

doi: <https://doi.org/10.15407/dopovidi2018.07.082>

УДК 615.361:615.451.1:618.46]:57.086.13:612.111.45.014.43

**О.М. Боброва, Ю.С. Говорова, О.А. Нардід,
С.В. Рєпіна, С.В. Нарожний, С.В. Покришко**

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків

E-mail: helen.bobrova.77@gmail.com

Вплив екстрактів плаценти людини на термогемоліз еритроцитів

Представлено академіком НАН України А.М. Гольцевим

Досліджено вплив заморожування екстрактів плаценти людини на їх здатність знижувати термогемоліз еритроцитів. Показано, що заморожування екстрактів плаценти до -20 та -196 °С з подальшим відігрівом не спричиняє достовірної зміни їх ефективності щодо стабілізації мембран еритроцитів при температурному впливі. Виявлено фракції екстрактів плаценти, що найбільш ефективно знижують рівень термогемолізу еритроцитів: менш 4 кДа і 12–20 кДа. Процент інгібування термогемолізу для них становить $(31,7 \pm 3,3) \%$ і $(31,5 \pm 3,2) \%$ відповідно.

Ключові слова: екстракт плаценти, фракції, заморожування, термогемоліз еритроцитів, протизапальна ефективність.

Відомо, що тканини плаценти містять велику кількість біологічно активних речовин, які забезпечують ріст та розвиток плоду. Область застосування цих речовин досить широка, оскільки вони мають здатність корегувати імунологічні і гормональні показники, підвищувати стійкість організму до дії несприятливих і алергізуючих факторів [1]. Біологічно активні речовини плаценти в практичній медицині часто застосовують у вигляді екстрактів [2, 3].

Для оцінки протизапальної дії екстрактів біологічних тканин рослинного та тваринного походження останнім часом часто використовують властивість таких речовин знижувати температурно-індукований гемоліз еритроцитів [4–6].

У роботах [7, 8] показано, що попередня обробка еритроцитів препаратом екстракту плаценти людини (ЕПЛ) інгібує термогемоліз еритроцитів, і цей процес має дозову залежність. Результати, отримані авторами, свідчать про стабілізуючу дію екстракту плаценти на мембрани. Показано взаємозв'язок досліджених параметрів з протизапальною дією екстрактів на рівні організму. Сучасні дослідження спрямовані на з'ясування, які саме компоненти ЕПЛ спричиняють ту чи іншу дію [9].

Для застосування екстрактів плаценти в клінічній практиці необхідно мати достатню кількість препарату в певний час. Це потребує завчасної заготівлі і довготривалого зберігання ЕПЛ. Зараз зберігання біологічних об'єктів проводиться як у низькотемпературних холодильниках при $-20 \div -80$ °С, так і у рідкому азоті при -196 °С. При цьому в процесі

охолодження розчинів, що містять екстракти, під час фазового переходу води до твердого стану можуть змінюватися рН, іонна сила, склад та діелектрична стала рідкого середовища, яке залишилося. Це зумовлює зміну гідрофобних взаємодій і водневих зв'язків у біомакромолекул екстрактів з порушенням, зокрема, їх четвертинної та третинної конформації, що може призводити до зниження біологічної активності екстрактів. Тому важливим є дослідити вплив заморожування ЕПЛ на його біологічну активність і, зокрема, протизапальну дію.

Ми ставили за мету дослідити вплив заморожування ЕПЛ на здатність екстрактів та їх окремих фракцій знижувати термогемоліз еритроцитів.

Матеріали і методи. Для приготування ЕПЛ до відмитих шматочків плаценти додавали фізіологічний розчин у об'ємному співвідношенні 1 : 1 та гомогенізували на високошвидкісному гомогенізаторі РТ–1 У4.2 (“Одеський експериментальний завод лабораторної медичної техніки”, Україна) протягом 3 хв. Гомогенати витримували впродовж 12 год при 4 °С, центрифугували при 1500 g протягом 25 хв. Надосадову рідину пропускали через мембранний фільтр 0,45 мкм (“Millipore Corp. Carrigtwohill”, Ірландія). Отримані ЕПЛ заморожували до –196 °С (зануренням у рідкий азот) або до –20 °С (у морозильній камері). Відігрів здійснювали на водяній бані при 37 °С. Окремі фракції екстрактів одержували методом гель-хроматографії з використанням сефадексу G–100 (“Loba Feinchemie”, Австрія).

Для дослідження термогемолізу відмиті від плазми та формених елементів крові еритроцити донорської крові людини (чоловіча II+) ресуспендували рівним об'ємом фізіологічного розчину (рН 7,4), додавали до них цільний ЕПЛ або його фракції (1:1). Після інкубування протягом 1 год еритроцити відмивали від ЕПЛ та фракцій, ресуспендували і піддавали гіпертермії (20 хв у регульованому водному термостаті при 55 °С) [9]. Гемоліз оцінювали за виходом гемоглобіну шляхом вимірювання оптичної щільності в надосаді при 540 нм на спектрофотометрі “Pye Unicam SP 8000” і виражали у відсотках відносно 100 % гемолізованих клітин. Процент інгібування гемолізу екстрактами плаценти розраховували як описано в [4].

Результати і їх обговорення. Після інкубації суспензії еритроцитів при 55 °С протягом 20 хв гемоліз в суспензії контрольних еритроцитів становить (65,7 ± 3,9) %. Попереднє інкубування еритроцитів з ЕПЛ спричиняє зниження рівня термогемолізу до (53,4 ± ± 3,2) %. У варіанті заморожування ЕПЛ як до –196 °С, так і до –20 °С з подальшим відігрівом достовірних відмінностей між показниками рівня термогемолізу еритроцитів не виявлено (таблиця).

Рівень термогемолізу еритроцитів, попередньо оброблених цільним ЕПЛ та окремими фракціями ЕПЛ

Температура заморожування ЕПЛ	Гемоліз, %					
	ЕПЛ	Фракції ЕПЛ, кДа				
		<4	6–7	12–20	55–75	>150
Свіжоотриманий –196 °С –20 °С	53,4 ± 3,2 *	44,9 ± 2,7 *	58,3 ± 3,5	45 ± 2,7 *	60,75 ± 3,7	64,5 ± 3,9
	53,7 ± 3,2 *	47,9 ± 2,9 *	60,1 ± 3,6	48,1 ± 2,9 *	59,5 ± 3,6	65,8 ± 4,0
	54,9 ± 3,3 *	48,5 ± 3,0 *	59,7 ± 3,7	45,3 ± 2,8 *	59,7 ± 3,7	66,9 ± 4,1

* Статистично значуща різниця відносно контролю, $p < 0,05$ ($n = 6$).

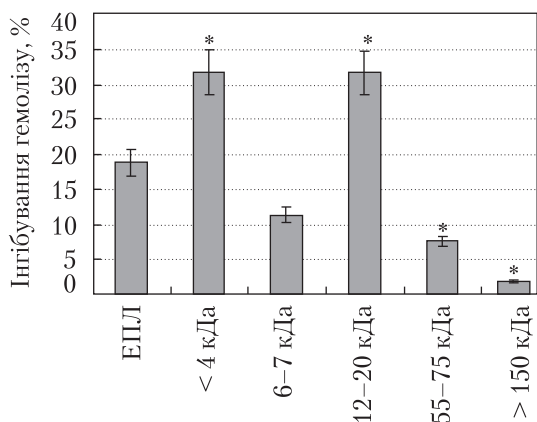


Рис. 1. Процент інгібування термогемолізу еритроцитів фракціями ЕПЛ зі свіжоотриманої плаценти. Тут і на рис. 2, 3 * – статистично значуща різниця відносно цільного ЕПЛ, $p < 0,05$ ($n = 6$)

Порівнюючи дію фракцій ЕПЛ, відзначимо, що у разі попереднього інкубування еритроцитів з низькомолекулярною фракцією (<4 кДа) і фракцією 12–20 кДа рівень термогемолізу достовірно знижується відносно контролю. Зниження термогемолізу спостерігається також після обробки еритроцитів фракціями 6–7 і 55–75 кДа. Найвищий рівень гемолізу відмічено після обробки еритроцитів високомолекулярною фракцією (>150 кДа). Заморожування ЕПЛ не призводить до втрати властивостей фракцій щодо зниження термогемолізу еритроцитів.

Згідно з даними літератури щодо оцінки здатності екстрактів біологічних тканин знижувати термогемоліз еритроцитів, результати досліджень для більшої наочності виражають у вигляді процента інгібування гемолізу [4, 5]. За результатами розрахунку цього параметра для ЕПЛ та його фракцій (рис. 1) встановлено, що всі фракції ЕПЛ мають здатність інгібувати термогемоліз еритроцитів, за винятком фракції >150 кДа, ефективність якої дуже низька. Достовірно вища порівняно з ЕПЛ ефективність фракцій <4 кДа і 12–20 кДа. З підвищенням молекулярної маси фракцій знижується їх здатність інгібувати термогемоліз. Достовірно нижчий порівняно з ЕПЛ процент інгібування гемолізу у фракцій 55–75 кДа та >150 кДа. Нижча, ніж у ЕПЛ, ефективність спостерігається також для фракції 6–7 кДа.

Показано, що здатність пригнічувати температурно-індукований гемоліз еритроцитів є мірою протизапальної ефективності ЕПЛ [7, 8]. Запалення – це складна біологічна реакція тканин до шкідливих подразників, захисний механізм організму для видалення шкідливих чинників і ініціювання процесу загоєння. Але деякі прояви запалення мають занадто виражений характер і важливим елементом терапії є зменшення інтенсивності запальної реакції організму. Медіатори запалення викликають підвищену проникність мембран клітин [10]. Виявлене у роботі зниження термогемолізу еритроцитів як у разі дії цільного ЕПЛ, так і його фракцій різних молекулярних мас свідчить про їх здатність стабілізувати мембрани еритроцитів, зокрема до впливу високих температур (вищих за +50 °С), що може сприяти запобіганню витоку білків і рідин у тканини протягом періоду запалення, який характеризується підвищеною проникністю мембран. Підвищена проникність мембрани еритроцитів може бути наслідком конфігураційних змін біомакромолекул мембрани під дією температури, що обумовлює термогемоліз еритроцитів у популяції, а саме передденатураційну перебудову аніонного каналу мембрани еритроцитів [11]. Той факт, що після заморожування ЕПЛ як до –196 °С, так і до –20 °С з подальшим відігріванням зберігається його здатність стабілізувати мембрану, свідчить про збереження протизапальних властивостей після низькотемпературної обробки екстракту.

Відмінності в ефективності фракцій ЕПЛ різних молекулярних мас можуть пояснювати їх різною здатністю модифікувати мембрани еритроцитів і виявляти стабілізуючу дію.

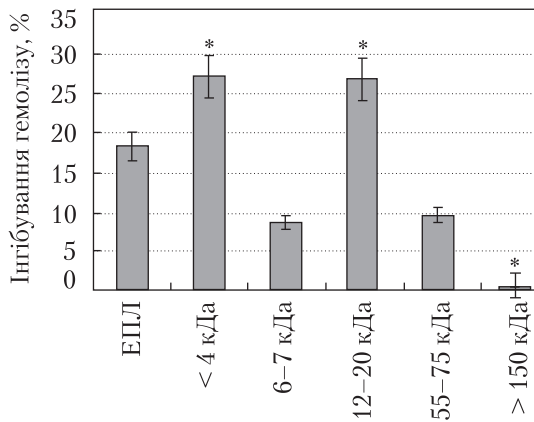


Рис. 2. Процент інгібування термогемолізу еритроцитів фракціями попередньо замороженого до $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ і відігрітого ЕПЛ

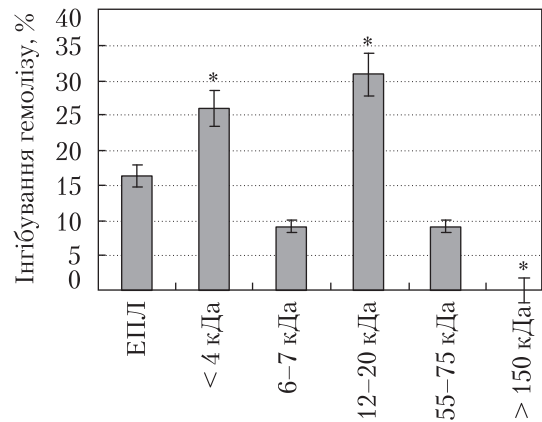


Рис. 3. Процент інгібування термогемолізу еритроцитів фракціями попередньо замороженого до $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ і відігрітого ЕПЛ

Після заморожування ЕПЛ найбільш ефективно інгібують термогемоліз еритроцитів фракції <4 і $15-20$ кДа (рис. 2, 3), як і свіжоотриманий ЕПЛ. Цей факт свідчить про те, що ЕПЛ і отримані з нього фракції після заморожування зберігають здатність модифікувати мембрани еритроцитів таким чином, що це сприяє підвищенню терморезистентності еритроцитів.

Отже, у результаті попередньої обробки еритроцитів цільним ЕПЛ інгібування термогемолізу становить $(18,7 \pm 1,9)\%$. Фракції, отримані з ЕПЛ, зберігають здатність інгібувати термогемоліз еритроцитів. Найбільш ефективно підвищують терморезистентність еритроцитів фракції ЕПЛ з молекулярною масою <4 кДа (інгібування термогемолізу становить $(31,7 \pm 3,3)\%$) і $12-20$ кДа ($(31,5 \pm 3,2)\%$ інгібування гемолізу). Найнижчу ефективність мають високомолекулярні фракції. Показано, що заморожування ЕПЛ до $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ і $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ з подальшим відігрівом не спричиняє втрати його здатності інгібувати термогемоліз еритроцитів, що свідчить про збереження протизапальних властивостей ЕПЛ.

ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Плацента: криоконсервирование, структура, свойства, перспективы клинического применения: Грищенко В.И., Юрченко Т.Н. (ред.). Харьков, 2011. 292 с.
2. Tiwary S.K., Shukla D., Tripathi A.K., Agrawal S., Singh M.K., Shukla V.K. Effect of placental-extract gel and cream on healing wounds. *J. Wound Care*. 2006. **15**, № 7. P. 325–328. doi: <https://doi.org/10.12968/jowc.2006.15.7.26937>
3. De D., Chakraborty P.D., Bhattacharyya D. Regulation of trypsin activity by peptide fraction of aqueous extract of human placenta used as wound healer. *J. Cell. Physiol*. 2011. **226**, № 8. P. 2033–2040. doi: <https://doi.org/10.1002/jcp.22535>
4. Bhadoriya S.S., Mishra V., Raut S., Ganeshpurkar A., Jain S.K. Anti-Inflammatory and antinociceptive activities of a hydroethanolic extract of tamarindus indica leaves. *Sci. Pharm*. 2012. **80**, № 3. P. 685–700. doi: <https://doi.org/10.3797/scipharm.1110-09>
5. Okoli C.O., Akah P.A., Onuoha N.J., Okoye Th.C., Nwoye A.C., Nworu Ch.S. Acanthus montanus: An experimental evaluation of the antimicrobial, anti-inflammatory and immunological properties of a traditional remedy for furuncles. *BMC Compl. Alternative Med*. 2008. **8**: 27. doi: <https://doi.org/10.1186/1472-6882-8-2>

6. Bougandoura A., D'Abrosca B., Ameddah S., Scognamiglio M., Mekkiou R., Fiorentino A., Benayache S., Benayache F. Chemical constituents and in vitro anti-inflammatory activity of *Cistanche violacea* Desf. (Orobanchaceae) extract. *Fitoterapia*. 2016. **109**, № 2. P. 248–253. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2016.01.010>
7. Banerjee K.K., Bishayee A., Chatterjee M. Role of human placental extract on succinic dehydrogenase activity in carrageenin-induced edema in rats in vivo and its effect on erythrocyte lysis, platelet aggregation and trypsin activity in vitro. *Indian J. Physiol. Pharmacol.* 1994. **38**, № 2. P. 121–124. PMID: 8063356
8. Banerjee K.K., Bishayee A., Chatterjee M. Anti-inflammatory effect of human placental extract: a biochemical mechanistic approach. *Riv. Eur. Sci. Med. Farmacol.* 1992. **14**, № 6. P. 361–366. PMID: 1308603
9. Sharma K., Bhattacharyya D. Immunoglobulin isotype isolated from human placental extract does not interfere in complement-mediated bacterial opsonization within the wound milieu. *FEBS Open Bio*. 2015. **5**. P. 369–377. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fob.2015.04.007>
10. Anosike Ch. A., Obidoa On., Ezeanyika L. US Membrane stabilization as a mechanism of the anti-inflammatory activity of methanol extract of garden egg (*Solanum aethiopicum*). *DARU*. 2012. **20**: 76. doi: <https://doi.org/10.1186/2008-2231-20-76>
11. Ivanov I.T., Brähler M., Georgieva R., Bäuml H. Role of membrane proteins in thermal damage and necrosis of red blood cells. *Thermochim. Acta*. 2007. **456**. P. 7–12. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tca.2007.01.020>

Надійшло до редакції 22.03.2018

REFERENCES

1. Grischenko, V. I. & Yurchenko, T. N. (Eds.). (2011). Placenta: cryopreservation, structure, properties, prospects of clinical use. Kharkiv (in Russian).
2. Tiwary, S. K., Shukla, D., Tripathi, A.K., Agrawal, S., Singh, M. K. & Shukla, V. K. (2006). Effect of placental-extract gel and cream on healing wounds. *J. Wound Care*, 15, No. 7, pp. 325-328. doi: <https://doi.org/10.12968/jowc.2006.15.7.26937>
3. De, D., Chakraborty, P. D. & Bhattacharyya, D. (2011). Regulation of trypsin activity by peptide fraction of aqueous extract of human placenta used as wound healer. *J. Cell Physiol.*, 226, No. 8, pp. 2033-2040. doi: <https://doi.org/10.1002/jcp.22535>
4. Bhadoriya, S. S., Mishra, V., Raut, S., Ganeshpurkar, A. & Jain, S. K. (2012). Anti-Inflammatory and antinociceptive activities of a hydroethanolic extract of tamarindus indica leaves. *Sci. Pharm.*, 80, No. 3, pp. 685-700. doi: <https://doi.org/10.3797/scipharm.1110-09>
5. Okoli, C. O., Akah, P. A., Onuoha, N. J., Okoye, Th. C., Nwoye, A. C. & Nworu, Ch. S. (2008). *Acanthus montanus*: An experimental evaluation of the antimicrobial, anti-inflammatory and immunological properties of a traditional remedy for furuncles. *BMC Compl. Alternative Med.*, 8: 27. doi: <https://doi.org/10.1186/1472-6882-8-2>
6. Bougandoura, A., D'Abrosca, B., Ameddah, S., Scognamiglio, M., Mekkiou, R., Fiorentino, A., Benayache, S. & Benayache, F. (2016). Chemical constituents and in vitro anti-inflammatory activity of *Cistanche violacea* Desf. (Orobanchaceae) extract. *Fitoterapia*, 109, No. 2, pp. 248-253. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2016.01.010>
7. Banerjee, K. K., Bishayee, A. & Chatterjee, M. (1994). Role of human placental extract on succinic dehydrogenase activity in carrageenin-induced edema in rats in vivo and its effect on erythrocyte lysis, platelet aggregation and trypsin activity in vitro. *Indian J. Physiol. Pharmacol.*, 38, No. 2, pp. 121-124. PMID: 8063356
8. Banerjee, K. K., Bishayee, A. & Chatterjee, M. (1992). Anti-inflammatory effect of human placental extract: a biochemical mechanistic approach. *Riv. Eur. Sci. Med. Farmacol.*, 14, No. 6, pp. 361-366. PMID: 1308603
9. Sharma, K. & Bhattacharyya, D. (2015). Immunoglobulin isotype isolated from human placental extract does not interfere in complement-mediated bacterial opsonization within the wound milieu. *FEBS Open Bio*, 5, pp. 369-377. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fob.2015.04.007>
10. Anosike, Ch. A., Obidoa, On. & Ezeanyika, L. (2012). US Membrane stabilization as a mechanism of the anti-inflammatory activity of methanol extract of garden egg (*Solanum aethiopicum*). *DARU*, 20: 76. doi: <https://doi.org/10.1186/2008-2231-20-76>

11. Ivanov, I. T., Brähler, M., Georgieva, R. & Bäuml, H. (2007). Role of membrane proteins in thermal damage and necrosis of red blood cells. *Thermochim. Acta*, 456, pp. 7-12. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tca.2007.01.020>

Received 22.03.2018

*Е.Н. Боброва, Ю.С. Говорова, О.А. Нардид,
С.В. Репина, С.В. Нарожный, С.В. Покрышко*

Институт проблем криобиологии и криомедицины
НАН Украины, Харьков
E-mail: helen.bobrova.77@gmail.com

ВЛИЯНИЕ ЭКСТРАКТОВ ПЛАЦЕНТЫ ЧЕЛОВЕКА НА ТЕРМОГЕМОЛИЗ ЭРИТРОЦИТОВ

Исследовано влияние замораживания экстрактов плаценты человека на их способность снижать термогемоліз эритроцитов. Показано, что замораживание экстрактов плаценты до -20 и -196 °C и следующий отогрев не приводят к достоверным изменениям их эффективности по отношению к стабилизации мембран эритроцитов при температурном воздействии. Выявлены фракции экстрактов плаценты, которые наиболее эффективно снижают уровень термогемоліза эритроцитов: меньше 4 кДа и 12–20 кДа. Процент ингибирования термогемоліза для них составляет $(31,7 \pm 3,3)$ % и $(31,5 \pm 3,2)$ % соответственно.

Ключевые слова: *экстракт плаценты, фракции, замораживание, термогемоліз эритроцитов, противовоспалительная эффективность.*

*О.М. Bobrova, Yu.S. Govorova, O.A. Nardid,
S.V. Repina, S.V. Narozhnyi, S.V. Pokryshko*

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine
of the NAS of Ukraine, Kharkiv
E-mail: helen.bobrova.77@gmail.com

INFLUENCE OF HUMAN PLACENTA EXTRACTS TO ERYTHROCYTES' THERMOHEMOLYSIS

The influence of the freezing of human placenta extracts on their ability to reduce the thermohemolysis of erythrocytes has been investigated. It has been shown that the freezing of placenta extracts down to -2 and -19 °C and the following heating do not lead to a significant change in their effectiveness to stabilize the erythrocyte membranes at temperature effects. The placenta extract fractions, namely less than 4 kDa and 12–20 kDa, most effectively reducing the level of erythrocytes' thermohemolysis, have been identified. The percentages of inhibition of the thermogemolysis for them are (31.7 ± 3.3) % and (31.5 ± 3.2) %, respectively.

Keywords: *placenta extract, fraction, freezing, erythrocytes' thermohemolysis, antiinflammatory efficacy.*