических концентраций их в сыворотке крови, в КЭПл с концентрацией соответствующих гормонов в лекарственных формах убеждает в том, что биологическое действие КЭПл [2, 6, 8] не может быть объяснено только содержанием каждого конкретного гормона. Так, содержание эстриола в одной фармакопейной свече “Овестин” фирмы Organon составляет 0,5 мг, содержание эстрадиола в КЭПл – $5,99 \times 10^{-6}$ г/мл. Однако клинический опыт показывает высокую активность КЭПл при эстрогендефицитных состояниях.

Выводы

Считают, что глубокое охлаждение, вплоть до полного замерзания, часто не приводит к денатурации и значительно меньше нарушает конфигурацию системы биомолекул. Это происходит при идеальном соответствии структур макромолекул и кристаллической решетки льда, в результате чего эти лабильные цепи остаются как бы зафиксированными без существенных повреждений. Нативные макромолекулы (сложные белки, нуклеотиды), включенные в кристаллическую решетку льда, не повреждаются в результате их коллоидного состояния, которое допускает значительные пространственные транслокации и деформации в ледяной структуре [9]. В то же время физико-химические процессы при замораживании солевых экстрактов неизбежно приводят через различные механизмы к модификации молекулярного состава биологических жидкостей. Полученные нами результаты очень близки к данным [1], в соответствии с которыми хранение ткани плаценты при температуре 4°C снижает содержание в ней отдельных гормонов, что авторы связывают с активацией ферментов ограниченного протеолиза. Очевидно, что КЭПл, как любой иммунобиологический препарат, нуждается в стандартизации,

trations in blood serum, in CPE with the correspondent hormones concentration in medicinal forms convinces us that CPE biological effect [2, 6, 8] could not be only proved proceeding from the content of each certain hormone. Indeed, the content of estriol in pharmacopieal suppository “Ovestin” (Organon) makes 0.5 mg, estradiol content in CPE is 5.99×10^{-6} g/ml. Clinical experience has showed however a high CPE activity at estrogen-deficient states.

Conclusions

One considers that deep cooling down to a complete freezing not always results in denaturation and in a lesser extent impairs the configuration of biomolecules' system. This occurs at ideal matching of a macromolecule structure and crystal ice lattice, as a result these labile chains remain fixed with no considerable impairments. Native macromolecules (complex proteins, nucleotides), being in a crystal ice lattice are not impaired because of their colloid state, which accepts considerable spatial translocations and deformations in ice structures [9]. At the same time physical and chemical processes during saline extracts freezing, via various mechanisms inevitably cause the molecular composition modification in biological fluids. Obtained by us results are consistent with the data [1], according to those the storage of placenta tissue under the temperature of 4°C reduces the content in it of certain hormones, which is thought to be related to enzymes activation of a limited proteolysis. CPE as either immunological preparation needs the standardization, which should refer to its biochemical content, general biological and specific properties.

References

1. *Grischenko V.I., Shepit'ko V.I., Strona V.I. et al.* Change of dehydrogenase activity, hormone content and lipoperoxidation state in allogeneic placenta depending on low temperature effect // *Problems of cryobiology.*– 2004.– N1.– P. 62-69.
2. *Grischenko V.I., Yurchenko T.N., Prokopyuk O.S., Strona V.I.* Low temperature storage of embryonic and fetoplacental tissues // *Collection of scientific papers “Actual questions of reproductology and cryomedicine”.*– Kharkov, 1998.– P. 176.
3. *Mashkovsky M.D.* Medicines. Manual for physicians. Vol.2.– Moscow: Novaya volna, 2002.– 173 p.
4. *Medical Laboratory diagnostics* / Ed. by A.I. Karpischenko. Vol. 2.– St-Petersburgh, 1997.– 304 p.
5. Obtaining of aqueous-saline placental tissue extract for clinical and R&D use: Methodical recommendations / V.I. Grischenko, A.M. Belous et al.– Kiev-Kharkov, 1999.– 12 p.
6. *Pitko V.A.* Medicobiological and social aspects of procurement and use of cryopreserved fetal preparations // *Collection of scientific papers “Actual questions of reproductology and cryomedicine”.*– Kharkov, 1998.– P. 181-185.
7. *Pitko V.A.* Studying the effect of chorion cryoextract and placenta extract on the morphological indices at experimental inflammatory process // *Problems of Cryobiology.*– 1999.– N3.– P.64-68.

которая должна касаться его биохимического состава, общебиологических и специфических свойств.

Литература

1. Грищенко В.І., Шепітько В.І., Строна В.І. та ін. Зміна активності дегідрогеназ, вмісту гормонів і стану ліпопероксидації в аlogenній плаценті в залежності від дії низьких температур // Пробл. криобиології. – 2004. – №1. – С.62-69.
2. Грищенко В.И., Юрченко Т.Н., Прокопюк О.С., Строна В.И. Низкотемпературное хранение эмбриональных и фетоплацентарных тканей // Сб. научных трудов. Актуальные вопросы репродуктологии и криомедицины.– Харьков, 1998. – С.176.
3. Машковский М.Д. Лекарственные средства: Пособие для врачей. Т. 2.– М.: Новая волна, 2002.– 173 с.
4. Медицинская лабораторная диагностика /Под ред. А.И.Карпищенко. Т. 2.– СПб,1997.– 304 с.
5. Отримання водно-сольового екстракту плацентарної тканини для клінічного та науково-дослідного застосування: Метод. рекомендації / В.І. Грищенко, А.М. Білоус та ін.– Київ-Харків, 1999.– 12 с.
6. Питько В.А. Медико-биологические и социальные аспекты получения и использования криоконсервированных фетальных препаратов // Сб. научных трудов. Актуальные вопросы репродуктологии и криомедицины.– Харьков, 1998.– С. 181-185.
7. Питько В.А. Исследование влияния криоэкстракта хориона и экстракта плаценты на морфологические показатели при экспериментальном воспалительном процессе // Пробл. криобиологии.– 1999.– №3.– С. 64-68.
8. Рябчиков О.П., Кузнецова Л.В., Назимова С.В. и др. Гормональный и клеточный состав препаратов фетальных тканей человека: Трансплантация фетальных тканей и клеток.– М.,1998.– С.156-157.
9. Яковлева Е. А., Геродес А.Г. Влияние низкотемпературного хранения на стабильное содержание стероидных гормонов в фолликулярной жидкости яичника человека // Пробл. криобиологии.– 2004.– №1.– С. 83-88.
8. Ryabchikov O.P., Kuznetsova L.V., Nazimova S.V. et al. Hormone and cell composition of human fetal tissue preparations. In: Fetal cell and tissue transplantation.– Moscow, 1998.– P. 156-157.
9. Yakovleva E.A., Gerodes A.G. Effect of low-temperature storage on a stable content of steroid hormones in human ovaries follicular fluid // Problems of Cryobiology.– 2004.– N1.– P. 83-88.

Accepted in 19.11.2004

Поступила 19.11.2004