УДК 57.043:611.013.85+615.451.16:612.111.014.41

С.Л. Розанова, И.Ф. Коваленко, О.А. Нардид*

Влияние замораживания на геропротекторную эффективность экстракта плаценты человека при гипотермическом хранении эритроцитов

UDC 57.043:611.013.85+615.451.16:612.111.014.41

S.L. Rozanova, I.F. Kovalenko, O.A. Nardid*

Freezing Effect on Anti-Aging Efficiency of Human Placenta Extract Under Hypothermic Storage of Red Blood Cells

Криоконсервирование может приводить к изменению конформации и к агрегации биологических макромолекул [1, 2]. Однако влияние криоконсервирования на свойства гетерогенных композиций макромолекул изучено недостаточно. Одной из таких композиций является экстракт плаценты человека (ЭПЧ), в состав которого входят различные биологически активные вещества.

Одним из свойств, присущих экстракту плаценты, является его геропротекторная активность [3]. Для моделирования процессов старения *in vivo* и *in vitro* широко применяется галактоза. В основе механизма ее действия лежит способность моносахаров неферментативно взаимодействовать с аминогруппами белков, что приводит к накоплению конечных продуктов гликолиза в реакции Maillard. Негативным эффектом гликозилирования, является не присоединение сахаров к долгоживущим белкам, а происходящее вследствие этого их окислительное повреждение, обусловленное свободными радикалами [4]. Объектом изучения влияния галактозы могут быть эритроциты. В частности, показано, что галактоза влияет на асимметричное распределение липидов в мембранах эритроцитов и на их взаимодействие с макрофагами [5].

Цель данной работы – изучить влияние замораживания на геропротекторную эффективность ЭПЧ при гипотермическом хранении эритроцитов человека в условиях ускоренного старения, вызванного галактозой.

Материалы и методы

Эритроциты выделяли из донорской крови человека центрифугированием 5 мин при 3000g, 3 раза отмывали от плазмы физиологическим раствором (0,9% NaCl). Затем эритромассу разво-

Cryopreservation may lead to the change of conformation and aggregation of biological macromolecules [1, 2]. However the effect of cryopreservation of properties of heterogenous compositions of macromolecules has been insufficiently studied. One of these compositions is human placenta extract (HPE) comprising different biologically active substances.

One of the properties inherent to the placenta extract is its anti-aging activity [3]. For modeling the processes of aging *in vivo* and *in vitro* galactose is widely used. In the base of its mechanism is the ability of monosugars to interact with amino groups of proteins, resulting in the accumulation of final products of glycolysis in Maillard reaction. Negative effect of glycation is not addition of sugars to long-living proteins, but their oxidative impairment due to this fact and caused with free radicals [4]. The research was aimed to study the effect of galactose using red blood cells as the object. In particular, it has been shown that galactose affects asymmetric distribution of lipids in red blood cells' membranes and their interaction with macrophages [5].

The research aim was to investigate the freezing effect on anti-aging efficiency of HPE under hypothermic storage of human red blood cells in conditions of galactose-caused accelerated aging.

Materials and methods

The red blood cells were derived from human donor's blood by centrifugation for 5 min at 3,000g, were thrice washed-out of plasma with physiological solution (0.9% NaCl). Then erythromass was diluted with 5 mM phosphate-saline solution (PSS) in 1:1 ratio (5 mM sodium-phosphate buffer, 0.15M NaCl), pH 7.4.

To examine the effect of galactose on the properties of red blood cells 0.2 ml of 0.5M galactose was added

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

* *Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:* ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.:+38 (057) 373-38-71, факс: +38 (057) 373-30-84, электронная почта: cryo@online.kharkov.ua

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

* *To whom correspondence should be addressed:* 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.:+380 57 373 3871, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

дили в соотношении 1:1 5 мМ фосфатно-солевым буфером (ФСБ) (5 мМ натрий-фосфатный буфер, 0,15 М NaCl), pH 7,4.

Для изучения влияния галактозы на свойства эритроцитов к 0,2 мл клеток в ФСБ добавляли 0,2 мл 0,5 М галактозы в этом же буфере. В контрольные образцы добавляли ФСБ без галактозы. Были также проведены аналогичные эксперименты с эритроцитами, после экспозиции их с ЭПЧ (свежеприготовленным и замороженным до –196°С). Использовали экстракты, которые не обладали гемолитическим действием. В экспериментальных образцах после хранения в течение одной недели в холодильнике по количеству гемоглобина в надосадке определяли уровень гемолиза.

Кислотную устойчивость эритроцитов оценивали по времени 50%-го гемолиза в цитрат-фосфатном буфере, pH 3,8. Время 50%-го гемолиза рассчитывали по кинетической кривой изменения оптической плотности при 700 нм. Осмотическая хрупкость характеризовалась зависимостью величины гемолиза от концентрации NaCl в растворе (0,05–0,15 М).

Содержание различных форм гемоглобина (окси-, дезокси- и метгемоглобина) определяли спектрофотометрически. Спектры поглощения записывали на спектрофотометре Pye Unicam SP8000.

Форму эритроцитов и наличие в образцах теней эритроцитов наблюдали под микроскопом МБИ-13.

Результаты и обсуждение

Результаты исследований показали, что при гипотермическом хранении эритроцитов в присутствии галактозы увеличивается количество гемолизировавших эритроцитов по сравнению с контрольными образцами. С увеличением срока хранения разница между количеством гемолизировавших эритроцитов в контрольных образцах и в образцах с галактозой возрастает.

Осмотическая и кислотная устойчивости эритроцитов в контроле через неделю хранения не изменяются, в образцах с галактозой – уменьшаются. Время 50%-го кислотного гемолиза эритроцитов, хранящихся в присутствии галактозы, независимо от времени хранения всегда было на 10% ниже, чем в контроле. Поскольку и осмотическая и кислотная устойчивости эритроцитов определяются состоянием мембранных белков, то можно предположить, что действие галактозы связано с изменением состояния белкового компонента мембран.

Основной функцией эритроцитов является транспорт кислорода, который осуществляется внутриэритроцитарным гемоглобином. Внутри

to 0.2 ml of cells in PSS. PSS with no galactose was added into the control samples. The same experiments were performed in red blood cells after their exposure with HPE (freshly prepared and frozen down to –196°C). The extracts not having hemolytical effect were used. In the experimental samples after storage for a week in a refrigerator the hemolysis level was tested on the amount of hemoglobin in supernatant. Acid resistance of red blood cells was assessed on the time of 50% hemolysis in citrate-phosphate buffer, pH 3.8. The time of 50% hemolysis was calculated using kinetic curve of the change of optic density at 700 nm. Osmotic fragility was characterized by the dependence of hemolysis value on concentration of NaCl in the solution (0.05÷0.15M).

Content of different hemoglobin forms (oxy-, desoxy-, methemoglobin) was examined spectrophotometrically. Adsorption spectra were recorded with Pye Unicam SP8000 spectrophotometer.

The shape of erythrocytes and presence in the samples of ghosts of red blood cells were observed with MBI-13 microscope.

Results and discussion

Results of the studies have shown that under hypothermic storage of red blood cells in presence of galactose the number of hemolyzed red blood cells in comparison with the control samples increases. With a rise in storage term the difference between the number of hemolyzed red blood cells in the control samples and in those with galactose enhances.

Osmotic and acid resistances of red blood cells in the control in a week after storage do not change and they decrease in the samples with galactose. The time of 50% acid hemolysis of red blood cells stored with galactose independently on storage time always was by 10% lower than in the control. Since both osmotic and acid resistances of red blood cells are determined by the state of membrane proteins, then it could be supposed that the effect of galactose is related to the change of state in protein component of membranes.

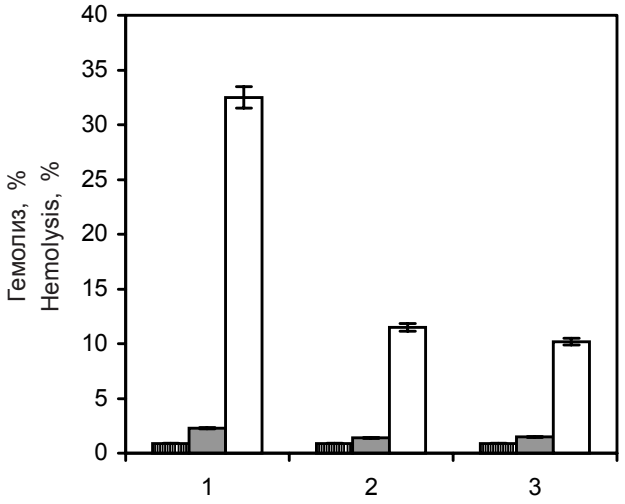
The main function of red blood cells is oxygen transport which is accomplished with intra-erythrocyte hemoglobin. Inside red blood cells hemoglobin exists predominantly in three forms: oxyhemoglobin (oxygen-loaded hemoglobin), desoxyhemoglobin and methhemoglobin. The balance of these forms is maintained by some biochemical systems and is constant at the determined temperature and oxygen concentration in the solution. The variation of the balance of hemoglobin forms may testify to the impairment of the functions of red blood cells. The research results have shown that despite the changed properties of erythrocyte membranes the relative content of different forms of hemoglobin during their storage does not alter.

эритроцитов гемоглобин находится преимущественно в трех формах: оксигемоглобин (гемоглобин, связанный с кислородом), дезоксигемоглобин и метгемоглобин. Равновесие этих форм поддерживается рядом биохимических систем и постоянно при заданной температуре и концентрации кислорода в растворе. Изменение равновесия форм гемоглобина может свидетельствовать о нарушении функций эритроцитов. Результаты исследований показали, что, несмотря на изменение свойств мембраны эритроцитов, относительное содержание различных форм гемоглобина в процессе их хранения не изменяется.

Экстракт плаценты человека – это раствор биологических макромолекул. При криоконсервировании подобных композиций целесообразно использовать быстрые режимы замораживания. Поэтому мы провели сравнительное исследование влияния на эритроциты свежеприготовленного ЭПЧ и ЭПЧ после быстрого (~100°С/мин) замораживания до –196°С. Результаты исследований показали, что свежеприготовленный экстракт и экстракт после замораживания действуют на эритроциты, хранящиеся в присутствии галактозы, одинаково эффективно. Действие экстракта проявлялось, прежде всего, в снижении уровня гемолиза эритроцитов после хранения в присутствии галактозы (рисунок). Экспозиция с ЭПЧ повышала также осмотическую и кислотную устойчивости эритроцитов. Микроскопические исследования показали, что после хранения в присутствии галактозы в препаратах эритроцитов увеличивается количество эхиноцитов и разрушенных клеток. Присутствие экстракта несколько улучшает морфологическую картину.

Выводы

Эритроциты являются адекватной моделью для изучения геропротекторных свойств ЭПЧ и эти свойства после быстрого замораживания сохраняются.



Гемолиз эритроцитов в процессе хранения в присутствии 0,25 М галактозы. 1 – контроль; 2 – после экспозиции со свежеприготовленным ЭПЧ; 3 – после экспозиции с замороженным ЭПЧ; ◫ – 1 день; ▩ – 2 дня; □ – 7 дней.

Hemolysis of human donor erythrocytes after their storage with 0.25M galactose: 1 – control, 2 – after exposure with fresh extract, 3 – after exposure with frozen extract. ◫ – 1 day of storage; ▩ – 2 days of storage; □ – 7 days of storage.

Human placenta extract is the solution of biological macromolecules. During cryopreservation of similar compositions rapid freezing regimens are expedient to be used. Therefore we comparatively studied the effect of freshly prepared HPE and the one after rapid (100°C/min) freezing down to –196°C. The research results have demonstrated that freshly prepared extract and the one after freezing affect red blood cells stored in galactose presence with the similar efficiency. The effect of extract was manifested primarily in the reduced hemolysis level for red blood cells after storage with galactose (Figure). Exposure with HPE increased also osmotic and acid resistances of red blood cells. Microscopic studies have shown, that after storage in galactose presence in erythrocyte preparations there is an increase in a number of echinocytes and destroyed cells. Extract presence slightly improves morphological picture.

Conclusions

It have been demonstrated that red blood cells appear to be an adequate model for studying antiaging properties of human placenta extract and these properties remain unchanged after rapid freezing.

Литература

1. *Гольцев А.Н., Дубрава Т.Г., Бабенко Н.Н. и др.* Модификация структурно-функциональной организации стволовых кроветворных клеток костного мозга после действия факторов низкотемпературного консервирования // Пробл. криобиологии.– 2005.– Т. 15, №3.– С. 362–366.
2. *Нардид Э.О., Науменко Е.И., Розанова С.Л., Нардид О.А.* Влияние режимов замораживания на агрегацию белков сыворотки кордовой крови // Пробл. криобиологии.– 2006.– Т. 16, №3.– С. 311–315.
3. *Shinde V., Dhalwal K., Paradkar A.R., Mahadik K.R.* Effects of human placental extract on age related antioxidant enzyme status in D-galactose treated mice // Pharmacologyonline.– 2007.– Vol. 1.– P. 252–261

References

1. *Goltsev A.N., Dubrava T.G., Babenko N.N. et al.* Modification of structural and functional organization of hemopoietic stem cells of bone marrow after low temperature factors // Problems of Cryobiology.– 2005.– Vol. 15, N3.– P. 362–366

4. *Song X., Bao M., Li D., Li Y.M.* Advanced glycation in D-galactose induced mouse aging model // Mech. Ageing Dev.– 1999.– Vol. 108, N3.– P. 239–251.
5. *Quan G.B., Liu M.X., Ren S.P. et al.* Changes of phosphatidylserine distribution in human red blood cells during the process of loading sugars // Cryobiology.– 2006.– Vol. 53, N1.– P.107–118.

Поступила 15.05.2008

2. *Nardid E.O., Naumenko E.I., Rosanova S.L., Nardid O.A.* Effect of freezing regimes on proteins aggregation of human cord blood serum // Problems of Cryobiology.– 2006.– Vol. 16, N3.– P. 311-315.
3. *Shinde V., Dhalwal K., Paradkar A.R., Mahadik K.R.* Effects of human placental extract on age related antioxidant enzyme status in D-galactose treated mice // Pharmacologyonline.– 2007.– Vol. 1.– P. 252–261
4. *Song X., Bao M., Li D., Li Y.M.* Advanced glycation in D-galactose induced mouse aging model // Mech. Ageing Dev.– 1999.– Vol. 108, N3.– P. 239–251.
5. *Quan G.B., Liu M.X., Ren S.P. et al.* Changes of phosphatidylserine distribution in human red blood cells during the process of loading sugars // Cryobiology.– 2006.– Vol. 53, N1.– P.107–118.

Accepted in 15.05.2008