

DOI: 10.26693/JMBS04.02.251

УДК 57.086.13:615.361:615.451.1:618.46

*Боброва О. М., Рєпіна С. В., Нарожний С. В.,
Нардід О. А., Розанова К. Д.*

ВПЛИВ ЗАМОРОЖУВАННЯ-ВІДІГРІВАННЯ ПЛАЦЕНТИ НА БІОЛОГІЧНУ АКТИВНІСТЬ ЇЇ ЕКСТРАКТІВ

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків, Україна

*helen.bobrova.77@gmail.com,
repina.svetlana@gmail.com*

Екстракти плаценти, отримані різними методами, широко використовуються в практичній медицині. У той же час тривають експериментальні і клінічні дослідження терапевтичної ефективності екстрактів плаценти по відношенню до різних патологій, включаючи запальні захворювання, остеоартрит, хронічний біль, ішемічне пошкодження головного мозку, пошкодження печінки і т. ін. Кріогенні технології можуть бути використані для розширення перспектив клінічного застосування екстрактів плаценти. Однак низькотемпературний вплив на екстракти властивостей їх терапевтичної ефективності вивчено недостатньо.

У роботі досліджено вплив заморожування-відігрівання плаценти на здатність її водно-сольових екстрактів та їх фракцій підвищувати термостабільність еритроцитів, що є показником протизапальної активності. Екстракти одержували зі свіжоотриманих, а також заморожених до $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ і $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ та відігрітих плацент людини. Окремі фракції одержували за допомогою гел'єхроматографії. Термостабільність еритроцитів оцінювали за рівнем термогемолізу, станом цитозолю та бар'єрною функцією мембрани еритроцитів.

Встановлено, що заморожування плаценти до $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ і $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ не призводило до втрати здатності екстрактів і їх окремих фракцій знижувати термогемоліз еритроцитів. Найбільш ефективно підвищували терморезистентність клітин фракції з молекулярної масою $< 4\text{ кДа}$ і $12\text{--}20\text{ кДа}$. Методом електронного парамагнітного резонанса спінових зондів виявлено зниження швидкості порушення бар'єрних властивостей мембрани еритроцитів при $+55\text{ }^{\circ}\text{C}$ та модифікування стану цитозолю в області

$+ (40\text{--}50)\text{ }^{\circ}\text{C}$ після попереднього інкубування з екстрактами зі свіжоотриманої і замороженої-відігрітої плаценти.

Отримані результати свідчать про те, що кріоконсервування плаценти є перспективним підходом, щоб мати зразки плаценти у зручний для цього час. Але вплив тривалого низькотемпературного зберігання на біологічну активність компонентів плаценти потрібно вивчати додатково.

Ключові слова: водно-сольовий екстракт, плацента людини, заморожування-відігрівання, термогемоліз еритроцитів, мікров'язкість цитозолю.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дана робота є фрагментом науково-дослідної роботи відділу кріобіофізики ІПКіК НАН України «Вплив кріоконсервування плаценти та її водно-сольових екстрактів на антиоксидантну та протизапальну дію екстрактів», № держ. реєстрації 0116U003491. Автори є співвиконавцями теми.

Вступ. Застосування низьких температур забезпечує зберігання високої життєздатності об'єктів, в тому числі клітин і тканин фетоплацентарного походження [1]. Плацента – унікальна скарбниця, яка містить практично всі біологічні речовини, що синтезуються в організмі людини, склад і концентрація яких є характерними саме для періоду внутрішньоутробного розвитку людини і, надалі, обумовлюють їх позитивну дію при лікуванні захворювань різного ґенезу [2]. Екстракти плаценти людини (ЕПЛ), які мають широкий спектр протеїнів, пептидів, мінералів, амінокислот, стероїдних гормонів тощо, також знайшли широке використання у

медичній галузі [3]. Дослідження впливу низьких температур на біологічно-активні речовини водно-сольових екстрактів плаценти проводилися [4], проте це питання вивчено недостатньо.

Використання екстрактів плаценти у клініці багато в чому обумовлено їх протизапальними властивостями. З іншого боку, як було встановлено у ранніх дослідженнях [5], протизапальна активність традиційних лікарських препаратів, що виявляється на рівні організму, корелює з їх здатністю знижувати термогемоліз еритроцитів. Виявлено, що рівень термогемолізу еритроцитів знижується, а їх загальна термостабільність підвищується під впливом групи ліків, водних екстрактів різноманітних трав та природних біоактивних сполук, що мають протизапальну, протиревматоїдну, протиартритну та анальгетичну дії [5-8]. Тому цілком обґрунтовані дослідження впливу ЕПЛ та їх окремих фракцій на поведінку еритроцитів у зоні гіпертермічних температур, що дозволить оцінити активність екстрактів плаценти у якості протизапальних речовин.

Мета роботи – вивчити вплив заморожування-відігрівання плаценти на здатність її екстрактів підвищувати термостабільність еритроцитів, що є показником протизапальної активності.

Матеріал та методи досліджень. Водно-сольові екстракти одержували з плацент від здорових породіль з їх інформованої згоди. Фрагменти свіжоотриманих плацент заморожували у пластикових пакетах до $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ (у рідкому азоті) або до $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (у морозильній камері). Відігрівання здійснювали на водяній бані при $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Відмивали у 6-кратному об'ємі фізіологічного розчину. Екстракти плаценти людини (ЕПЛ), як зі свіжоотриманих плацент, так і з їх заморожених-відігрітих фрагментів, одержували, як описано нами раніш [4]. Окремі фракції ЕПЛ отримували за допомогою гель-хроматографії.

Еритроцити одержували з цільної донорської крові (чоловіча II+), яку заготовляли на консерванті «Глюгіцир» у Харківському обласному центрі служби крові. Для видалення плазми і лейкоцитів кров центрифугували 5 хвилин при 1500g. Осад еритроцитів тричі відмивали фосфатно-сольовим буфером (150 мМ NaCl, 5 мМ фосфатний буфер, pH 7.4) (ФСБ) для подальших досліджень. Для дослідження термогемолізу відмиті еритроцити ресуспендували ФСБ (1:1 за об'ємом), інкубували з цільним ЕПЛ або його фракціями протягом 1 год. Еритроцити відмивали від ЕПЛ та фракцій, ресуспендували і піддавали гіпертермії (20 хв. у регульованому водному термостаті при $55\text{ }^{\circ}\text{C}$) [6]. Гемоліз оцінювали за виходом гемоглобіну шляхом вимірювання оптичної щільності в надосаді при 540 нм [7] на спектрофотометрі «Pye Unicam SP 8000», Великобрита-

нія і виражали у відсотках відносно 100% гемолізованих клітин.

Вплив ЕПЛ на температурозалежну динаміку стану цитозолу (мікров'язкість) та бар'єрну функцію мембрани еритроцитів при гіпертермії досліджували методом електронного парамагнітного резонанса (ЕПР) спінових зондів, як описано нами [9], із застосуванням зонду ТЕМПОН та розширюючого агента, фериціаніда калію – $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, що не проникає в інтактні еритроцити. Для приготування зразків до 0,5 мл еритроцитарної маси контрольної чи відмитої від ЕПЛ або окремих фракцій додавали по 50 мкл водних розчинів ТЕМПОН (10^{-2} M) та $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (1 M) і реєстрували спектри ЕПР на спектрометрі Bruker ER 100 D, Німеччина з термостатичним пристроєм (точність $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$).

Результати досліджень та їх обговорення.

Проведені дослідження показали, що термогемоліз еритроцитів в контролі складає $(65,7\pm 3,9)\%$ (рис. 1). Після попереднього інкубування еритроцитів з екстрактами зі свіжоотриманої плаценти спостерігається зниження рівня термогемолізу до $(53,4\pm 3,2)\%$. Заморожування плаценти як до $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, так і до $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ та наступне відігрівання не призводять до появи достовірних відмінностей рівня термогемолізу у порівнянні з екстрактом зі свіжоотриманої плаценти (рис. 1).

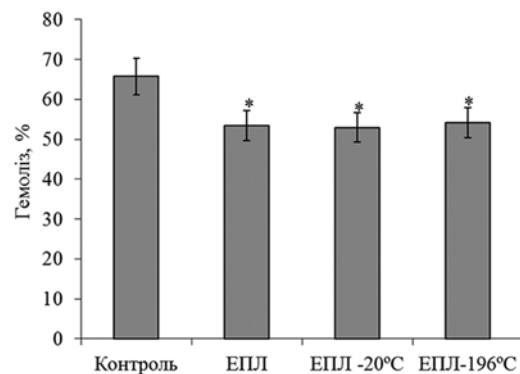


Рис. 1. Термогемоліз еритроцитів після обробки ЕПЛ, отриманих зі свіжоотриманої плаценти; замороженої до $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ і відігрітої плаценти; замороженої до $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ і відігрітої плаценти, * – статистично значуща різниця по відношенню до контролю, $p < 0,05$ ($n = 6$)

У роботі було також оцінено рівень термогемолізу еритроцитів після їх інкубування з різними фракціями ЕПЛ і проведено їх порівняльний аналіз задля ідентифікування найбільш ефективних фракцій. Можна відмітити, що після попереднього інкубування еритроцитів з фракціями $< 4\text{ kDa}$ і $12\text{--}20\text{ kDa}$ рівень термогемолізу достовірно знижується не тільки у порівнянні з контролем, але і з цільним ЕПЛ (рис. 2). З досліджених фракцій найбільший

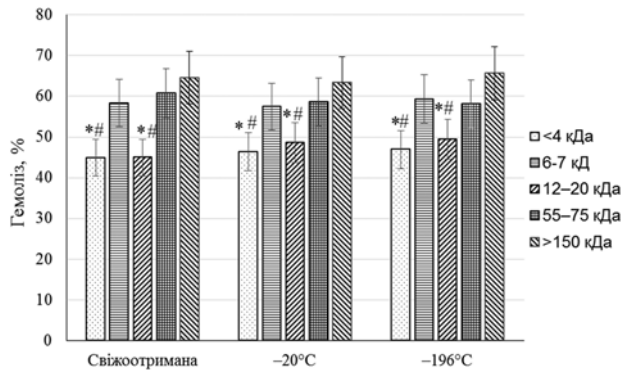


Рис. 2. Термогемоліз еритроцитів після обробки фракціями ЕПЛ, одержаними зі свіжоотриманої плаценти; замороженої до -20°C і відігрітої плаценти; замороженої до -196°C і відігрітої плаценти; * – статистично значуща різниця по відношенню до контролю, # – статистично значуща різниця по відношенню до цільного ЕПЛ, $p < 0,05$ ($n = 6$)

гемоліз спостерігається після обробки еритроцитів високомолекулярною фракцією (>150 кДа).

Заморожування плаценти призводить до деяких змін у чисельних значеннях проценту інгібування термогемолізу фракціями ЕПЛ, але статистично значимих відмінностей у порівнянні з дією фракцій зі свіжоотриманої плаценти зареєстровано не було. Різна ефективність фракцій ЕПЛ пояснюється особливостями їх складу. Низькомолекулярні компоненти екстрактів мають більшу здатність модифікувати мембрани еритроцитів і стабілізувати їх по відношенню до дії високих температур.

На температурній залежності параметра рухливості (мікров'язкості) ТЕМПОН у цитозолі еритроцитів у контролі спостерігаються особливості при 40°C , біля $46-47^{\circ}\text{C}$ та $+50^{\circ}\text{C}$ (рис. 3). Відомо, що це відображає термотропні зміни основного білку цитоскелету – спектрину, а саме його передденатураційні і денатураційні перебудови [10, 11].

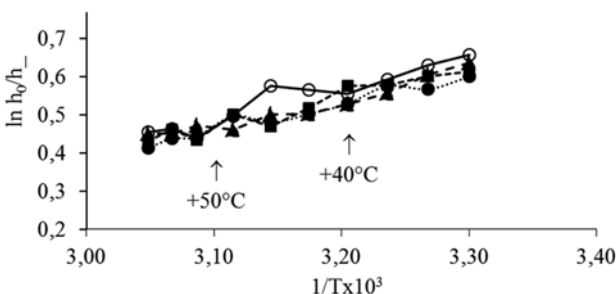


Рис. 3. Вплив ЕПЛ на Ареніусові залежності параметра рухливості ТЕМПОН у цитозолі еритроцитів:

контрольних – ○; попередньо інкубованих з ЕПЛ зі свіжоотриманої плаценти – ▲; з плаценти, замороженої до -20°C – ■; з плаценти, замороженої до -196°C – ●

Інкубація еритроцитів з ЕПЛ зі свіжоотриманої плаценти (рис. 3) призводить до модифікації температурної залежності параметра мікров'язкості, причому практично лише у зоні ($+40^{\circ}\text{C}$ – $+50^{\circ}\text{C}$). Заморожування плаценти, як до -20°C , так і до -196°C , не впливає на здатність екстрактів модифікувати стан цитозолу у зазначеній області температур (рис. 3).

Витримування суспензії еритроцитів при $+55^{\circ}\text{C}$ безпосередньо у резонаторі спектрометра ЕПР супроводжується зниженням амплітуди середньопольової компоненти спектра ЕПР ТЕМПОН у цитозолі (рис. 4). Це свідчить про порушення бар'єрної функції мембрани еритроцитів для фериціаніду, вірогідно внаслідок процесу, що передують термогемолізу [10]. За тангенсом куту нахилу логарифмічної залежності інтенсивності сигналу ЕПР від часу можна оцінити швидкість порушення бар'єрної функції мембрани, а отже й термостабільність еритроцитів.

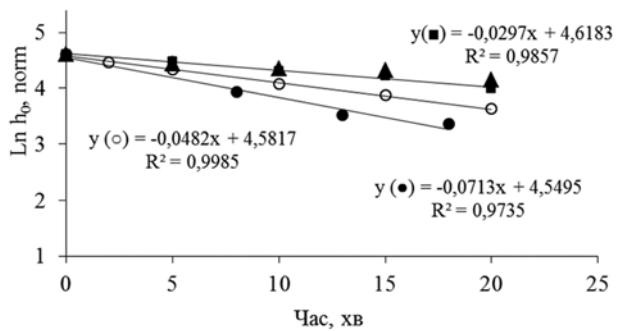


Рис. 4. Швидкість спадання інтенсивності спектра ТЕМПОН в еритроцитах при $+55^{\circ}\text{C}$:

контрольних – ○; попередньо інкубованих з фракцією 12–20 кДа зі свіжоотриманої плаценти – ▲; з замороженої до -20°C – ■; з замороженої до -196°C – ●. Наведені рівняння прямих та коефіцієнти детермінації

Дослідження впливу окремих фракцій ЕПЛ на бар'єрну функцію мембрани еритроцитів показало, що фракція 12–20 кДа зі свіжоотриманої та замороженої до -20°C плацент приводить до зниження швидкості спадання інтенсивності спектра ТЕМПОН при $+55^{\circ}\text{C}$ (рис. 4). Це може свідчити про її позитивний вплив на термостабільність еритроцитів – підвищення їх стійкості до термоіндукованого порушення бар'єрної функції, зокрема для іонів фериціаніду. Ця ж фракція ефективно знижує термогемоліз еритроцитів (рис. 2).

Проте ця фракція з плаценти, замороженої до -196°C , діяла протилежно. Це може вказувати на зміну структурного стану/складу цієї фракції під впливом наднизьких температур, що модифікує її вплив на бар'єрну функцію еритроцитів щодо іонів фериціаніду.

Дані роботи [11] свідчать про вплив на термостабільність еритроцитів передденатураційних перебудов білка смуги 3, зокрема кластеризації його димерів у тетрамери, що у свою чергу пов'язано зі станом спектрину. Наші результати дозволяють припустити, що підвищення термостабільності еритроцитів під дією ЕПЛ обумовлено їх впливом на стан білку полоси 3 та/ або спектринового скелету.

Висновки

1. Заморожування плаценти до -20°C та -196°C і наступне відігрівання не призводять до втрати здатності екстрактів плаценти людини і їх фракцій знижувати термогемоліз еритроцитів.
2. Найбільш ефективно підвищують терморезистентність еритроцитів фракції екстрактів плаценти людини з молекулярною масою < 4 кДа і $12-20$ кДа. Найнижчу ефективність мають високомолекулярні фракції.

3. Екстракти плаценти людини здатні модифікувати термостабільність еритроцитів, знижуючи швидкість порушення бар'єрних властивостей мембрани при $+55^{\circ}\text{C}$, та стан цитозолу в області $+(40\div 50)^{\circ}\text{C}$. Заморожування плаценти до -20°C і -196°C не впливає на здібність цільного екстракту змінювати ці характеристики еритроцитів.

Перспективи подальших досліджень. Отримані результати, які доказують можливість заморожування плаценти до -20°C і -196°C без втрати біологічної активності її екстрактів, свідчать про те, що кріоконсервування плаценти є перспективним підходом, щоб мати зразки плаценти у зручний для цього час. Але вплив тривалого низькотемпературного зберігання на біологічну активність компонентів плаценти потрібно вивчати додатково.

References

1. Mao Y, Singh-Varma A, Hoffman T, Dhall S, Danilkovitch A, Kohn J. The effect of cryopreserved human placental tissues on biofilm formation of wound-associated pathogens. *J Funct Biomater*. 2018; 9(3). pii: E3. PMID: 29316701. PMCID: PMC5872089. DOI:10.3390/jfb9010003
2. Pogozhykh O, Prokopyuk V, Figueiredo C, Pogozhykh D. Placenta and placental derivatives in regenerative therapies: experimental studies, history and prospects. *Stem Cells Int*. 2018 Jan 18; 2018: 4837930. PMID: 29535770. PMCID: PMC5822788. DOI: 10.1155/2018/4837930
3. Chakraborty PD, Bhattacharyya D. Aqueous extract of human placenta. In: Dr Jing Zheng (Ed) *Recent Advances in Research on the Human Placenta*, InTech. 2012: 77–92. DOI: 10.5772/31669
4. Nardid OA, Repina SV, Rozanova ED, Cherkashina YaO, Nardid EO. Properties of aqueous-saline human placental extracts and their fractions after storage of placenta at various subzero temperatures. *J Exp Integr Med*. 2015; 5(4): 172-7.
5. Nakamura H, Yokoyama Y, Motoyoshi S, Ishii K, Shimizu M. Effect of a nonsteroidal anti-inflammatory agent, tolmetin sodium on exudative inflammation in experimental animals. *Nippon Yakurigaku Zasshi*. 1979; 75(5): 447-58. PMID: 540878
6. Anosike ChA, Obidoa On, Ezeanyika L. Membrane stabilization as a mechanism of the anti-inflammatory activity of methanol extract of garden egg (*Solanum aethiopicum*). *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2012; 20: 76. doi: 10.1186/2008-2231-20-76
7. Bhadoriya SS, Mishra V, Raut S, Ganeshpurkar A, Jain SK. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of a hydroethanolic extract of tamarindus indica leaves. *Sci Pharm*. 2012; 80 (3): 685-700. PMID: 23008815. PMCID: PMC3447617. DOI: 10.3797/scipharm.1110-09
8. Bougandoura A, D'Abrosca B, Ameddah S, Scognamiglio M, Mekkiou R, Fiorentino A, et al. Chemical constituents and in vitro anti-inflammatory activity of *Cistanche violacea* Desf. (*Orobanchaceae*) extract. *Fitoterapia*. 2016; 109: 248-53. PMID: 26784519. doi: 10.1016/j.fitote.2016.01.010
9. Nardid O, Repina S, Bobrova E, Govorova Ya, Narozhnyi S, Rozanova E. Beneficial impact of human placenta extracts on erythrocyte membrane thermostability. *Trakia Journal of Sciences*. 2018; 3: 204-11. DOI: 10.15547/tjs.2018.03.006
10. Ivanov IT, Brähler M, Georgieva R, Bäuml H. Role of membrane proteins in thermal damage and necrosis of red blood cells. *Thermochimica Acta*. 2007; 456: 7-12. DOI: 10.1016/j.tca.2007.01.020
11. Ivanov IT, Zheleva A, Zlatanov I. Anion exchanger and the resistance against thermal haemolysis. *Int J Hyperthermia*. 2011; 27(3): 286-96. PMID: 21501030. DOI: 10.3109/02656736.2011.554064

УДК 57.086.13:615.361:615.451.1:618.46

ВЛИЯНИЕ ЗАМОРАЖИВАНИЯ-ОТОГРЕВА ПЛАЦЕНТЫ НА БИОЛОГИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ЕЕ ЭКСТРАКТОВ

Боброва Е. Н., Репина С. В., Нарожный С. В., Нардид О. А., Розанова Е. Д.

Резюме. Экстракты плаценты, полученные различными методами, широко используются в практической медицине. В то же время продолжают экспериментальные и клинические исследования терапевтической эффективности экстрактов плаценты в отношении различных патологий, включая воспалительные заболевания, остеоартрит, хроническую боль, ишемическое повреждение головного мозга,

повреждение печени и т. д. Криогенные технологии могут быть использованы для расширения перспектив клинического применения экстрактов плаценты. Однако низкотемпературное влияние на экстракты свойств их терапевтической эффективности изучено недостаточно. В данной работе исследовано влияние замораживания-отогрева плаценты на способность ее водно-солевых экстрактов и их фракций повышать термостабильность эритроцитов, что является показателем противовоспалительной активности. Экстракты получали из свежеполученных, замороженных до $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ и $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ и отогретых плацент человека. Отдельные фракции получали с помощью гель-хроматографии. Термостабильность эритроцитов оценивали по уровню термогемолиза, состоянию цитозоля и барьерной функции мембраны эритроцитов. Установлено, что замораживание плаценты до $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ и $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ не приводит к потере способности экстрактов и их отдельных фракций снижать термогемолиз эритроцитов. Наиболее эффективно повышают терморезистентность клеток фракции с молекулярной массой $<4\text{ кДа}$ и $12\text{--}20\text{ кДа}$. Методом ЭПР спиновых зондов выявлено снижение скорости нарушения барьерных свойств мембраны эритроцитов при $+55\text{ }^{\circ}\text{C}$ и модификация состояния цитозоля в области $+(40\div 50)^{\circ}\text{C}$ после инкубирования с экстрактами из свежеполученной и замороженной-отогретой плаценты. Полученные результаты свидетельствуют о том, что криоконсервирование плаценты является перспективным подходом, чтобы иметь образцы плаценты в удобное для этого время. Но влияние длительного низкотемпературного хранения на биологическую активность компонентов плаценты нужно изучать дополнительно.

Ключевые слова: водно-солевой экстракт, плацента человека, замораживание-отогрев, термогемолиз эритроцитов, микровязкость цитозоля.

UDC 57.086.13:615.361:615.451.1:618.46

Influence of Freeze-Thawing of Placenta on the Biological Activity of its Extracts

Bobrova O., Repina S., Narozhnyi S., Nardid O., Rozanova K.

Abstract. Placenta extracts obtained by various methods have been already widely used in practical medicine. At the same time experimental and clinical studies of the therapeutic efficacy of placenta extracts in relation to various pathologies, including inflammatory diseases, osteoarthritis, chronic pain, ischemic brain damage, liver damage, etc. are still in progress. Cryogenic technologies could be used for widening the perspectives of placenta extracts clinical application. However, the low temperature effect on extracts properties of their therapeutic efficacy is not studied well.

The purpose of the research was to investigate the effect of freeze-thawing of placenta on the ability of its aqueous-saline extracts to increase the thermal stability of erythrocytes, which is an indicator of anti-inflammatory activity.

Material and methods. Human placentas obtained from healthy parturients with their informed consent, stored for no more than 24 hours at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, were used in the research. Aqueous-saline extracts were obtained from fresh, frozen down to $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ and $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ and thawed human placentas by tissue homogenization and further exposing to PBS (pH 7.4). Individual fractions were received using gel chromatography. The level of human erythrocytes thermal hemolysis (20 min., $55\text{ }^{\circ}\text{C}$) was determined by the hemoglobin content in supernatant at 540 nm. Thermodependent dynamic state of cytosol and a membrane barrier function of erythrocytes were studied at hyperthermia using the method of EPR spin probe.

Results and discussion. The freezing of placentas down to $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ and $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ did not result in the loss of ability of their extracts and individual fractions to reduce the erythrocyte thermal hemolysis. The most effective enhancement of erythrocyte thermal resistance was found after incubation with fractions of $< 4\text{ kDa}$ and $12\text{--}20\text{ kDa}$. Placenta extracts modified both the state of erythrocyte cytosol, its microviscosity, at temperatures $+(40\text{--}50)^{\circ}\text{C}$, and their thermal stability, reducing the speed of disturbance of membrane barrier properties at $55\text{ }^{\circ}\text{C}$. The freezing of placentas down to $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ and $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ did not affect the ability of the whole extract to modify the state of cytosol and the membrane barrier function at hyperthermia.

Conclusions. The obtained results proved the possibility of freezing placentas down to -20°C and -196°C without losing of biological activity of their extracts, in particular, their ability to improve the thermal stability of erythrocytes, which is an indicator of anti-inflammatory properties.

Keywords: aqueous-saline extract, human placenta, freeze-thawing, thermal hemolysis of erythrocytes, cytosol microviscosity.

The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of coauthors of the article.

Стаття надійшла 27.01.2019 р.

Рекомендована до друку на засіданні редакційної колегії після рецензування