

Изменение свойств водно-солевых экстрактов плаценты человека в процессе низкотемпературного хранения

Change of Properties of Human Placenta Aqueous-Saline Extracts During Low Temperature Storage

Высокое содержание биологически активных веществ в водно-солевых экстрактах плаценты человека (ЭПЧ) позволяет использовать их в разных областях медицины. Состав экстрактов в значительной степени зависит от исходного материала. По составу ЭПЧ были разделены на три типа, которые соответствовали распределению белков по молекулярным массам и коррелировали с биологической активностью экстрактов по отношению к эритроцитам. На основании данного факта было высказано предположение о ведущей роли белков во взаимодействии экстрактов с эритроцитами [1]. Для хранения экстрактов используют низкие температуры или лиофильное высушивание. Однако практически отсутствуют исследования, посвященные сравнительному изучению свойств ЭПЧ после их хранения. Для растворов белков замораживание является более щадящим способом хранения [2]. Поэтому целью настоящего исследования было изучить влияние хранения при различных температурах на некоторые свойства экстрактов.

Материалы и методы

Водно-солевые экстракты выделяли из ткани плаценты человека, которая тестировалась на наличие вирусных инфекций. Для получения экстрактов отмытые фрагменты гомогенизировали, добавляя 0,15 М NaCl в соотношении 1:1. Через 12 ч эквilibрации их центрифугировали и собирали надосадок для исследований. Экстракты хранили в течение 6 месяцев при -20 и -80°C в морозильных камерах с соответствующей температурой, при -196°C – в сосуде с жидким азотом. Экстракты размораживали в водяной бане при 22°C . Гель-хроматографию экстрактов проводили на колонке 21×2 см с сефадексом G-200. Концентрацию белка определяли спектрофотометрическим методом, концентрацию продуктов пере-

High content of biological active substances in aqueous-saline extracts of human placenta (HPEs) enables to use it in different branches of medicine. Extracts composition significantly depends on initial material. HPEs were divided on compositions into three types, which corresponded to distribution of proteins according to molecular masses and correlated with the extracts' biological activity to erythrocytes. On the basis of this fact there was supposed about dominating role of proteins in extracts interaction with erythrocytes [1]. For storage of extracts low temperatures or freeze-drying are used. However, practically there are no investigations dedicated to comparative study of HPEs properties after storage. For protein solutions freezing is more mild storage method [2]. The research aim was to study the effect of storage at different temperatures on some properties of extracts.

Materials and methods

Aqueous-saline extracts were isolated from human placenta tissue, which was tested for virus infection presence. For extracts deriving the washed-out fragments were homogenized, adding NaCl 0.15 M in 1:1 ratio. After 12 hrs of equilibration they were centrifuged and supernatant was taken for the researches. The extracts were stored for 6 months at -20 and -80°C in freezing chambers with corresponding temperature and at -196°C in Dewar with liquid nitrogen. The extracts were frozen-thawed on water bath at 22°C . Gel-chromatography of extracts was carried out on 21×2 cm column with G-200 sephadex. Protein concentration was determined by spectrophotometry, concentration of peroxidation products was done with thiobarbituric acid reaction. Erythrocytes were derived from donor's blood. Erythrocyte exposure with placenta extracts and isolated fractions, obtained by gel-chromatography, made 2 hrs. With this aim erythromass was diluted in 1:1 ratio with

Институт проблем криобиологии и криомедицины
НАН Украины, г. Харьков

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

* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:
ул. Перейславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 373-31-41, факс: +38 (057) 373-30-84, электронная почта: cryo@online.kharkov.ua

* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 373 3141, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

кисного окисления – с помощью реакции с тиобарбитуровой кислотой. Эритроциты получали из донорской крови. Экспозиция эритроцитов с экстрактами плаценты или отдельными фракциями, полученными методом гель-хроматографии, составляла 2 ч. Для этого эритроциты разводили в соотношении 1:1 физиологическим раствором и соединяли с равным количеством экстракта. Для определения уровня гемолиза концентрацию гемоглобина измеряли спектрофотометрическим методом. Осмотическую хрупкость эритроцитов оценивали по уровню гемолиза в гипотонических растворах NaCl (0,3–0,6 М). Для характеристики кислотного гемолиза записывали кинетику изменения оптической плотности при 700 нм в цитратном буфере (рН 3,8) и определяли время 50%-го гемолиза. Спектры поглощения записывали на спектрофотометре “Pye Unicam SP 8000” (Великобритания).

Результаты и обсуждение

В работе изучали 30 ЭПЧ различных типов [1]. Экстракты типа 1 составляли 50% от общего числа исследованных образцов, типа 2 – 40% и типа 3 – 10%. Экстракты типа 1 не обладали гемолитической активностью, экспозиция с экстрактами типа 2 вызывала небольшой гемолиз (менее 5%), а экстракты типа 3 проявляли высокую гемолитическую активность (до 50%). Для определения молекулярной массы веществ, обладающих гемолитической активностью, было исследовано влияние на свойства эритроцитов экспозиции с отдельными фракциями, полученными методами гель-хроматографии. В большинстве случаев, особенно для экстрактов с высокой гемолитической активностью, гемолиз отмечался после экспозиции с фракциями, имеющими молекулярную массу 200–400 кДа. Кроме того, для некоторых экстрактов типа 2 относительно небольшая гемолитическая активность проявлялась после экспозиции с фракциями, молекулярная масса которых менее 5 кДа.

Хранение экстрактов при низких температурах приводит к изменению распределения белков по молекулярным массам во всех типах ЭПЧ. После хранения при –20°C эти изменения значительнее, чем после хранения при –80 и –196°C. На рис. 1 приведены гель-хроматограммы для ЭПЧ типа 2. Подобные изменения в распределении белков по молекулярным массам наблюдаются и в других типах ЭПЧ.

После хранения ЭПЧ при всех изученных температурах отмечается увеличение относительного содержания белков с более высокими молекулярными массами, свидетельствующее об агрегации белков. Наиболее выражены эти изменения после хранения при –20°C.

physiologic solution and associated with the equal amount of extract. For the determining of hemolysis level the hemoglobin concentration was measured with spectrophotometry. Osmotic fragility of erythrocytes was estimated for hemolysis level in hypotonic solutions NaCl (0.3–0.6 M). For characteristics of acid hemolysis the kinetics of change in optical density was noted at 700 nm in citrate bufer (pH 3.8) and time of 50% hemolysis was determined. Absorption spectra was noted with “Pye Unicam SP 8000” spectrophotometer, Great Britain.

Results and discussion

In researches we investigated 30 HPEs of different types [1]. The extracts of 1st type made 50% of total number of investigated samples, 40% for 2nd type and 10% for 3rd type. Extracts of 1st type had no hemolytic activity, exposure with 2nd type extracts triggered low hemolysis (under 50%) and extracts of 3rd type exhibited a high hemolytic activity (up to 50%). For determining the molecular mass of substances, having hemolytic activity, the effect on erythrocyte properties of exposure with isolated fractions obtained by gel-chromatography has been investigated. Generally, especially for the extracts with high hemolytic activity, hemolysis was noted after exposure with the fractions of 200–400 kDa molecular mass. Therewith, for some extracts of 2nd type comparatively low hemolytic activity was exhibited after exposure with the fractions of molecular mass under 5 kDa.

The storage of extracts at low temperatures results in change of protein distribution for molecular masses in all types of HPEs. After storage at –20°C these

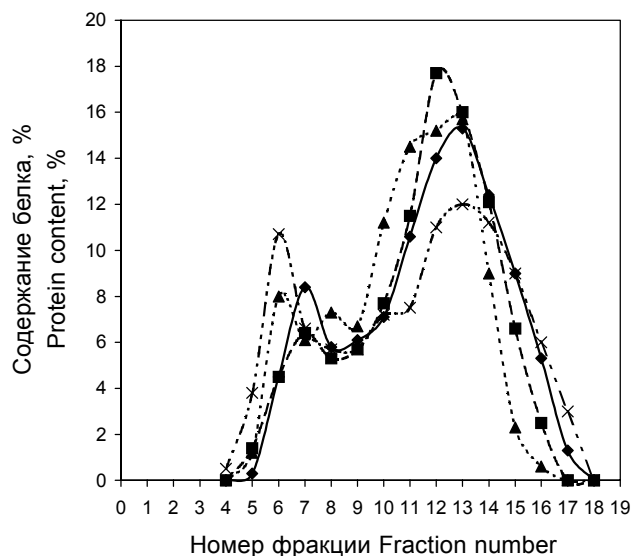


Рис. 1. Гель-хроматограммы ЭПЧ типа 2 после хранения при различных температурах: ■ – контроль; ◆ – хранение при –80°C; ▲ – storage at –196°C; × – storage at –20°C.

Fig. 1. HEP gel-chromatograms of 2nd type after storage at different temperatures: ■ – control; ◆ – storage at –80°C; ▲ – storage at –196°C; × – storage at –20°C.

Гемолитическая активность высокомолекулярных фракций отсутствует после хранения экстрактов при всех исследованных температурах. Возможно, это результат агрегации белков, которая наблюдается в экстрактах после замораживания. Известно, что агрегация белков после замораживания происходит в результате изменения конформации молекул и концентрирования растворов в процессе их кристаллизации и обычно сопровождается потерей функциональной активности [3, 4]. Можно предположить, что гемолитическая активность высокомолекулярных фракций обусловлена молекулами белков. Гемолитическая активность, за которую ответственны низкомолекулярные фракции, сохраняется независимо от температуры хранения и, по-видимому, обусловлена молекулами, на которые процессы замораживания и низкотемпературного хранения не влияют.

Экспозиция эритроцитов с ЭПЧ типов 1 и 2 приводит к повышению осмотической устойчивости мембран клеток. Это свойство экстрактов полностью сохраняется после хранения ЭПЧ при -80 и -196°C , а при -20°C теряется (рис. 2). Отмеченное повышение осмотической устойчивости эритроцитов в средах, содержащих ЭПЧ, не наблюдается при экспозиции клеток с отдельными фракциями экстрактов, полученных методом гель-хроматографии.

Экспозиция эритроцитов с ЭПЧ типа 3, которые обладают гемолитической активностью, приводит к снижению кислотной устойчивости эритроцитов. Остальные экстракты повышают кислотную устойчивость клеток. Установлено, что снижение кислотной устойчивости эритроцитов наблюдается после экспозиции с фракциями молекулярной массой 200–400 кДа, которые вызывают гемолиз после экспозиции с ними, как было отмечено ранее. Максимальное стабилизирующее влияние на кислотную устойчивость проявляется во фракциях с молекулярной массой 30–60 кДа. После экспозиции с экстрактами, хранившимися при -80 и -196°C , кроме тех, в которых наблюдается небольшая гемолитическая активность за счет низкомолекулярной фракции, кислотная устойчивость эритроцитов повышается. Кислотная устойчивость эритроцитов после экспозиции со всеми экстрактами, которые хранились при -20°C , снижается. В то же время наблюдается повышение содержания малонового альдегида (МДА) в хранящихся при -20°C экстрактах (рис. 3), это позволяет объяснить увеличение гемолиза и снижение кислотной устойчивости эритроцитов после экспозиции с такими ЭПЧ.

Выводы

Хранение ЭПЧ при -80 и -196°C , несмотря на частичную агрегацию белков, позволяет не только

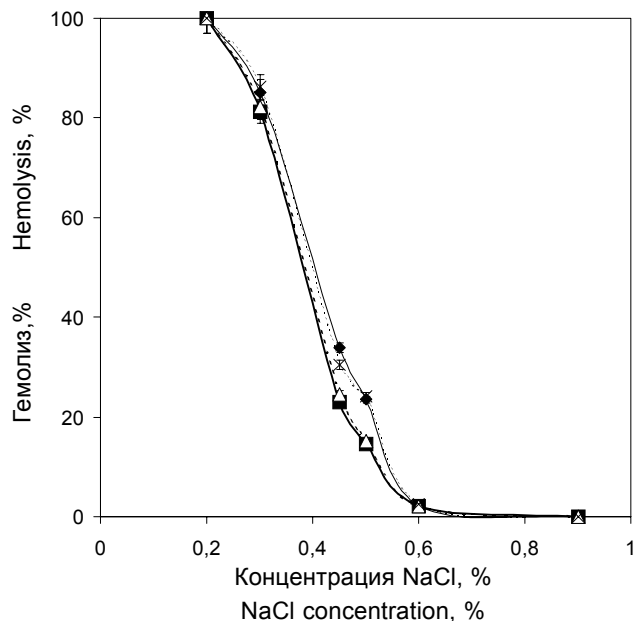


Рис. 2. Осмотическая устойчивость эритроцитов после экспозиции с ЭПЧ, хранившихся при различных температурах 6 месяцев: \blacklozenge – контроль; \blacksquare – после экспозиции с ЭПЧ; \blacktriangle – после экспозиции с ЭПЧ, хранившимся при -196°C ; \times – после экспозиции с ЭПЧ, хранившимся при -20°C .

Fig. 2. Osmotic resistance of erythrocytes after exposure with HPEs, stored at different temperatures for 6 months: \blacklozenge – control; \blacksquare – after exposure with HPEs; \blacktriangle – after exposure with HPEs, stored at -196°C ; \times – after exposure with HPEs, stored at -20°C .

changes are more significant than after storage at -80 and -196°C . Fig. 1 shows gel-chromatograms for HPEs of 2nd type. Similar changes in protein distribution for molecular masses are observed in other types of HPEs.

After storage of HPEs at all the investigated temperatures the increasing of relative protein content is noted with higher molecular masses, testifying to protein aggregation. These changes are well expressed after storage at -20°C .

The hemolytic activity of high-molecular fractions is absent after storage of extracts at all the investigated temperatures. It could be likely the result of protein aggregation, which observed in the extracts after freezing. It is known that protein aggregation after freezing results of solutions from the change of molecule conformation and concentrating at their crystallization and is usually accompanied with the loss of functional activity [3, 4]. It may be supposed that hemolytic activity of highly molecular fractions is stipulated with protein molecules. Hemolytic activity, which low-molecular fractions is responsible for, is preserved independently of storage temperature and, it seemed to cause with molecules on which the freezing and low-temperature storage have no effect.

Exposure of erythrocytes with HPEs of the 1st and 2nd types results in increase of osmotic resistance of

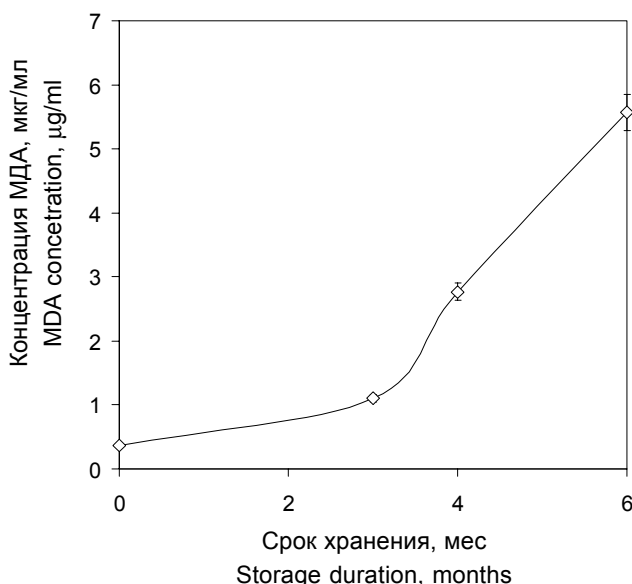


Рис. 3. Содержание МДА в ЭПЧ, хранившимся при -20°C .
Fig. 3. MDA content in HPEs, stored at -20°C .

сохранить стабилизирующее действие на мембраны эритроцитов, но и предотвратить дестабилизирующее влияние, обусловленное высокомолекулярными фракциями. При хранении экстракта плаценты при -20°C в нем увеличивается содержание продуктов перекисного окисления, что приводит к повышению уровня гемолиза и уменьшению кислотной устойчивости эритроцитов после экспозиции с такими экстрактами.

Литература

1. *Погожих Д.Н., Розанова Е.Д., Нардид О.А.* Влияние экстракта плаценты человека на эритроциты донорской крови // Проблемы медицинской науки та освіти. – 2007. – №1. – С. 54–57.
2. *Bank D.M.* Characterization of the glycation of albumin in freeze-dried and frozen human serum // *Anal. Chem.* – 1997. – Vol. 69, N13. – P. 2457–2463.
3. *Cao E., Chen Y., Cui Z., Forster P.R.* Effect of freezing and thawing rates on denaturation of proteins in aqueous solutions // *Biotechnol. Bioenerg.* – 2003. – Vol. 82, N6. – P. 684–690.
4. *Yan Y.-B., Wang O., He H.-W., Zhou H.-M.* Protein thermal aggregation involves distinct regions: sequential events in the heat-induced unfolding and aggregation of hemoglobin // *Biophys. J.* – 2004. – Vol. 86, N3. – P. 1682–1690.

Поступила 15.05.2008

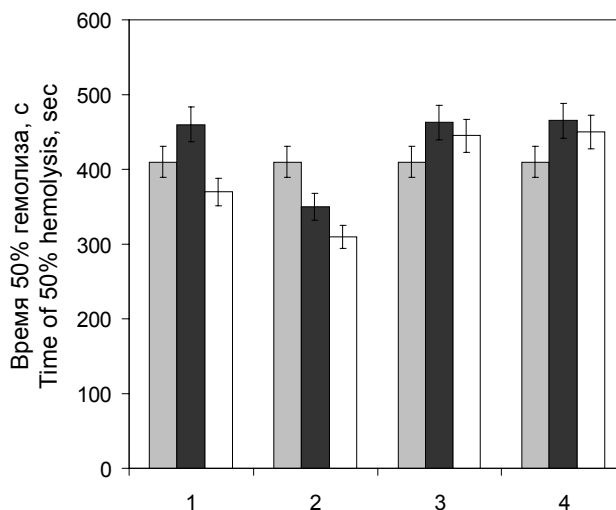


Рис. 4. Влияние на кислотную устойчивость эритроцитов экспозиции с ЭПЧ: 1 – свежий ЭПЧ, 2 – ЭПЧ, хранившийся при -20°C ; 3 – ЭПЧ, хранившийся при -80°C ; 4 – ЭПЧ, хранившийся при -196°C ; □ – контроль; ■ – ЭПЧ без гемолитической активности; ▒ – ЭПЧ с гемолитической активностью.

Fig. 4. Effect of erythrocytes' exposure with HPEs on acid resistance: 1 – fresh HPEs; 2 – HPEs, stored at -20°C ; 3 – HPEs, stored at -80°C ; 4 – HPEs, stored at -196°C ; □ – control; ■ – HPEs without hemolytic activity; ▒ – HPEs with hemolytic activity.

cell membranes. This property of extracts is preserved completely after storage of HPEs at -80°C and -196°C , and at -20°C is lost (Fig. 2). Noted increase of osmotic resistance of erythrocytes in the media, containing HPEs, is not observed during cell exposure with isolated fractions of extracts, obtained by gel-chromatography.

Exposure of erythrocytes with HPEs of 3rd type, having hemolytic activity, results in decrease of acid resistance of erythrocytes. Other extracts increase the acid resistance of cells. It has been established that the decrease of acid resistance of erythrocytes is observed after exposure with the fractions of 200–400 kDa molecular mass, triggering hemolysis after exposure with them, as it has been noted previously. The maximum stability effect on acid resistance is exhibited in fractions with 30–60 kDa molecular mass. After exposure with the extracts, stored at -80°C and -196°C , except those, where low hemolytic activity is observed due to low-molecular fraction, acid resistance of erythrocytes increases. The acid resistance of erythrocytes after exposure with all the extracts, stored at -20°C , decreases. At the same time the increase of malonic aldehyde content (MDA) is observed in stored extracts at -20°C (Fig. 3), that enables to explain the hemolysis increase and reduction of acid resistance of erythrocytes after exposure with these HPEs.

Conclusions

HPEs storage at -80 and -196°C , in spite of fractional protein aggregation, enables not only to preserve

a stabilizing activity on membranes of erythrocytes, but also inhibit the destabilizing effect, caused with high-molecular fractions. When storing the placenta extracts at -20°C the content of peroxidation products in it increases, that result in increase of hemolysis level and decrease of acid resistance of erythrocytes after exposure with those extracts.

References

1. *Pogozhikh D.N., Rozanova E.D., Nardid O.A.* Effect of human placenta extract on erythrocytes of donor blood // *Problems of Medical Science and Education.*– 2007.– N1.– P. 54-57.
2. *Bank D.M.* Characterization of the glycation of albumin in freeze-dried and frozen human serum // *Anal. Chem.*– 1997.– Vol. 69, N13.– P. 2457–2463.
3. *Cao E., Chen Y., Cui Z., Forster P.R.* Effect of freezing and thawing rates on denaturation of proteins in aqueous solutions // *Biotechnol. Bioenerg.*– 2003.– Vol. 82, N6.– P. 684–690.
4. *Yan Y.-B., Wang O., He H.-W., Zhou H.-M.* Protein thermal aggregation involves distinct regions: sequential events in the heat-induced unfolding and aggregation of hemoglobin // *Biophys. J.*– 2004.– Vol. 86, N3.– P. 1682–1690.

Accepted in 15.05.2008