

УДК 536.42:612.015.21:611.013.85

А.В. Зинченко^{1*}, Е.Н. Боброва¹, Ю.С. Говорова¹, Е.Д. Розанова¹, В.Г. Карпенко²

Влияние низкотемпературного хранения плаценты человека на фазовые переходы во фракциях экстрактов плаценты и в смесях фракций с клетками

UDC 536.42:612.015.21:611.013.85

A.V. Zinchenko^{1*}, E.N. Bobrova¹, Yu.S. Govorova¹, E.D. Rozanova¹, V.G. Karpenko²

Effect of Low Temperature Storage of Human Placenta on Phase Transitions in Fractions of Placental Extracts and in Mixtures of the Fractions with Cells

Реферат: Исследовано фазовое поведение фракций экстрактов плаценты человека, хранившейся при -20 и -196°C , а также смесей суспензий эритроцитов и *Saccharomyces cerevisiae* с фракциями при температурах ниже 0°C . Методом гель-хроматографии получены фракции с м. м. до 4, 50–60 и больше 150 кДа. Фазовые переходы регистрировали методом низкотемпературной дифференциальной сканирующей калориметрии. Показано, что температуры фазовых переходов и характер их протекания во фракциях экстрактов плаценты не изменяются при ее хранении в течение 6 месяцев как при -20°C , так и при -196°C . Изменение межмолекулярных взаимодействий в системах при добавлении к фракциям экстрактов клеточных суспензий приводит к повышению температуры инверсии на 4–9 градусов и снижению температуры плавления эвтектики на 4–6 градусов. Температуры плавления всей системы при этом оставались неизменными в границах погрешности эксперимента. В смесях фракций с клеточными суспензиями обнаружено также снижение интенсивности пиков инверсии в 2–5 раз и пика плавления эвтектики в 7–15 раз в зависимости от типа клеток и условий хранения плаценты. Показано, что низкотемпературное хранение плаценты не влияет на температуры фазовых переходов в смесях, которые содержат суспензии эритроцитов или *S. cerevisiae* и фракции экстрактов, полученных из этой плаценты.

Ключевые слова: низкотемпературные фазовые переходы, дифференциальная сканирующая калориметрия, плацента, экстракты, фракции, эритроциты, *Saccharomyces cerevisiae*.

Реферат: Досліджена фазова поведінка фракцій екстрактів плаценти людини, яка зберігалась при -20 і -196°C , а також сумішей суспензій еритроцитів і *Saccharomyces cerevisiae* із фракціями екстрактів за температури нижче 0°C . Методом гель-хроматографії одержано фракції з м. м. до 4, 50–60 і більше 150 кДа. Фазові переходи реєстрували методом низькотемпературної диференціальної скануючої калориметрії. Показано, що температури фазових переходів і характер їх протікання у фракціях екстрактів плаценти не змінюються при її зберіганні протягом 6 місяців як при -20°C , так і при -196°C . Зміна міжмолекулярних взаємодій у системах при додаванні до фракцій екстрактів клітинних суспензій призводить до підвищення температури інверсії на 4–9 градусів і зниження температури плавлення евтектики на 4–6 градусів. Температури плавлення всієї системи при цьому залишались незмінними у межах похибки експерименту. У сумішах фракцій з клітинними суспензіями виявлено також зниження інтенсивності піків інверсії у 2–5 разів та піку плавлення евтектики у 7–15 разів у залежності від типу клітин і умов зберігання плаценти. Показано, що низькотемпературне зберігання плаценти не впливає на температури фазових переходів у сумішах, які містять суспензії еритроцитів чи *S. cerevisiae* та фракції екстрактів з цієї плаценти.

Ключові слова: низькотемпературні фазові переходи, диференціальна скануюча калориметрія, плацента, екстракти, фракції, еритроцити, *Saccharomyces cerevisiae*.

Abstract: There were studied the phase transitions in fractions of extracts from human placenta, stored at -20 and -196°C as well as the mixtures of erythrocyte and *Saccharomyces cerevisiae* suspensions with fractions at the temperatures below 0°C . Fractions with molecular weight below 4, 50–60 and above 150 kDa were obtained by gel chromatography. Phase transitions were recorded by low temperature differential scanning calorimetry. It was shown that temperatures of phase transitions and character of their manifestation in fractions of placental extracts did not change during their storage for 6 months both at -20 and -196°C . The changes of molecule-to-molecule interactions in environment of extract fractions supplemented with cell suspensions result in the increase of inversion temperature by 4–9 degrees and reduction of eutectics melting temperature by 4–6 degrees, as well as to a significant decrease of intensity of their peaks. Moreover, melting temperatures of entire system remained unchanged within the ranges of the experimental error. There was also found the reduction of inversion peaks intensity in 2–5 times and eutectic melting peak in 7–15 times in mixtures of the fractions and cell suspensions, depending on the cell type and conditions of placenta storage. It has been shown that placenta low-temperature storage did not affect the phase transition temperatures in the mixtures, containing suspensions of erythrocytes or *S. cerevisiae* and the fractions of extracts derived from this placenta.

Key words: low temperature phase transitions, differential scanning calorimetry, placenta, extract, fractions, erythrocytes, *Saccharomyces cerevisiae*.

¹Отдел криобиофизики, Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

²Харьковская медицинская академия последипломного образования

*Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:
ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015;
тел.: (+38 057) 373-31-41, факс: (+38 057) 373-30-84,
электронная почта: alexazin@mail.ru

Поступила 18.02.2014
Принята в печать 16.09.2014

Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2015. – Т. 25, №2. – С. 122–130.
© 2015 Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины

¹Department of Cryobiophysics, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

²Kharkiv Medical Academy of Postgraduate Education, Kharkiv, Ukraine

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

Received February, 18, 2014
Accepted September, 16, 2014

Probl. Cryobiol. Cryomed. 2015. 25(2): 122–130.
© 2015 Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

Низкотемпературное хранение плаценты и ее препаратов, обладающих высокой биологической активностью, применяется для последующего использования в медицинской практике [5, 8, 9].

В настоящее время длительное хранение биологических объектов проводится в холодильниках при $-20...-80^{\circ}\text{C}$, и в жидком азоте (-196°C). Однако такие процессы, как кристаллизация, рекристаллизация, плавление, сопровождающие охлаждение до низких температур и последующий нагрев биологических систем, могут вызывать в них структурно-функциональные изменения. В связи с этим важным является изучение влияния хранения плаценты при разных температурах и выделенных из нее фракций на фазовые переходы в клеточных суспензиях. С помощью анализа характера проявления фазовых переходов можно получить данные о межмолекулярных взаимодействиях в системе и об образовании комплексов между ее компонентами [1].

Эритроциты являются удобной и адекватной моделью для биофизических исследований [3]. Дрожжевые клетки *Saccharomyces cerevisiae* имеют более сложное строение и интересны как модельный объект.

Цель работы – исследование влияния хранения плаценты при -20 и -196°C на низкотемпературные фазовые переходы во фракциях с м. м. меньше 4, 50–60 и больше 150 кДа из экстрактов плаценты, а также в суспензиях эритроцитов и *S. cerevisiae* с добавлением изучаемых фракций методом дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК).

Материалы и методы

Плаценту получали от здоровых рожениц с их информированного согласия. Экстракты выделяли из плаценты, прошедшей тестирование на наличие вирусных инфекций и хранившейся в морозильной камере при -20°C или в жидком азоте (-196°C) в течение 6 месяцев. После хранения ткань размораживали при комнатной температуре, отмывали в 6-кратном объеме физиологического раствора и получали водно-солевые экстракты [3]. Фракции экстрактов выделяли методом гель-хроматографии на колонке 27×1 см («Sigma», США) с использованием сефадекса «G-100» («Loba Feinchemie», Австрия). Для калибровки колонки использовали голубой декстран с м. м. 2000 кДа («Sigma», США), глюкозооксидазу с м. м. 180 кДа («Faizyme», ЮАР), сывороточный альбумин быка с м. м. 64 кДа («Sigma») и цитохром С с м. м. 12 кДа («Sigma»). Получали три типа фракций с м. м. меньше 4, 50–60 и больше 150 кДа.

Кровь на консерванте «Глюгидир» («Биофарма», Украина) получали от здоровых доноров на Харь-

Low temperature storage of placenta and its products having a high biological activity has been used for later application in medical practice [2, 5, 7].

Nowadays, long-term storage of biological objects has been carried out in refrigerators both at $-20...-80^{\circ}\text{C}$ and liquid nitrogen (-196°C). However, the processes such as crystallization, recrystallization, melting, accompanying cooling down to low temperatures and the following heating of biological systems, can cause structural and functional changes in them. Herewith it is important to study the effect of placental storage at different temperatures and its isolated fractions on phase transitions in cell suspensions. By analyzing the character of phase transition manifestation we can obtain the data on molecule-to-molecule interactions in the system and on formation of complexes between its components [9].

Erythrocytes are convenient and adequate model for biophysical studies [3]. Yeast *Saccharomyces cerevisiae* cells have a more complicated structure and are of interest as a model object.

The research aim was to study by differential scanning calorimetry (DSC) the effect of placental storage at -20 and -196°C on low temperature phase transitions in the fractions with molecular weight below 4, 50–60 and above 150 kDa from placental extracts as well as in erythrocyte and *S. cerevisiae* suspensions supplemented with fractions.

Materials and methods

Placentas were obtained from healthy women after their informed consent. The extracts were isolated from the placenta tested for viral infections and stored in a freezer at -20°C or in liquid nitrogen (-196°C) for 6 months. Following storage the tissue was thawed at room temperature, washed with 6-fold volume of physiological solution and aqueous-saline extracts were obtained [3]. Fractions of extracts were isolated by gel chromatography with Sephadex G-100 (Loba Feinchemie, Austria) in 27×1 cm column (Sigma, USA). To calibrate the column we used blue dextran of 2000 kDa molecular weight (Sigma, USA), glucose oxidase of 180 kDa (Faizyme, South Africa), bovine serum albumin of 64 kDa (Sigma, USA), and cytochrome C of 12 kDa (Sigma, USA). Three types of fractions were obtained with molecular weight below 4, 50–60 and above 150 kDa.

Blood was derived from healthy donors at Kharkiv regional blood transfusion station using Glugycir preservative (Biofarma, Ukraine). The erythrocytes were thrice washed with 155 mM Na-phosphate buffered saline pH 7.4 (150 mM NaCl, 5 mM Na-phosphate buffer) by centrifugation for 5 min at 800g. *S. cerevisiae* yeasts were grown on Sabouraud's medium slope for 48 hrs at 30°C , then the grown cultures were



ковской областной станции переливания крови. Эритроциты трижды отмывали 155 мМ Na-фосфатным солевым буфером рН 7,4 (150 мМ NaCl + 5 мМ Na-фосфатного буфера) с центрифугированием в течение 5 мин при 800g. Дрожжи *S. cerevisiae* выращивали на скошенной агаризованной среде Сабуро в течение 48 ч при температуре 30°C, затем выращенные культуры смывали физиологическим раствором. Концентрация клеток в образце составляла 10⁹ КОЕ/мл. Клеточные суспензии смешивали с фракциями экстрактов плаценты в соотношении 1:1.

Исследования фазовых переходов проводили на дифференциальном сканирующем калориметре, разработанном в ИПКиК НАН Украины [1]. Данный прибор согласно классификации Уэндландта можно отнести к приборам типа ДСК (ДТА) [6].

Образцы массой 1 г помещали в тонкостенный стакан из нержавеющей стали с толщиной стенок 0,1 мм, закрывали крышкой и охлаждали погружением в жидкий азот. Средняя скорость охлаждения при этом составляла 200 град/мин. Температуру фазовых переходов определяли с помощью термограмм, полученных при нагреве со скоростью 0,5 град/мин в диапазоне –150...0°C. Интерпретацию термограмм проводили по методике, описанной в работах А.В. Зинченко и соавт. [1, 2].

Экспериментальные данные представляли на рисунках и в таблице в виде среднего значения ± стандартное отклонение. Статистическую значимость различий между показателями определяли с использованием критерия Стьюдента (*t*). Статистически значимыми считали отличия между парными выборками при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

На ДСК-термограммах фракций с м. м. меньше 4, 50–60 и больше 150 кДа из экстракта плаценты человека (ЭПЧ) и после ее предварительного хранения при –20 и –196°C (рис. 1, таблица) был зарегистрирован один экзотермический и два эндотермических эффекта:

1 – узкий экзотермический пик в зависимости от молекулярной массы фракции и температуры хранения имеет значения температуры от –84,5 до –86,7°C. Вероятно, он отображает инверсию молекул, которые имеют углерод-углеродные связи. Данный эффект связывают с процессом изомеризации и для его обозначения используют термин «обращение конфигурации» [4, 7]. Этот переход отражает изменение конформации молекул и соответственно может вызывать их функциональные изменения;

2 – узкий интенсивный эндотермический пик, температура которого в зависимости от моле-

washed with physiological solution. Cell concentration in the sample made 10⁹ CFU/ml. Cell suspensions were mixed with placental extract fractions in 1:1 ratio.

Phase transitions were studied with differential scanning calorimeter, designed at IPC&C of the National Academy of Sciences of Ukraine [9]. This device according to Wendlandt's classification can be referred to the apparatuses of DSC type (DTA) [8].

The samples of 1 g were placed into thin-wall stainless jar with 0.1 mm wall width, covered and cooled by plunging into liquid nitrogen. Average cooling rate was 200 deg/min. Temperature of phase transitions was determined on the base of thermograms obtained when heating with the rate of 0.5 deg/min within the temperature range of –150...0°C. Thermograms were interpreted according to the method described previously by A.V. Zinchenko *et al.* [9, 10].

The experimental data were presented in figures and table as a mean value ± standard deviation. Statistical significance of differences between indices was determined by Student's criterion (*t*). The differences between paired samples were considered as statistically significant at $p < 0.05$.

Results and discussion

In DCS thermograms of the fractions with molecular weight below 4, 50–60 and above 150 kDa from human placental extract (HPE) and after its pre-storage at –20 and –196°C (Fig. 1, Table) one exothermic and two endothermic effects were recorded:

1 – narrow exothermic peak depending on molecular weight of fraction and temperature storage has temperature values from –84.5 down to –86.7°C. It likely represents the inversion of molecules possessing the carbon-carbon bonds. This effect is related to isomerization and defined in the literature as the 'configuration rotation' [4, 7]. This transition reflects a change in molecules conformation and, correspondingly, may cause their functional changes;

2 – narrow intensive endothermic peak, which temperature depending on molecular weight of fraction is within the range of –19.5...–21°C, corresponds to melting of eutectic compositions. In the studied samples the eutectic composition is a mechanical mixture of the solvent and solute crystals, in this case these are ice and NaCl crystals. The melting temperature of eutectics in fractions is somewhat higher than in aqueous solutions of NaCl (–21.2°C), that is probably due to the change of molecule-to-molecule interactions in system with biological components [10];

3 – ice melting in the system can be considered as the process, which is an inverse to water crystallization. In experimental curves there was observed the phase transition broadening on temperature due to change in concentration of dissolved substance when melting [9].



кулярной массы фракции находится в диапазоне $-19,5 \dots -21^\circ\text{C}$, соответствует плавлению эвтектических составов. В исследованных образцах эвтектический состав представляет собой механическую смесь кристаллов растворителя и растворенного вещества, в данном случае это кристаллы льда и NaCl. Температура плавления эвтектик во фракциях несколько выше, чем в водных растворах NaCl ($-21,2^\circ\text{C}$), что, вероятно, связано с изменением межмолекулярных взаимодействий в системе с биологическими компонентами [2];

3 – плавление льда в системе можно рассматривать как процесс, обратный процессу кристаллизации воды. На экспериментальных кривых наблюдается размывание фазового перехода по температуре вследствие изменения концентрации растворенного вещества при плавлении.

Численные значения температур фазовых переходов во фракциях экстрактов плаценты, их смесях с суспензиями эритроцитов и *S. cerevisiae* представлены в таблице. Следует отметить, что статистически значимых отличий между температурами фазовых переходов фракций экстрактов, полученных из свежеполученной плаценты и плаценты после хранения при -20 и -196°C в течение 6 месяцев, не установлено. Таким образом, калориметрическое изучение низкотемпературных переходов в отдельных фракциях ЭПЧ, полученных методом гель-хроматографии, показало, что положение и интенсивность пиков инверсии молекул, плавления эвтектических составов и плавления системы практически не зависит от того, были ли они выделены из свежеполученной или криоконсервированной плаценты. Это позволяет предположить, что состав исследуемых фракций значительно не отличается.

На термограммах суспензии эритроцитов (рис. 2, А) и *S. cerevisiae* (рис. 3, А) был зарегистрирован только эндотермический пик плавления системы. Несмотря на то, что клетки отмывали физиологическим раствором, плавление эвтектических составов зарегистрировано не было. Такое явление наблюдалось нами ранее [2] и может быть объяснено препятствующим действием биомолекул на процессы кристаллизации эвтектических составов при охлаждении образца. Вероятно, наличие клеток в замораживаемом образце приводит к такому же результату, как и присутствие протеинов. По-видимому, полученный результат объясняется наличием белков, входящих в состав клеток, и слабо зависит от природы клеток в суспензии.

Результаты сравнительного анализа теплоты, поглощаемой при плавлении эвтектических составов во фракциях экстрактов с м. м. меньше 4, 50–

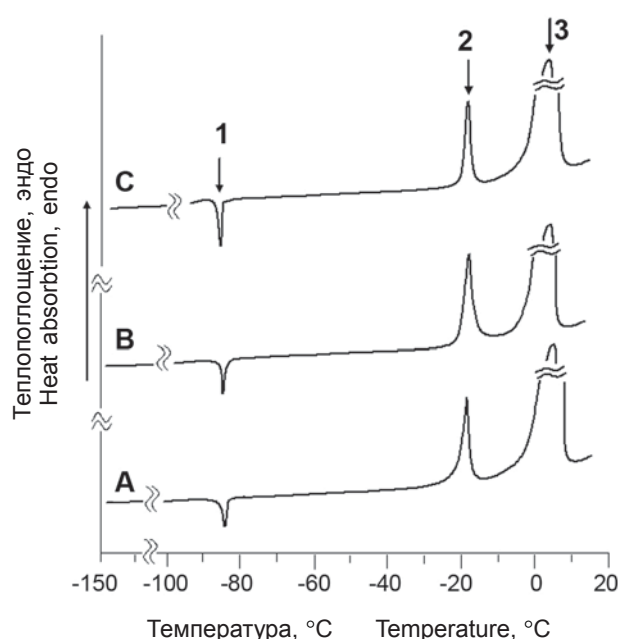


Рис. 1. ДСК-термограммы: **А** – фракция больше 150 кДа ЭПЧ, хранившейся при -196°C ; **В** – фракция 50–60 кДа ЭПЧ, хранившейся при -196°C ; **С** – фракция меньше 4 кДа ЭПЧ, хранившейся при -196°C .

Fig. 1. DSC-thermograms: **A** – fraction above 150 kDa of HPE, stored at -196°C ; **B** – fraction of 50–60 kDa of HPE, stored at -196°C ; **C** – fraction below 4 kDa of HPE, stored at -196°C .

Numerical temperature values of phase transitions in fractions of placental extracts and their mixtures with suspensions of erythrocytes and *S. cerevisiae* are presented in the Table. It should be noted that statistically significant differences between the temperatures of phase transitions of the extract fractions derived from fresh placenta and after storage at -20 and -196°C for 6 months were not established. Thus, calorimetric study of low temperature transitions in certain fractions of HPE obtained by gel chromatography showed that position and intensity of peaks of molecules inversion, melting of eutectic compositions and system melting almost did not depend on whether they were isolated either from fresh or cryopreserved placenta. This suggests that the composition of the studied fractions did not vary significantly.

In thermograms of erythrocyte suspensions (Fig. 2, A), and *S. cerevisiae* (Fig. 3, A) only endothermic melting peak was recorded. Whereas the cells were washed with physiological solution, no melting of eutectic compositions was found. This phenomenon has been observed by us previously [10] and can be explained by preventing action of biological macromolecules on crystallization of eutectic compositions when cooling the sample. Probably, the presence of cells in frozen sample leads to the same result as the presence of proteins. This outcome is evidently explained by the

Значения температур фазовых переходов во фракциях различных
молекулярных масс экстрактов плаценты и их смесей с суспензиями клеток
Temperature values of phase transitions in placental extract fractions with various
molecular weights and their mixtures with cell suspensions

Плацинта Placenta	М. м. фракции ЭПЧ, кДа Molecular weight of HPE fraction, kDa	Температура фазовых переходов, °C Temperature of phase transitions, °C								
		T_{inv}	T_{me}	T_m	T_{inv}	T_{me}	T_m	T_{inv}	T_{me}	T_m
		Фракции ЭПЧ HPE fractions			Фракции ЭПЧ + эритроцитарная масса (1:1) HPE fractions + erythrocyte concentrate (1:1)			Фракции ЭПЧ + <i>S. cerevisiae</i> (1:1) HPE fractions + <i>S. cerevisiae</i>		
Свежеполу- ченная Freshly- isolated	> 150	-86,7±1,3	-19,7±0,6	-0,6±0,2	-77,3±1,6*	-25,2±0,4*	-0,9±0,2	-79,6±0,8*	-25,4±0,3*	-1,0±0,3
	50–60	-86,5±0,8	-19,9±0,4	-0,7±0,1	-78,1±1,3*	-25,0±0,2*	-0,8±0,2	-80,1±1,1*	-25,5±0,4*	-0,7±0,2
	< 4	-85,9±1,1	-20,2±0,7	-0,5±0,2	-77,5±1,5*	-25,1±0,3*	-0,6±0,3	-79,7±0,9*	-25,3±0,2*	-0,9±0,2
Хранившаяся при -20°C Stored at -20°C	> 150	-86±0,7	-19,5±0,8	-0,5±0,3	-78,5±1,4*	-25,5±0,3*	-0,8±0,2	-80,4±0,9*	-24,9±0,4*	-0,8±0,2
	50–60	-86,5±0,9	-19,9±0,5	-0,6±0,3	-79±1,2*	-25,1±0,2*	-0,9±0,2	-79,5±0,8*	-25,3±0,3*	-0,8±0,2
	< 4	-84,5±1,2	-20,1±0,4	-0,7±0,1	-78,6±1,1*	-25,9±0,4*	-0,7±0,3	-80±0,9*	-25,1±0,4*	-0,9±0,2
Хранившаяся при -196°C Stored at -196°C	> 150	-86,1±0,8	-19,9±0,4	-0,9±0,3	-80,1±1,5*	-25,3±0,3*	-1,1±0,3	-78,5±0,9*	-25,4±0,3*	-0,7±0,2
	50–60	-85,5±0,9	-20,1±0,5	-0,6±0,2	-80±1,4*	-25,4±0,3*	-0,9±0,2	-80,5±1,0*	-25,5±0,4*	-0,9±0,2
	< 4	-85,2±1,2	-21±0,7	-0,5±0,3	-80,2±1,5*	-25,1±0,2*	-0,7±0,2	-81±1,2*	-24,8±0,4*	-0,6±0,3

Примечание: T_{inv} – температура инверсии; T_{me} – температура плавления эвтектических составов; T_m – температура плавления системы; * – отличия статистически значимы по сравнению с фракциями экстрактов без клеток, $p \leq 0,05$.

Notes: T_{inv} – inversion temperature; T_{me} – eutectics melting temperature; T_m – system melting temperature; * – the differences are statistically significant if compared with data for fractions not mixed with cell suspensions; $p \leq 0.05$.

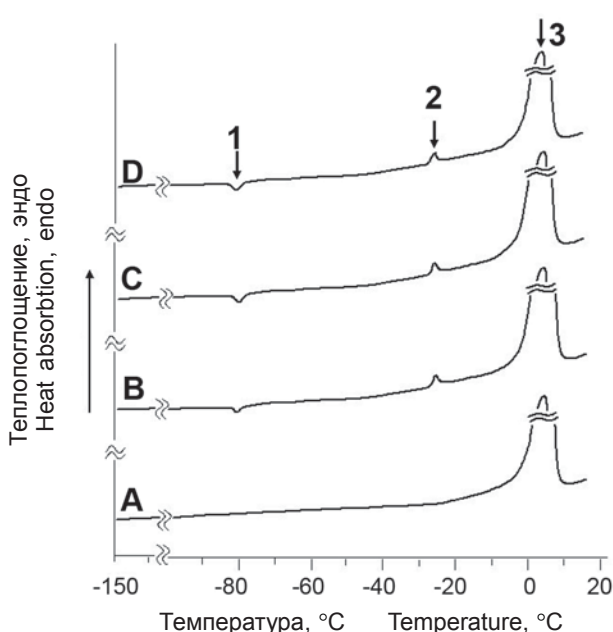


Рис. 2. ДСК-термограммы: А – суспензия эритроцитов; В – суспензия эритроцитов с фракцией больше 150 кДа ЭПЧ, хранившейся при -196°C; С – суспензия эритроцитов с фракцией 50–60 кДа ЭПЧ, хранившейся при -196°C; D – суспензия эритроцитов с фракцией меньше 4 кДа ЭПЧ, хранившейся при -196°C.

Fig. 2. DSC-thermograms: A – erythrocyte suspension; B – erythrocyte suspension with fraction above 150 kDa of HPE, stored at -196°C; C – erythrocyte suspension with fraction of 50–60 kDa of HPE, stored at -196°C; D – erythrocyte suspension with fraction below 4 kDa of HPE, stored at -196°C.

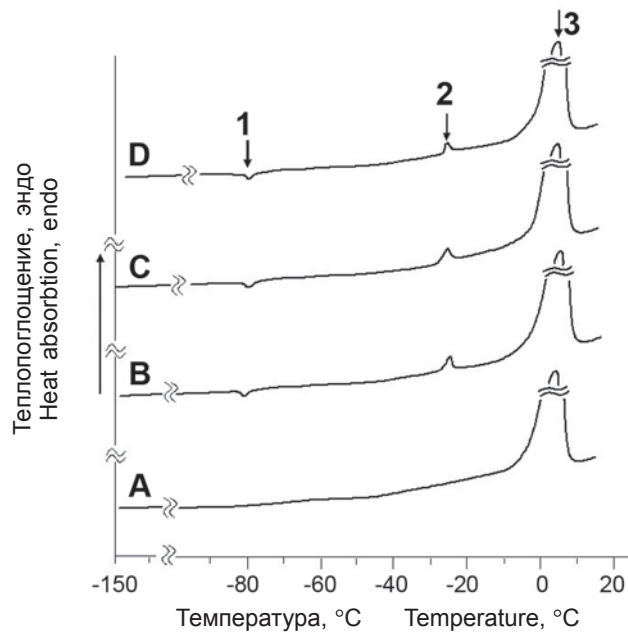


Рис. 3. ДСК-термограммы: А – суспензия *S. cerevisiae*; В – суспензия *S. cerevisiae* с фракцией больше 150 кДа ЭПЧ, хранившейся при -196°C; С – суспензия *S. cerevisiae* с фракцией 50–60 кДа ЭПЧ, хранившейся при -196°C; D – суспензия *S. cerevisiae* с фракцией меньше 4 кДа ЭПЧ, хранившейся при -196°C.

Fig. 3. DSC-thermograms: A – *S. cerevisiae* suspension; B – *S. cerevisiae* suspension with fraction above 150 kDa of HPE, stored at -196°C; C – *S. cerevisiae* suspension with fraction of 50–60 kDa of HPE, stored at -196°C; D – *S. cerevisiae* suspension with fraction below 4 kDa of HPE, stored at -196°C.



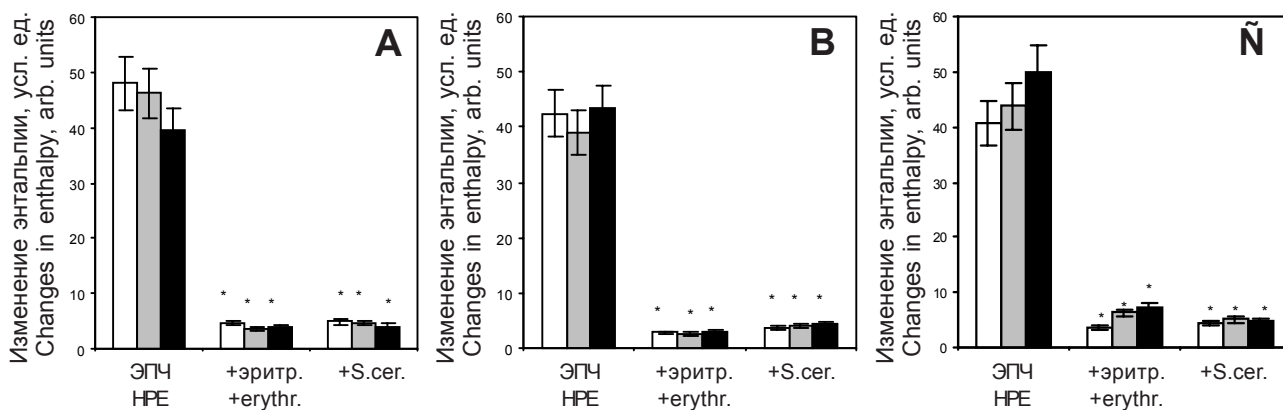


Рис. 4. Изменение энтальпии при плавлении эвтектик фракций ЭПЧ и клеточных суспензий: **А** – свежесыведенные фракции ЭПЧ; **В** – фракции экстрактов плаценты, хранившейся при -20°C ; **С** – фракции экстрактов плаценты, хранившейся при -196°C ; □ – фракция <4 кДа; ▒ – фракция 50–60 кДа; ■ – фракция >150 кДа; ЭПЧ – фракции экстрактов плаценты; +эритр. – суспензия эритроцитов с фракциями экстрактов плаценты; +S.cer. – суспензия *S. cerevisiae* с фракциями экстрактов плаценты; * – различия значимы по сравнению с фракциями экстрактов без клеток; $p < 0,05$.

Fig. 4. Changes in enthalpy during melting of eutectics in HPE fractions and cell suspensions: **A** – fresh HPE; **B** – extract fractions of placenta, stored at -20°C ; **C** – extract fractions of placenta, stored at -196°C ; □ – fraction <4 kDa; ▒ – fraction of 50–60 kDa; ■ – fraction >150 kDa; HPE – fractions of placenta extract; +erythr. – erythrocyte suspension with fractions of placenta extract; S.cer. – *S. cerevisiae* suspension with fractions of placenta extract; * – significance of differences if compared with extract fractions without cells; $p < 0.05$.

60 и больше 150 кДа представлены на рис. 4, А. Статистически значимых отличий изменения энтальпии при плавлении эвтектик различных образцов фракций зарегистрировано не было, однако при смешении фракций с суспензиями эритроцитов наблюдалось снижение этого показателя в 10–13 раз. Аналогичные результаты получены при смешении фракций с суспензиями *S. cerevisiae*. Как можно видеть на рис. 4, В, С, интенсивность плавления эвтектик фракций экстрактов отличается при изменении условий хранения плаценты, что может быть связано с изменением состава и свойств экстрактов плаценты, хранившейся при низких температурах. Так, О.А. Нардид и соавт. [3], С.Л. Розанова и соавт. [10] показали, что хранение плаценты более месяца при -20°C приводит к увеличению количества низкомолекулярных белков и трехвалентного гемового железа. Смешение фракций экстракта плаценты, хранившейся при -20 и -196°C , с суспензиями эритроцитов и *S. cerevisiae* вызывает снижение интенсивности пика плавления эвтектики в 7–15 раз в зависимости от типа клеток и условий хранения плаценты.

В работе также было проведено сравнение изменения энтальпии инверсии молекул во фракциях экстрактов различных молекулярных масс (рис. 5, А). Обнаружено, что с повышением молекулярной массы фракции уменьшается интенсивность пика инверсии и отличия для фракции экстракта с м. м. меньше 4 и больше 150 кДа сос-

presence of cell proteins, and slightly depends on the cell nature in suspension.

The results of comparative analysis of heat absorbed during melting of eutectic compositions in extract fractions with molecular weight below 4, 50–60 kDa and above 150 kDa are presented in Fig. 4, A. No statistically significant differences were found in changes of enthalpy during eutectic melting of different fractions of the samples, however if the fractions were mixed with erythrocyte suspensions a reduction of this index was observed in 10–13 times. Similar results were obtained when mixing the fractions with *S. cerevisiae* suspensions. Figs. 4B, C show that the eutectic melting intensity of extract fractions is different in case of altered placenta storage conditions that may be associated with the changes in composition and properties of placental extracts stored at low temperatures. For example, O.A. Nardid *et al.* [3], S.L. Rozanova *et al.* [6] have shown that placental storage longer than a month at -20°C increases a content of low molecular proteins and trivalent heme iron. Mixing the extract fractions from placenta stored at -20 and -196°C with the suspensions of erythrocytes and *S. cerevisiae* reduced the intensity of eutectic melting peak in 7–15 times depending on the cell type and placental storage conditions.

In the research we also compared the change in molecules inversion enthalpy in extract fractions of various molecular weights (Fig. 5A). It has been found that with increasing the molecular weight of fraction

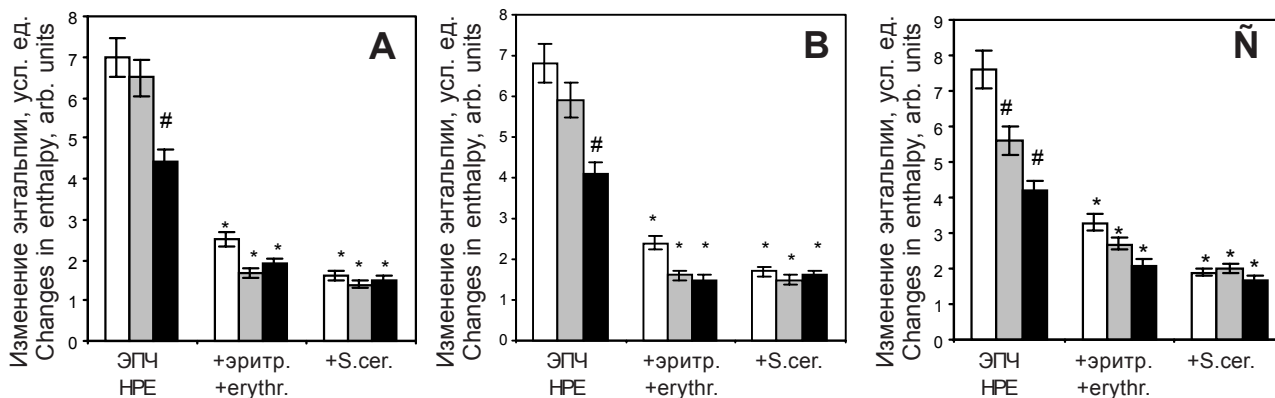


Рис. 5. Изменение энтальпии при инверсии молекул фракций ЭПЧ и клеточных суспензий: **А** – свежесыводенные фракции ЭПЧ; **В** – фракции экстрактов плаценты, хранившейся при -20°C ; **С** – фракции экстрактов плаценты, хранившейся при -196°C ; □ – фракция $<4\text{ кДа}$; ■ – фракция $50-60\text{ кДа}$; ■ – фракция $>150\text{ кДа}$; ЭПЧ – фракции экстрактов плаценты; +эритроц. – суспензия эритроцитов с фракциями экстрактов плаценты; +S.cer. – суспензия *S. cerevisiae* с фракциями экстрактов плаценты; * – различия значимы по сравнению с фракциями экстрактов без клеток; # – значимость отличий по сравнению с низкомолекулярной фракцией экстракта; $p < 0,05$.

Fig. 5. Changes in enthalpy at molecular inversion in HPE fractions and cell suspensions: **A** – fresh HPE; **B** – extract fractions of placenta, stored at -20°C ; **C** – extract fractions of placenta, stored at -196°C ; □ – fraction $<4\text{ kDa}$; ■ – fraction $50-60\text{ kDa}$; ■ – fraction $>150\text{ kDa}$; HPE – fractions of placenta extract; +erythr. – erythrocyte suspension with fractions of placenta extract; S.cer. – *S. cerevisiae* suspension with fractions of placenta extract; * – significance of differences if compared with extract fractions without cells; # – significance of differences if compared with low molecular extract fraction; $p < 0.05$.

тавляет 29%. При смешении фракций с суспензиями эритроцитов наблюдается снижение пика инверсии в 2–4 раза, а с суспензиями *S. cerevisiae* в 3–5 раз. После хранения плаценты при -20 и -196°C в течение 6 месяцев существенных изменений интенсивности пиков инверсии во фракциях экстрактов зарегистрировано не было (рис. 5, В, С).

Статистически значимое отличие интенсивности пиков инверсии низкомолекулярной фракции по сравнению с высокомолекулярной наблюдалось как для экстрактов из свежесполученной плаценты, так и для плаценты, хранившейся при -20 и -196°C (рис. 5). Данная закономерность сохранялась и при смешении фракций экстрактов с эритроцитами. Высоко- и средномолекулярная фракции характеризуются высокой концентрацией протеинов. В низкомолекулярной фракции значительную часть составляют пептиды, а концентрация их относительно невелика [3]. Тот факт, что именно в низкомолекулярной фракции инверсия протекает с выделением большего количества тепла по сравнению с высоко- и средномолекулярными фракциями, свидетельствует о том, что инверсия в большей степени характерна для молекул пептидной природы, имеющих значительно меньшую молекулярную массу.

Смешение фракций экстрактов плаценты, хранившейся при температурах при -20 и -196°C , (рис. 5, В, С) с суспензиями эритроцитов приводит

the inversion peak intensity decreases, and differences between the extract fractions with molecular weight below 4 and that of above 150 kDa made 29%. After mixing the fractions with erythrocytes suspensions we observed the decrease of peak inversion in 2...4 times, and in case of *S. cerevisiae* it was reduced in 3–5 times. After placenta storage at -20 and -196°C during 6 months no significant changes in intensity of inversion peaks in extracts' fractions were found (Fig. 5B, C).

Statistically significant difference of inversion peaks intensity between low molecular and high molecular fractions was observed both for extracts of fresh placenta and the tissue stored at -20 and -196°C (Fig. 5). This regularity was kept following mixing the extract fractions with erythrocytes. Fractions with 50–60 and above 150 kDa were characterized by a high concentration of proteins. Peptides comprise a large part in low molecular fraction, and their concentration is relatively low [3]. The fact that exactly in the low molecular fraction the inversion occurs with a release of large amount of heat as compared with high and medium molecular fractions indicates that the inversion is more typical for molecules of peptide nature possessing significantly lower molecular weight.

Mixing the fractions of placental extracts stored at -20 and -196°C (Fig. 5B, C) with erythrocyte suspensions reduces the peak inversion intensity in 2–4 times. Similar changes were recorded when mixing the fractions with *S. cerevisiae* suspensions. There can be



к уменьшению интенсивности пиков инверсии в 2–4 раза. Аналогичные изменения зарегистрированы и при смешении фракций с суспензиями *S. cerevisiae*. Можно отметить более существенное снижение пика плавления эвтектик (в 7–15 раз) по сравнению со снижением пика инверсии молекул (в 2–5 раз) при смешении фракций экстрактов с суспензиями клеток. Таким образом, присутствие клеток в образце в большей степени влияет на процесс развития эвтектических составов.

Присутствие клеток во фракциях экстрактов влияет не только на интенсивность пиков инверсии и плавления эвтектических составов, но и на температуру развития этих процессов. При смешении фракций экстрактов и суспензий клеток значения температуры инверсии повышаются на 4...9°C, а плавления эвтектики снижаются на 4...6°C в зависимости от типа клеток и условий хранения плаценты (таблица). Значения температуры плавления всей системы остаются неизменными в границах погрешности эксперимента. Такие отличия, относительно влияния клеток на зарегистрированные фазовые переходы свидетельствуют о разной природе процессов, происходящих при их развитии. Можно предположить, что связывание части молекул, принимающих участие в инверсии, с клеточными мембранами препятствует развитию этого процесса и таким образом снижает интенсивность и повышает температуру инверсии. Изменения межмолекулярных взаимодействий в системах в присутствии клеток приводят к тому, что большинство молекул не принимает участие в образовании эвтектических составов, а на термограммах регистрируется слабый эндотермический пик плавления эвтектики.

Выводы

Сравнительный анализ результатов исследования фазовых переходов показал, что добавление во фракции экстрактов плаценты клеточных суспензий приводит к повышению температуры инверсии на 4...9°C и снижению температуры плавления эвтектики на 4...6°C. Установленное снижение интенсивности пиков инверсии в 2–5 раз и пика плавления эвтектики в 7–15 раз обусловлено изменением межмолекулярных взаимодействий в результате конкуренции между активными центрами органических молекул за присоединение молекул воды и молекул фракций с клетками.

Показано, что хранение плаценты при –20 и –196°C в течение 6 месяцев не влияет на температуры фазовых переходов как во фракциях экстрактов, полученных из этой плаценты, так и в смесях, которые содержат указанные фракции и суспензии эритроцитов или *S. cerevisiae*.

noted more significant reduction in eutectic melting peak if compared with a decrease in molecular peak inversion when mixed the fractions of extracts with cell suspension. Thus, the presence of cells in the sample to a greater extent affects eutectic compositions development.

The presence of cells in the samples affected not only the inversion peak intensity and melting the eutectic compositions, but the temperature of these processes development as well. In the mixtures of cell suspensions and extract fractions the values of inversion temperature rised up to 4...9°C, and in case of eutectic melting these decreased down to 4...6°C (Table). The values of melting temperature of entire system remain unchanged within the ranges of experimental error. Such differences relative to cell effect on recorded phase transitions testify to significant differences in the nature of processes occurring during their development. It can be assumed that the binding of several inversion involved molecules with cell membranes prevents the development of the process and therefore reduces the intensity and increases the temperature of inversion. The changes of molecule-to-molecule interactions in the systems with cells lead to the fact that most of molecules do not take part in the formation of eutectic compositions and the thermograms contain only weak endothermic peak of eutectic melting.

Conclusions

Comparative analysis of studied phase transitions showed that supplementing the placental extract fractions to the cell suspensions led to increase of inversion temperature by 4...9°C and decrease of eutectic melting temperature by 4...6°C. The established reduction of inversion peaks intensity in 2–5 times and eutectic melting peak in 7–15 times is caused by the changes in molecule-to-molecule interactions as a result of competition between the active sites of organic molecules for binding water molecules and molecules of fractions with cells.

It has been shown that storage of placenta at –20 and –196°C for 6 months did not affect the temperatures of phase transitions both in the fractions of the placenta extracts and in the mixtures, containing the fractions and erythrocyte or *S. cerevisiae* suspensions.

References

1. Bethlem H.L., Kajita M., Sartakov B. et al. Prospects for precision measurements on ammonia molecules in a fountain. *Eur Phys J Special Topics* 2008; 163: 55–69.
2. Debashree D., Piyali D.C., Debasish B. Analysis of free and bound NADPH in aqueous extract of human placenta used as wound healer. *J Chromatogr B*. 2009; 877: 2435–2442.



Литература

1. Зинченко А.В. Исследование фазовых переходов и физических состояний водных растворов многоатомных спиртов в диапазоне температур $-150^{\circ}\text{C} \dots 0^{\circ}\text{C}$: Автореф. дис. ... канд. физ.-мат. наук. – К., 1983. – 20 с.
2. Зинченко А.В., Боброва Е.Н., Щетинский М.И., Говорова Ю.С. Влияние автоклавированных экстрактов плаценты человека на фазовое поведение суспензий клеток при температуре ниже 0°C // Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2013. – Т. 23, №1. – С. 40–48.
3. Нардід О.А., Розанова К.Д., Черкашина Я.О. та ін. Вплив зберігання тканини плаценти при -20°C на властивості її водно-сольових екстрактів // Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2014. – Т. 24, №1. – С. 28–37.
4. Потапов В.М. Стереохимия. – М.: Химия. – 1988. – 463 с.
5. Строна В.І., Юрченко Т.М. Вміст біологічно активних сполук в тканині і кріоекстракті плаценти // Теор. и практ. аспекты совр. криобиологии: Материалы междунар. заоч. науч.-практ. конференции. – Сыктывкар, 2014. – С. 233–237.
6. Уэндладт У. Термические методы анализа. – М.: Мир, 1978. – 526 с.
7. Bethlem H.L., Kajita M., Sartakov B. et al. Prospects for precision measurements on ammonia molecules in a fountain // Eur. Phys. J. Special Topics. – 2008. – Vol. 163. – P. 55–69.
8. Debashree D., Piyali D.C., Debasish B. Analysis of free and bound NADPH in aqueous extract of human placenta used as wound healer // J. Chromatogr. B. – 2009. – Vol. 877. – P. 2435–2442.
9. Rahul G., Dhruvajyoti Ch. Glutamate is the chemotaxis-inducing factor in placental extracts // Amino Acids. – 2009. – Vol. 37. – P. 359–366.
10. Rozanova S., Cherkashina Y., Repina S. et al. Protective effect of placenta extracts against nitrite-induced oxidative stress in human erythrocytes // J. Cellular & Molecular Biology Letters. – 2012. – Vol. 17, №2. – P. 240–248.
3. Nardid O.A., Rozanova K.D., Cherkashina Ya.O. et. al. Effect of storage of placenta tissue at -20°C on properties of its aqueous and saline extracts. Problems of Cryobiology and Cryomedicine 2014; (1): 28–37.
4. Potapov V.M. Stereochemistry. Moscow: Khimiya; 1988.
5. Rahul G., Dhruvajyoti Ch. Glutamate is the chemotaxis-inducing factor in placental extracts. Amino Acids 2009; 37: 359–366.
6. Rozanova S., Cherkashina Y., Repina S. et al. Protective effect of placenta extracts against nitrite-induced oxidative stress in human erythrocytes. J. Cellular & Molecular Biology Letters 2012; 17(2): 240–248.
7. Strona V.I., Yurchenko T.M. Content of biologically active compounds in tissue and placental cryoextract. Theoretical and Practical Aspects of Modern Cryobiology. Proceedings of the International Scientific-Practical Conference; Syktyvkar; 2014; p. 233–237.
8. Wendlandt W.W. Thermal methods of analysis. Moscow: Mir; 1978.
9. Zinchenko A.V. Study of phase transitions and physical states of polyatomic alcohols water mixtures at $-150^{\circ}\text{C} \dots 0^{\circ}\text{C}$ temperature range. [dissertation]. Kiev; 1983.
10. Zinchenko A.V., Bobrova E.N., Schetinsky M.I. Govorova Yu.S. Influence of autoclaved placenta extracts on phase behavior of cell suspensions below 0°C . Problems of Cryobiology and Cryomedicine 2013; (1): 40–48.

