

УДК 591.465.3:57.071.2:547.427.3/458.2

ДИНАМІКА АКТИВНОСТІ ХОРІОНІЧНОГО ГОНАДОТРОПІНУ ЗА СТАБІЛІЗАЦІЇ МАННІТОМ ТА САХАРОЗОЮ ПРИ ТРИВАЛОМУ ЗБЕРІГАННІ

Ю. І. Сливчук
inenbiol@mail.lviv.ua

Інститут біології тварин НААН, вул. В. Стуса, 38, м. Львів, 79034, Україна

Вивчено вплив різних доз манніту і сахарози на збереження активності хоріонічного гормону людини (ХГл) в розчині. Для дослідження використовували хоріонічний гормон людини з сечі вагітних жінок (12–16-й тиждень вагітності), отриманий в Інституті біології тварин методом фільтрації та осадження спиртом, ацетоном і ацетатом амонію. У 1 мг отриманого сирцю хоріонічного гормону людини імуно-хемолюмінісцентними методами визначили концентрацію молекул вільної β -субодиниці хоріонічного гормону, а також загального хоріонічного гормону людини (сумарно інтактного хоріонічного гормону людини і вільної β -субодиниці). За різницею концентрації загального і вільного хоріонічного гормону людини визначили його активність. Гонадотропін розвели фосфатно-сольовим буфером (рН 7,34) і розалікували по 2500 мМО/л. Проведено 2 досліді, які відрізнялись між собою за введеним в якості стабілізатора цукром (манніт/сахароза), які склалися з трьох дослідних і контрольної серії зразків. Дослідні серії зразків відрізнялись між собою концентрацією введених для стабілізації гонадотропіну манніту і сахарози. Зразки поміщали в термостат за температури 40 °С. Протягом двох місяців через кожні 2 тижні за різницею концентрації загального і вільного хоріонічного гормону людини визначали активність гонадотропіну. Доведено, що додавання сахарози в кількості 50–75 мг/см³ до розчиненого фосфатним буфером ХГл забезпечує досить високий рівень активності гормону впродовж тривалого зберігання в термостаті за температури 40 °С. Додавання до розчиненого фосфатним буфером ХГл 50–75 мг/см³ манніту забезпечує високий рівень активності гормону (62,98 та 71,28 %) протягом 4 тижнів.

Ключові слова: САХАРОЗА, МАННІТ, ГОНАДОТРОПІН, АКТИВНІСТЬ ХОРІОНІЧНОГО ГОРМОНУ

THE DYNAMICS OF THE ACTIVITY OF CHORIONIC GONADOTROPIN STABILIZED BY MANNITOL AND SUCROSE AT PROLONGED CONSERVATION

Yu. I. Slyvchuk
inenbiol@mail.lviv.ua

Institute of Animal Biology NAAS, V. Stusa Street 38, Lviv 79034, Ukraine

The studies of effects of various doses of mannitol and sucrose on the preservation of the activity of dissolved human chorionic hormone (HCH) have been performed. Human chorionic hormone from urine of pregnant women (12th–16th week of gestation), obtained in the Institute of Animal Biology by the technique of filtration and precipitation by alcohol, acetone and ammonium acetate, was used in the investigations. In 1 mg of obtained raw material of human chorionic hormone, the concentration of molecules of free β -subunit of the chorionic hormone, as well as that of total human chorionic hormone (the sum of intact human chorionic hormone and free β -subunit) was established by means immunochemoluminescent techniques. Its activity was established on the basis of the difference between the concentrations of total and free chorionic hormone. The gonadotropin was diluted with phosphate-salt buffer (pH 7.34) and aliquoted by 2500 mIU/l. Two experiments were performed, differing by the sugar introduced as a stabilizer (mannitol/sucrose) and consisting of 3 experimental and control series of samples. Experimental groups differed between themselves by the concentration of mannitol and sucrose added to stabilize the gonadotropin. The samples were placed into a thermostat at a temperature of 40 °C. Every 2 weeks during two months the activity of the gonadotropin was established, on the basis of the difference between concentrations of total and free human chorionic hormone. It was demonstrated that the addition of sucrose

in the amount of 75 mg/cm³ to the HCH dissolved in phosphate buffer ensures a sufficiently high level of the hormone activity during prolonged conservation in a thermostat at 40 °C. The addition of 50–75 mg/cm³ of mannitol dissolved in phosphate buffer ensures a high level of the activity of the hormone (62.98 and 71.28 per cent) during 4 weeks.

Keywords: SUCROSE, MANNITOL, GONADOTROPIN, CHORIONIC HORMONE ACTIVITY

ДИНАМИКА АКТИВНОСТИ ХОРИОНИЧЕСКОГО ГОНАДОТРОПИНА СТАБИЛИЗИРОВАННОГО МАННИТОМ И САХАРОЗОЙ ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ ХРАНЕНИИ

Ю. И. Сливчук
inenbiol@mail.lviv.ua

Институт биологии животных НААН, ул. В. Стуса, 38; г. Львов 79034, Украина

Изучено влияние различных доз маннита и сахарозы на сохранение активности хорионического гормона человека (ХГч) в растворенном виде. Для исследования использовали хорионический гормон человека из мочи беременных женщин (12–16-я неделя беременности) который получили в Институте биологии животных методом фильтрации и осаждения спиртом, ацетоном и ацетатом аммония. В 1 мг полученного сырья хорионического гормона человека иммуно-хемолуминисцентным методом определили концентрацию молекул свободной β -субъединицы хорионического гормона а также общего хорионического гормона человека (суммарно интактного хорионического гормона человека и свободной β -субъединицы) По разнице концентрации общего и свободного хорионического гормона человека определили его активность. Гонадотропин развели фосфатно-солевым буфером (рН 7,34) и розаликвотили по 2500 мМЕ/л. Проведено 2 эксперимента, которые различались между собой введенным в качестве стабилизатора сахаром (маннит / сахароза), и состояли из 3 исследовательских и контрольной серий образцов. Опытные серии образцов отличались между собой концентрацией введенных для стабилизации гонадотропина маннита и сахарозы. Образцы помещали в термостат при температуре 40 °С. В течение двух месяцев через каждые 2 недели по разнице концентрации общего и свободного хорионического гормона человека определяли активность гонадотропина. Доказано, что добавление к растворенному фосфатным буфером ХГч сахарозы в количестве 50–75 мг/см³ обеспечивает достаточно высокий уровень активности гормона в течение длительного хранения при температуре 40 °С. Добавление к растворенному фосфатным буфером ХГч 50–75 мг/см³ маннита обеспечивает высокий уровень активности гормона (62,98 та 71,28 %) на протяжении 4 недель.

Ключевые слова: САХАРОЗА, МАННИТ, ГОНАДОТРОПИН, АКТИВНОСТЬ ХОРИОНИЧЕСКОГО ГОРМОНА

До групи гонадотропінів відносять хоріонічний гонадотропін (ХГ), фолікулостимулюючий гормон (ФСГ; фолікотропін), лютеїнізуючий гормон (ЛГ; лютропін). ФСГ і ЛГ синтезуються гіпофізом більшості ссавців, тоді як ХГ синтезується плацентарною тканиною приматів і коней. В останні роки структура гонадотропних гормонів була декодована для різних видів риб, тварин і людини. Молекули гонадотропінів різних видів тварин і людини, володіючи значною гомологією, не ідентичні. Альфа-субодиниця хоріонічного гормону людини

(ХГл) ідентична α -субодиниці ЛГ, ФСГ, а також ТТГ (тиреотропний гормон) і становить 92 амінокислотних залишки. Бета-субодиниця ХГл, поліпептидний ланцюг якого складається з 145 амінокислотних залишків, специфічна для цього гормону, але проявляє високий ступінь структурної гомології приблизно 80 % з β -субодиницею лютеїнізуючого гормону, відрізняючись від останньої подовженням С-кінцевого ділянки на 24 амінокислотних залишки. На вуглеводну частину, яка характеризується значною гетерогенністю, припадає близько 30 %

молекулярної маси ХГ. Вуглеводні компоненти ХГ необхідні для з'єднання субодиниць, підтримки конформації молекули, захищають поліпептидні ланцюги субодиниць від розщеплення [1–7]. ХГ виробляється клітинами трофобласта підчас вагітності (зовнішній шар клітин у зародків ссавців) і плаценти [8]. Однак, відомо, що ХГ і його β -субодиниця продукуються не тільки в хоріоні трофобласта та плаценти, але і в тканинах плода (навіть більшою мірою, ніж у плаценті) протягом усього онтогенезу ссавців. Він може також вироблятися деякими пухлинами, спорідненими за походженням клітинам трофобласта плаценти [9–12]. Синтез α - і β -субодиниць проходить незалежно і в кров надходять, як димерні (інтактні) молекули гормону, так і вільні (незв'язані) субодиниці ХГ. Молекула ХГ порівняно легко дисоціює на субодиниці, наприклад при дії сечовини або пропіонової кислоти. Ізольовані α - і β -субодиниці ХГ позбавлені біологічної активності. Специфічні біологічні властивості ХГ обумовлені β -субодиницею. Структурна подібність між β -субодиницею ХГ і лютеїнізуючого гормону проявляється близькістю їх біологічних і імунологічних властивостей. Сучасні методи дослідження дозволяють визначити концентрацію інтактних (димеризованих) молекул ХГ або вільної субодиниці, а також загального ХГ (сумарно інтактного ХГ і вільної β -субодиниці) [13–16].

Хоріонічний гормон у великих кількостях синтезується плацентою і виділяється з сечею, звідки може бути виділений та очищений. Очищені гонадотропіни, зазвичай, отримують шляхом ліофілізації і зберігають у сухому вигляді. Ліофілізовані препарати є досить стабільними при зберіганні, однак, ліофілізація є дорогим і трудомістким етапом у процесі отримання, а їх розчини нестійкі, що є недоліком у їх використанні. Тому, розробки в цьому напрямку мають значні переваги у здешевленні препаратів, що дозволяють забезпечити достатню стабільність рідких форм гонадотропних

препаратів зі збереженням їх активності тривалий час. Комплексні дослідження з вивчення оптимальної кількості цукрів і інших специфічних біологічно активних речовин необхідних для стабілізації гонадотропінів актуальні. На основі вивчення оптимального кількісного та якісного складу біологічно активних речовин, що забезпечать стабілізацію структури гонадотропіну та підвищать його активність буде створено стабільні гормональні препарати пролонгованої дії, що здатні ефективно посилювати відтворювальні процеси сільськогосподарських тварин, та довготривало зберігатися в звичайних умовах без втрати активності. У зв'язку з цим метою роботи було розробити методи стабілізації активності гонадотропних гормональних препаратів цукрами.

Матеріали і методи

Проведені роботи з вивчення впливу різних доз манніту (шестиатомний спирт належить до групи вуглеводів) і сахарози на збереження активності хоріонічного гормону людини (ХГл). Для дослідження використовували ХГЧ з сечі вагітних жінок (на 12–16-й тиждень вагітності), отриманий методом фільтрації та осадження спиртом, ацетоном і ацетатом амонію. Імунохемолюмінісцентними методами визначено концентрацію загального (ХГл + β -ХГл) і вільного (β -ХГл) в 1 мг сирцю. Отриманий гонадотропін розводили фосфатно-сольовим буфером (рН 7,34) і розаліквотили по 2500 мМО/л. Проведено 2 досліди, які відрізнялись між собою за введеним в якості стабілізатора цукру (манніт/сахароза). Кожен дослід складався з 4 серій зразків, які відрізнялись між собою дозою введеного стабілізатора в розрахунку на 1 см³ 75, 50 і 25 мг відповідно. Зразки помістили в термостат з температурою 40 °С. Протягом двох місяців через кожні 2 тижні проводили визначення концентрації загального (ХГл + β -ХГл) і вільного (β -ХГл). Активність інтактного ХГЧ визначали за різницею

((ХГл + β -ХГл) – (β -ХГл)). Після закінчення експерименту з вивчення динаміки активності гонадотропіну зразки помістили в холодильник на 45 діб, після чого перевірили активність гонадотропіну на статевонезрілих самцях щурів за концентрацією естрадіолу і прогестерону. Щурам двічі підшкірно ввели по 0,25 МО на 1 голову [17]. Дози введеного гонадотропіну розраховували, виходячи з показника активності отриманого в результаті 2-місячного зберігання його в

термостаті. У сироватці крові щурів естрадіол і прогестерон визначали за допомогою DRG тест систем.

Результати й обговорення

На рисунку 1 зображено зміну активності ХГл у пробах з використанням манніту як стабілізатора. Після 2–4 тижнів інкубації ХГл при 40 °С виявлено високу стабільність активності гонадотропіну в зразках з вмістом 50–75 мг/см³ манніту.

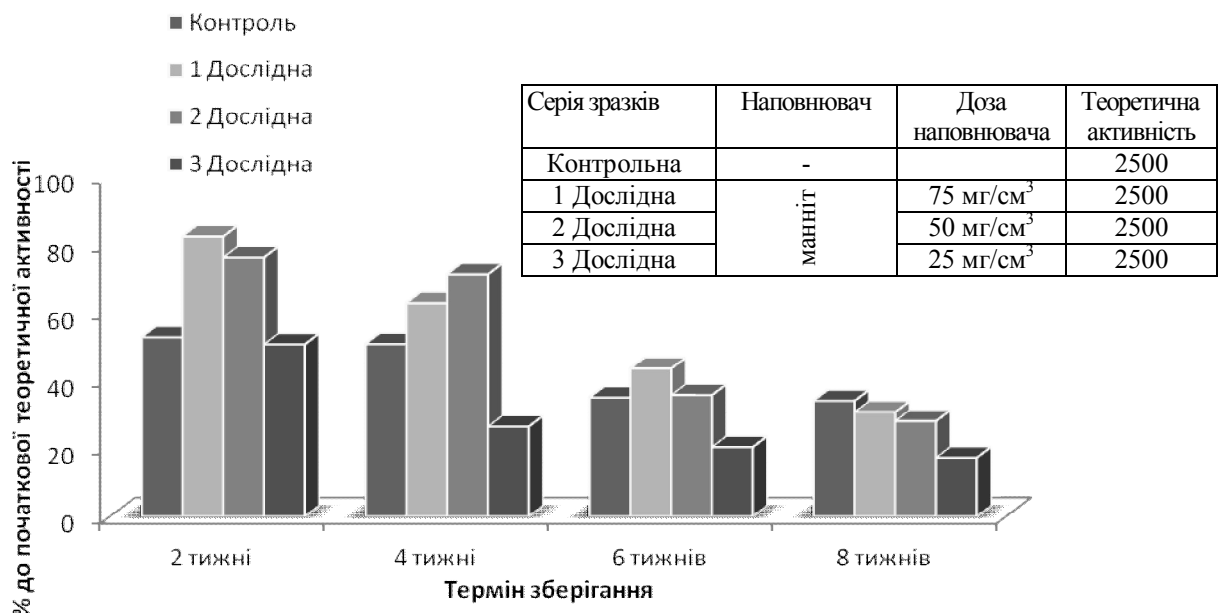


Рис. 1. Динаміка активності ХГл за тривалого зберігання з додаванням до розбавника манніту

Через два тижні інкубації виявлено зниження активності ХГл на 47,16 % у зразках контрольної серії і на 49,22 % у зразках 3-ї дослідної серії, а у зразках 1–2-ї дослідних серій на 17,54 і 23,58 % відповідно. На 8-й тиждень інкубації проб активність ХГл у зразках контрольної серії становила 34,02 % від початкової концентрації і 30,68; 27,94 і 17,27 % відповідно в зразках 1–3-ї дослідних серій.

Зміни активності ХГл у зразках з додаванням сахарози представлені на рисунку 2. Через два тижні в зразках з вмістом 25 мг/см³ сахарози виявили зниження активності ХГл на 53 % у порівнянні до початкової теоретичної активності. А у зразку з вмістом 75 мг/см³ сахарози активність була високою і становила майже 68 %.

Активність гонадотропіну в 2-й серії зразків була на одному рівні з контролем і становила близько 51 %. Високу активність ХГл було виявлено в 1-й серії зразків на 4 тиждень інкубування. Протягом 6-тижневого інкубування при 40 °С активність ХГл у зразках з вмістом 50–75 мг/см³ сахарози була вищою в порівнянні з відповідним показником контрольної та 3-ї дослідної серії зразків. Через вісім тижнів від початку досліджень активність ХГл у 2-й дослідній серії зразків була низькою і становила 20 % від початкової теоретичної активності, найвищою активність гонадотропіну була в першій дослідній серії зразків — 37 % з вмістом 75 мг/см³ сахарози.

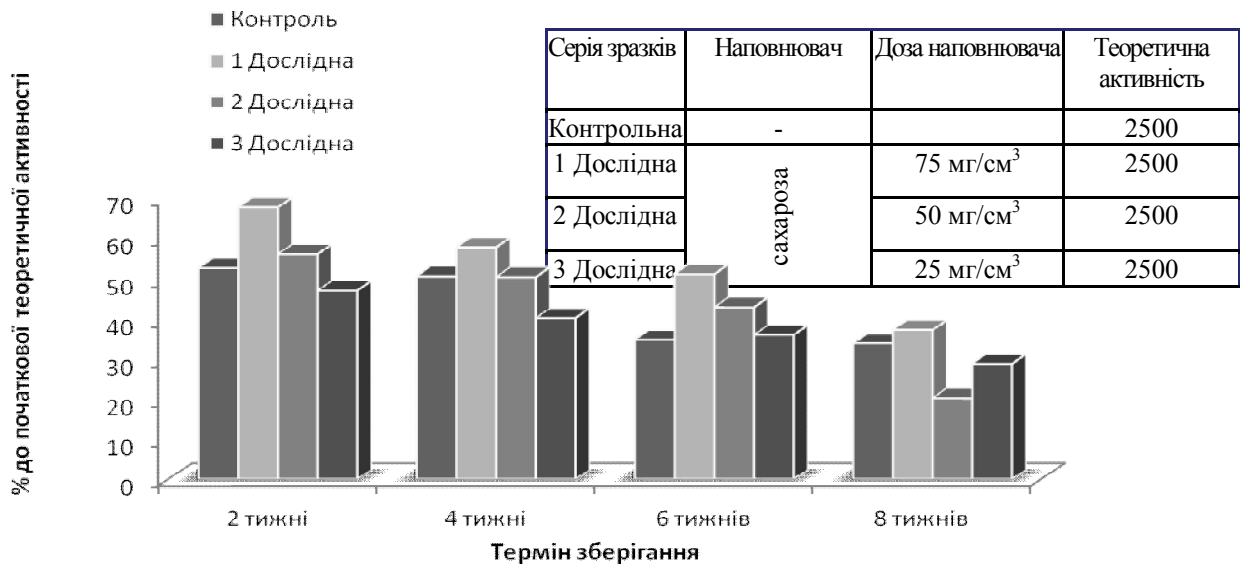


Рис 2. Динаміка активності ХГл за тривалого зберігання з додаванням до розбавника сахарози

На рисунку 3 зображено рівень естрадіолу і прогестерону в сироватці крові статевонезрілих самців щурів за двохразового підшкірного введення стабілізованого нами ХГл. Аналізуючи

отримані результати, можна сказати, що кількість естрадіолу і прогестерону у всіх групах тварин збільшилася майже в 10 разів. Співвідношення естрадіолу до прогестерону становило 10:1.

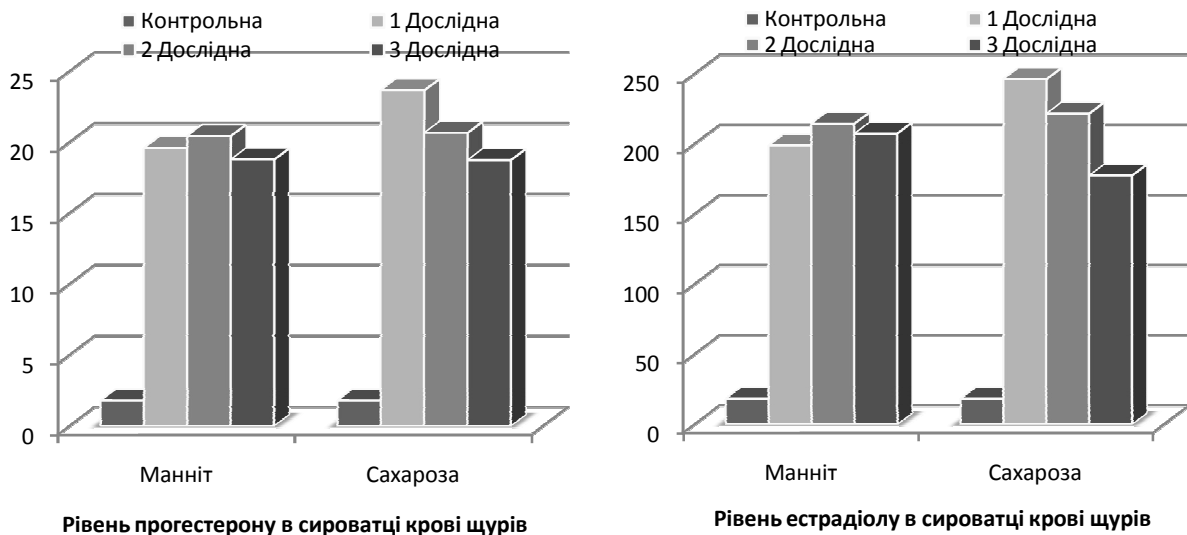


Рис. 3. Рівень естрадіолу і прогестерону в сироватці крові щурів після введення ХГл

Висновки

Додавання 50–75 мг/см³ манніту до розведеного фосфатним буфером ХГл забезпечує високий рівень активності гормону впродовж 4 тижнів зберігання

зразків за температури 40 °С (62,98 та 71,28 %). При додаванні 75 мг/см³ сахарози достатньо висока активність гонадотропіну спостерігається впродовж 6-тижневого зберігання (понад 50 %) порівняно з

контрольною, 2- та 3-ю дослідними серіями зразків.

Підвищення рівня естрадіолу і прогестерону в сироватці крові за підшкірного введення стабілізованого гонадотропіну статевонезрілим самцям щурів. Отже, додавання цукрів до розчиненого ХГЛ забезпечує збереження його активності протягом тривалого зберігання при температурі 40 °С.

Перспективи подальших досліджень. Подальші дослідження будуть спрямовані на вивчення впливу різних доз інших біологічно активних речовин, зокрема амінокислот, а також їх сумісного впливу з цурками на збереження активності гонадотропіну в розчиненому стані.

1. Wide L., Wide M. Higher plasma disappearance rate in the mouse for pituitary follicle stimulating hormone of young women compared to that of men and elderly women. *J. Clin Endocrinol Metabol*, 1984, vol. 58, 426 p.

2. Fiddes J., Goodman H. The gene encoding the common alpha subunit of the four human glycoprotein hormones. *J Mol Appl Genet*, 1981, vol. 1, no 3, pp. 68–75.

3. Lempiäinen A., Hotakainen K., Alfthan H., Stenman U., Loss of human chorionic gonadotropin in urine during storage at -20 °C. *Clinica Chimica Acta*, 2012, vol. 413, pp. 232–236.

4. Moyle W. R., Campbell R. K., Myers R. V. The evolution of ligand-receptor pairs. *Nature*, 1994, vol. 368, pp. 251–254.

5. Howles C.M. Expression of human FSH (Gonad-F) by recombinant DNA technology. *Hum Reprod.*, 1996, vol. 2, pp. 13–16.

6. De Leeuw R., Mulders J., Voortman G. Structure function relationship of recombinant follicle-stimulating hormone (Puregon). *Mol Hum Reprod*, 1996, vol. 2, pp. 361–365.

7. Nozaki M., Uchida K., Nishiyama M. Effects of estradiol or testosterone treatment on expression of gonadotropin subunit mRNAs and

proteins in the pituitary of juvenile brown hagfish, *Paramyxineatami*. *General and Comparative Endocrinology*, 2013, vol. 189, pp. 111–118.

8. Mc Chesney R., Wilcox A., O'Connor J., Intact HCG, free HCG beta subunit and HCG beta core fragment: longitudinal patterns in urine during early pregnancy. *Hum Reprod*, 2005, vol. 20, pp. 928–935.

9. Huhtaniemi J. T., Korenbrot C. C., Jaffe R. B. Content of chorionic gonadotropin in human fetal tissues. *J Clin Endocrinol and Metabol*, 1975, vol. 46, no 6, pp. 994–997.

10. Yochimoto J., Wolfien A. R., Hirose F. Human chorionic gonadotropin — like material. Present in normal human tissues. *Amer J Obstet and Gynec*, 1979, vol. 134, no. 7, pp. 729–733.

11. Maiti M., Sen K., Sen S., Lahiri S. Studies on stabilities of some human chorionic gonadotropin complexes with b-emitting radionuclides, *Appl. Rad. Isotopes.*, 2011, vol. 69, pp. 316–319.

12. Borkowski A., Mugaradt C. Human corionic gonadotropin in the plasma of normal nonpregnant subjects. *New Engl J Med*, 1979, vol. 301, no. 6, pp. 298–302.

13. Pierce J., Parsons T. Glycoprotein hormones: structure and function. *Annual Review of Biochemistry*, 1981, vol. 50, pp. 465–495.

14. Fiddes J., Talmadge K. Structure, expression, and evolution of the genes for the human glycoprotein hormones. *Recent Progress in Hormone Research*, 1984, vol. 40, pp. 43–78.

15. Frimel G. Immunologicheskie metodyi [Immunological methods], Moscow, Medicina, 1987. 215 p. (In Russian).

16. Mc Chesney R., Wilcox A., O'Connor J., Intact HCG, free HCG beta subunit and HCG beta core fragment: longitudinal patterns in urine during early pregnancy. *Hum Reprod*. 2005, vol. 20, pp. 928–35.

17. Houdebine L.-M., Fan J. (2009) Rabbit Biotechnology: Rabbit Genomics, Transgenesis, Cloning and Models, Springer Science + Business Media B.V. p. 6.