

**ФАЗОВЫЕ ПЕРЕХОДЫ В СУСПЕНЗИЯХ ЭРИТРОЦИТОВ С ЭКСТРАКТАМИ  
КРИОКОНСЕРВИРОВАННОЙ ПЛАЦЕНТЫ****Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины (г. Харьков)**

Данное исследование проведено в рамках научно-исследовательской темы отдела криобиофизики ИПК и К НАН Украины №26 «Дослідження впливу низькотемпературної обробки тканини плаценти на біологічну активність її водно-сольових екстрактів відносно клітин різного походження», № гос. регистрации 0106U002167.

**Вступление.** Экстракты из плаценты являются перспективными препаратами для использования в клинике [1, 2, 10, 11]. Однако, в связи с вероятностью большого разрыва во времени между моментом получения плаценты от роженицы, приготовлением из неё экстрактов и использованием их в медицинской практике и научных исследованиях возникает необходимость разработки технологии получения экстракта в любой момент времени.

Одним из наиболее перспективных методов долгосрочного хранения является консервирование биологических объектов при температуре жидкого азота. С другой стороны удобным и легко реализуемым в настоящее время на практике является способ хранения биологических объектов в бытовых морозильных камерах, работающих до температуры -20ч-25°С.

Однако низкотемпературное консервирование фрагментов плаценты без криопротектора, как показано в работе [9], приводит к частичному повреждению целостности цитоплазматических мембран, а также к изменению кинетики гистохимических реакций и увеличению количества диформаза, в то время как криоконсервирование плаценты в присутствии ДМСО не вызывает этих изменений [9]. Изменяются и свойства экстрактов, полученных из криоконсервированной плаценты человека [6, 7] В связи с этим, целесообразным является применение в процедуре низкотемпературного консервирования тканей плаценты защитных веществ – криопротекторов. Тем не менее, использование криопротекторов может приводить к количественным и качественным изменениям экстрактов плаценты и их воздействию на клетки.

В данной связи актуальным является исследование фазовых переходов в системе, состоящей из клеток и экстрактов после замораживания и хранения плаценты при температурах ниже 0°С, что важно для понимания процессов, протекающих в сложных биологических системах при низких температурах.

**Целью исследования** явилось изучение влияния хранения плаценты при -20°С и -196°С в

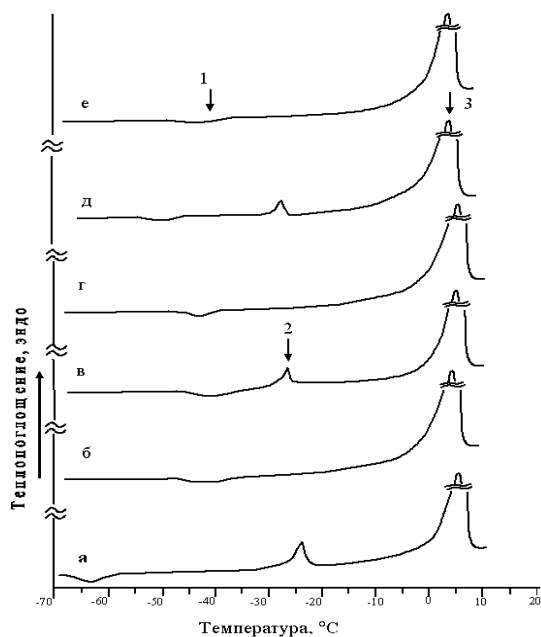
присутствии криопротекторов на физические процессы, протекающие в водно-солевых экстрактах, приготовленных из неё, и в суспензиях эритроцитов с добавками экстрактов на этапе нагрева после охлаждения их до -196°С.

**Объект и методы исследования.** Экстракты готовили из плаценты, прошедшей тестирование на наличие вирусных инфекций. Ткани плаценты освобождали от соединительной ткани, помещали в физиологический раствор с 10% концентрацией криопротекторов (ДМСО, глицерин, 1,2-пропандиол) на 2 часа. Массовое соотношение ткани и раствора криопротекторов составляло 1:1. Далее ткани, насыщенные криопротектором, извлекали из раствора, помещали в пластиковый контейнер и переносили в жидкий азот (-196°С) или в морозильную камеру (-20°С), где контейнеры хранились 6 месяцев. После хранения ткани размораживали при комнатной температуре, отмывали в 6-кратном объеме физиологического раствора и получали из них экстракты обычным способом [7].

Эритроциты донорской крови, полученной на консерванте „Глюгидир“, трижды отмывали 155мМ Na – фосфатным солевым буфером рН 7,4 (150 мМ NaCl + 5 мМ Na – фосфатного буфера) с центрифугированием в течение 5 мин. при 800 г и смешивали с экстрактом плаценты в соотношении 1:1.

Исследования низкотемпературных фазовых переходов в области температур 0±-100°С проводили на дифференциальном сканирующем калориметре (ДСК), разработанном в ИПК и К НАН Украины [3]. Образцы охлаждали путем погружения в жидкий азот со средней скоростью 3,3(3)°С/с. Термограммы регистрировали при нагреве со скоростью 8,3(3) · 10<sup>-3</sup> °С/с. Погрешность измерения температуры составляла ±0,2 °С.

**Результаты исследований и их обсуждение.** Термограммы экстрактов плаценты и их смесей с эритроцитами, полученные методом дифференциальной сканирующей калориметрии представлены на **рисунках 1 и 2**. На термограммах экстрактов плаценты человека после её предварительного хранения при температурах – 20°С и -196°С в присутствии криопротекторов регистрируется размытый экзотермический пик 1, соответствующий завершению кристаллизации льда на этапе нагрева [3]. Развитие этого процесса связано с высокими скоростями охлаждения, использованными в данной работе. В результате кристаллизация льда

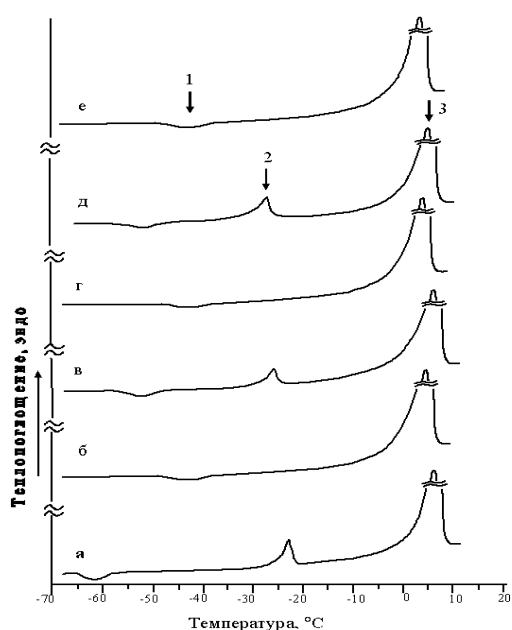


**Рис. 1.** а – екстракт плаценти, хранившійся при  $-20^{\circ}\text{C}$  з глицерином; б – эр. масса + екстракт плаценти, хранившійся при  $-20^{\circ}\text{C}$  з глицерином (1:1); в – екстракт плаценти, хранившійся при  $-20^{\circ}\text{C}$  з 1,2-ПД; г – эр. масса + екстракт плаценти, хранившійся при  $-20^{\circ}\text{C}$  з 1,2-ПД (1:1); д – екстракт плаценти, хранившійся при  $-20^{\circ}\text{C}$  з ДМСО; е – эр. масса + екстракт плаценти, хранившійся при  $-20^{\circ}\text{C}$  з ДМСО (1:1).

не успеває завершитися на етапі охолодження, і протекат на етапі нагріву. В ряду робіт [3, 4] експериментально показано, що при температурі нижче реєстрації піка 1 при нагріву в образці розвивається рясстеклованіє, супроводжуєє появлєнієм переохолоджєної жидкості, що явлєєтьєя предпосылкєю для завершєнієя кристаллізації.

Наряду с пиком 1 на термограммах экстрактов плаценты, хранившійся в присутствіє криопротекторов при температурах  $-20^{\circ}\text{C}$  и  $-196^{\circ}\text{C}$ , реєструєтьєя пик 2. соотвєтствующий плавлєнію євтєктичєских составов (рис. 1а,в,д и рис 2 а,в,д). Однако интенсивность этих пиков ниже, по сравнєнію с таковыми без криопротекторов, как это показано в работє [5]. Наблюдаетєя также уширєніє піка 2 и сдвиг єго по температурє в сторону понижєнієя, по сравнєнію с температурє плавлєнієя євтєктики, характерной для водных растворов NaCl. Так, например, после криоконсервированія плацєнты с глицєрином температура плавлєнієя в экстрактє снижєатєя до  $-26,2^{\circ}\text{C}$ , 1,2-ПД – до  $-30,3^{\circ}\text{C}$ , а ДМСО – до  $-31^{\circ}\text{C}$ , в то время как в экстрактє плацєнты хранившійся без криопротектора эта температура составляет  $-21,3^{\circ}\text{C}$ . Такие отлїчия могут бьтє обусловлєны изменєнієми как состава экстрактов в присутствіє криопротекторов, так и межмолекулярных взаимодействієй в исследуємых системах [8].

При смєшєніє экстрактов плацєнты, хранившійся при  $-20^{\circ}\text{C}$  и  $-196^{\circ}\text{C}$  в присутствіє



**Рис. 2.** а – екстракт плаценти, хранившійся при  $-196^{\circ}\text{C}$  з глицерином; б – эр. масса + екстракт плаценти, хранившійся при  $-196^{\circ}\text{C}$  з глицерином (1:1); в – екстракт плаценти, хранившійся при  $-196^{\circ}\text{C}$  з 1,2-ПД; г – эр. масса + екстракт плаценти, хранившійся при  $-196^{\circ}\text{C}$  з 1,2-ПД (1:1); д – екстракт плаценти, хранившійся при  $-196^{\circ}\text{C}$  з ДМСО; е – эр. масса + екстракт плацєнты, хранившійся при  $-196^{\circ}\text{C}$  з ДМСО (1:1).

криопротекторов с эритроцитами в соотношеніє 1:1 не реєструєтьєя плавлєніє євтєктичєских составов, что свидєтєльствует о том, что на этапє охолождєнієя образцов не развівалась кристаллізієция євтєктики. Это явлєніє наблюдєлось нами ранєє при смєшєніє эритроцитов с экстрактами плацєнты, не подвергавшійся низкотемпературному воздействию [5].

**Выводы.** Таким образом, во всех исследуємых системах после охолождєнієя их с высокими скоростями развіваетєя процесс завершєнієя кристаллізієции льда на этапє нагріву, в результатє того, что кристаллізієция льда не успеваєт завершитєя на этапє охолождєнієя, а развіваетєя с появлєнієм в образцє переохолоджєної жидкості при нагріву.

Наблюдаетєя уменьшєніє интенсивности и снижєніє температуры плавлєнієя євтєктичєских составов экстрактов плацєнты, хранившійся под защитой глицєрина, 1,2-пропандиола и димєтилсульфоксида при температурах  $-20^{\circ}\text{C}$  и  $-196^{\circ}\text{C}$ , по сравнєнію с экстрактами плацєнты, не подвергшійся низкотемпературному воздействию, связанное с изменєнієми состава экстрактов и межмолекулярных взаимодействієй в них.

**Перспективы дальнєйших исследований.** Представлєєт интерес исследованіє влїєнієя хранения плацєнты при температурах ниже  $0^{\circ}\text{C}$  на свойствах различных фракцій экстрактов и взаимодействієй их с различными клетками.

### Литература

1. Грищенко В. І. Зміна активності дегідрогеназ, вмісту гормонів і стану ліпопероксидації в алогенній плаценті в залежності від дії низьких температур / В. І. Грищенко, В. І. Шепітько, В. І. Строна [та ін.] // Проблеми криобіології. – 2004. – № 1. – С. 62 – 69.
2. Грищенко В. І. Низкотемпературное хранение эмбриональных и фето-плацентарных тканей в Украинском банке биологических объектов / В. И. Грищенко, Т. Н. Юрченко, О. С. Прокопюк [и др.] // Международный медицинский журнал. – 1999. – № 2. – С. 113-114.
3. Зинченко А. В. Исследование фазовых переходов и физических состояний водных растворов многоатомных спиртов в диапазоне температур -150°C ч 0°C : автореф. дисс. на соискание научн. степени канд. физ. -мат. наук : спец. 01.04.15 – молекулярная физика / А. В. Зинченко. – К., 1983. – 20 с.
4. Зинченко А. В. Влияние ДМСО на фазовые переходы и стеклование в суспензии эритроцитов кордовой крови ниже 0°C / А. В. Зинченко, Е. Н. Боброва, М. И. Щетинский // Проблеми криобіології. – 2003. – № 2. – С. 16 – 21.
5. Зинченко А. В. Влияние автоклавированных экстрактов плаценты человека на фазовое поведение суспензий клеток при температуре ниже 0°C / А. В. Зинченко, Е. Н. Боброва, М. И. Щетинский [и др.] // // Проблеми криобіології. – 2013. – Т. 23, № 1. – С. 16 – 21.
6. Погожих Д. Н. Изменение свойств водно-солевых экстрактов плаценты человека в процессе низкотемпературного хранения / Д. Н. Погожих, Е. Д. Розанова, О. А. Нардид // Проблеми криобіології. – 2008. – Т. 18, № 1. – С. 22-26.
7. Розанова С. Л. Изменение антиоксидантных свойств экстрактов плаценты человека после замораживания / С. Л. Розанова, Е. И. Науменко, Е. Д. Розанова [и др.] // Проблеми криобіології. – 2010. – Т. 20, № 3. – С. 288 – 295.
8. Шахпаронов М. И. Механизмы быстрых процессов в жидкостях. / М. И. Шахпаронов. – М. : Высшая школа, 1980. – 325 с.
9. Юрченко Т. Н. Влияние низкотемпературного консервирования без криопротектора и под защитой Me<sub>2</sub>SO на активность окислительно-восстановительных ферментов в ткани плаценты / Т. Н. Юрченко, А. П. Белоножко, Е. П. Жуликова [и др.] // Проблеми криобіології. – 2004. – № 2. – С. 84-88.
10. Shinde V. Evaluation of in-vitro antioxidant activity of human placental extract / V. Shinde, K. Dhalwal, A. R. Paradkar [et. al.] // Pharmacologyonline. – 2006. – Vol. 3. – P. 172-179.
11. Togashi S. Purification and identification of antioxidant substances in human placenta extracts / S. Togashi, N. Takashi, Y. Kubo [et. al.] // J. Health Sci. – 2000. – Vol. 46, № 2. – P. 117-125.

УДК 536. 6:615. 361. 013. 85:615. 451. 16

#### **ФАЗОВІ ПЕРЕХОДИ В СУСПЕНЗИЯХ ЕРИТРОЦИТІВ З ЕКСТРАКТАМИ КРІОКОНСЕРВОВАНОЇ ПЛАЦЕНТИ**

**Зинченко А. В., Боброва Е. Н., Говорова Ю. С.**

**Резюме.** Досліджували фазові переходи у екстрактах плаценти людини, кріоконсервованої з диметилсульфоксидом, гліцерином, 1,2-пропандіолом та вплив екстрактів на температури і характер фазових переходів в суспензіях еритроцитів. Встановлено, що після швидкого охолодження в екстрактах плаценти і сумішах екстрактів з еритроцитами розвивається процес завершення кристалізації на етапі нагріву. Показано, що при охолодженні екстрактів плаценти розвивається кристалізація евтектичних складів в відміну від суміші екстрактів з еритроцитами. Виявлено зниження температури і уширення піка плавлення евтектичних складів у екстрактах плаценти, яка зберігалася при температурах – 20°C і – 196°C у порівнянні з екстрактами плаценти, яка не була піддана дії низьких температур.

**Ключові слова:** низкотемпературні фазові переходи, екстракт плаценти, кріоконсервування, кріопротектори, еритроцити.

УДК 536. 6:615. 361. 013. 85:615. 451. 16

#### **ФАЗОВЫЕ ПЕРЕХОДЫ В СУСПЕНЗИЯХ ЭРИТРОЦИТОВ С ЭКСТРАКТАМИ КРИОКОНСЕРВИРОВАННОЙ ПЛАЦЕНТЫ**

**Зинченко А. В., Боброва Е. Н., Говорова Ю. С.**

**Резюме.** Исследовали фазовые переходы в экстрактах плаценты человека, криоконсервированной с диметилсульфоксидом, глицерином, 1,2-пропандиолом, и влияние экстрактов на температуры и характер фазовых переходов в суспензиях эритроцитов. Установлено, что после быстрого охлаждения в экстрактах плаценты и смесях экстрактов с эритроцитами развивается процесс завершения кристаллизации на этапе нагрева. Показано, что при охлаждении экстрактов плаценты развивается кристаллизация евтектических составов в отличие от смеси экстрактов с эритроцитами. Обнаружено снижение температуры и уширение пика плавления евтектических составов в экстрактах плаценты, которая хранилась при температурах – 20°C и – 196°C по сравнению с экстрактами плаценты, которая не подвергалась действию низких температур.

**Ключевые слова:** низкотемпературные фазовые переходы, экстракт плаценты, криоконсервирование, криопротекторы, эритроциты.

UDC 536. 6:615. 361. 013. 85:615. 451. 16

### Phase Transitions in Erythrocyte Suspensions with Cryopreserved Placenta Extract

Zinchenko A. V., Bobrova E. N., Govorova Yu. S.

**Summary.** This study investigated the effect of human placenta storage at temperatures of  $-20^{\circ}\text{C}$  and  $-196^{\circ}\text{C}$ , pre-saturated with Dimethyl sulfoxide, glycerol or 1, 2-propanediol, on course of phase transitions of water-salt extracts obtained from placenta. It was also investigated the temperature and nature of phase transitions in suspensions of red blood cells with addition of extracts on heating stage after cooling to  $-196^{\circ}\text{C}$ .

In order to prepare extracts, placenta was freed from connective tissue, placed in saline with 10% concentration of cryoprotectant (DMSO, glycerol, 1, 2-propanediol) for 2 hours. Weight ratio of tissue and cryoprotectant solution was 1:1. Further saturated with cryoprotectant, tissues were removed from solution and placed in plastic container and transferred into liquid nitrogen ( $-196^{\circ}\text{C}$ ) or freezer ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) where containers were stored for 6 months. After storage tissues were thawed at room temperature, washed with a 6-fold volume of saline solution and extracts were prepared with conventional method.

Erythrocytes of donated blood obtained in preservative "Glyugitsir" were washed thrice with 155mm Na – phosphate buffered saline pH 7,4, centrifuged for 5 min at 800 g and mixed with placental extract in 1:1 ratio.

Studies of low-temperature phase transition in the temperature range  $0^{\circ}$ - $100^{\circ}\text{C}$  were performed on a differential scanning calorimeter (DSC) developed in Institute of Cryobiology and Cryomedicine of Ukrainian National Academy of Sciences. Samples were cooled by immersion in liquid nitrogen at average rate of  $3.3(3)^{\circ}\text{C}/\text{sec}$ . Thermograms were recorded at heating rate of  $8.3(3)10^{-3}\text{C}/\text{s}$ . Temperature accuracy was  $\pm 0,2^{\circ}\text{C}$ . Thermograms analysis showed that process of ice crystallization completion was developed in all studied systems after its cooling with high-speed on heating stage, due to the fact that crystallization of ice cannot be completed at stage of cooling, and it develops with appearance of supercooled liquid in sample during heating stage. Experimentally, it is confirmed with help of blurred exothermic peak recording corresponding to completion of ice crystallization on the heating stage in thermograms of human placenta extract after its prior storage at temperature of  $-20^{\circ}\text{C}$  and  $-196^{\circ}\text{C}$  in presence of cryoprotectants as well as in mixtures of erythrocytes with extracts.

It is shown that crystallization of eutectic composition is developed during cooling of placenta extracts, but this process is not recorded in mixture of erythrocytes and extracts.

It is observed decrease in intensity and melting temperature of eutectic compositions of placenta extracts which has been stored under protection of glycerol, 1, 2-propanediol and dimethyl sulfoxide at temperatures of  $-20^{\circ}\text{C}$  and  $-196^{\circ}\text{C}$ , compared with placenta extracts which have not undergone low-temperature influence associated with changes of extracts structure and intermolecular interactions in them.

**Key words:** low-temperature phase transitions, placenta extract, cryopreservation, cryoprotectants, erythrocytes.

*Рецензент – проф. Шепітько В. І.*

*Стаття надійшла 17. 09. 2013 р.*