

Фазовые переходы в смесях клеточных суспензий с фракциями экстрактов плаценты человека при температуре ниже 0°C

UDC 57.043:537.628.3:57.085.23

A.V. ZINCHENKO*, YU.S. GOVOROVA, E.N. BOBROVA

Phase Transitions at the Temperatures Below 0°C in Mixtures of Cell Suspensions with Human Placental Extract Fractions

Методом дифференциальной сканирующей калориметрии исследованы фазовые переходы во фракциях экстрактов с молекулярной массой до 5; 50–70 и 750 кДа, полученных из плаценты человека, а также в клеточных суспензиях эритроцитов и дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* с добавлением фракций экстрактов ниже 0°C. Выявлены общие закономерности влияния клеток на низкотемпературные фазовые переходы в различных фракциях экстрактов. Наблюдается существенное снижение интенсивности пика инверсии и пика плавления эвтектики, обусловленное присутствием NaCl. Указанные факторы связаны с изменением межмолекулярных взаимодействий в жидкой фазе в результате конкуренции между активными центрами органических молекул за присоединение молекул воды. Снижение интенсивности низкоэнергетического процесса инверсии, связанное с конформационным изменением молекул во фракциях в присутствии клеток, обусловлено взаимодействием молекул, участвующих в процессе инверсии, с клетками.

Ключевые слова: фракции экстрактов плаценты, фазовые переходы, клеточная суспензия, эритроциты, *Saccharomyces cerevisiae*, эвтектика, инверсия, дифференциальная сканирующая калориметрия.

Методом диференціальної скануючої калориметрії були досліджені фазові переходи у фракціях екстрактів з молекулярною масою до 5; 50–70 і 750 кДа, отриманих з плаценти людини, а також у клітинних суспензіях еритроцитів і дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* з додаванням фракцій екстрактів нижче 0°C. Виявлено загальні закономірності впливу клітин на низькотемпературні фазові переходи у різних фракціях екстрактів. Спостерігається значне зниження інтенсивності піка інверсії і піка плавлення евтектики, обумовлене присутністю NaCl. Вказані фактори пов'язані зі зміною міжмолекулярних взаємодій у рідкій фазі внаслідок конкурентної боротьби між активними центрами органічних молекул за приєднання молекул води. Зниження інтенсивності низкоенергетичного процесу інверсії, яке пов'язане з конформаційними змінами молекул у фракціях у присутності клітин, обумовлено взаємодією молекул, які беруть участь у процесі інверсії, з клітинами.

Ключові слова: фракції екстрактів плаценти, фазові переходи, клітинна суспензія, еритроцити, *Saccharomyces cerevisiae*, евтектика, інверсія, диференціальна скануюча калориметрія.

Using differential scanning calorimetry the phase transitions at the temperatures below 0°C in fractions of extracts derived from human placenta with molecular mass up to 5; 50–70 and 750 kDa, as well as in suspensions of red blood cells and the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* supplemented with the mentioned fractions of extracts were studied. General regularities of the influence of cells on low-temperature phase transitions in the fractions of extracts were revealed. A significant reduction in the intensities of the inversion peak and the eutectic melting peak was found likely due to the presence of NaCl. These phenomena are likely caused by the changed intermolecular interactions in the liquid phase as a result of competition between active centers of organic molecules for binding the water molecules. Reduced intensity of low-energy process of inversion, caused by conformational change in molecules of the fractions in the presence of cells, result from interactions of molecules involved in the process of inversion with the cells.

Key words: extract placenta fractions, phase transitions, cell suspension, erythrocytes, *Saccharomyces cerevisiae*, eutectics, inversion, differential scanning calorimetry.

Водно-солевые экстракты плаценты в последние годы привлекают внимание исследователей из-за высокого содержания биологически активных веществ. Благодаря этому экстракты плаценты человека могут проявлять антиоксидантную [9], противовоспалительную [7] и тромболитическую активности [8], а также являться стимулирующим агентом репарации биологических тканей [10]. В работе [2] показано, что экстракты плаценты человека снижают осмотическую хрупкость эритроцитов и повышают их устойчивость к воздействию

Recently the attention of researchers has been attracted to placental aqueous-saline extracts due to a high content of biologically active substances. Due to these substances the human placental extracts can manifest antioxidant [9], anti-inflammatory [7] and thrombolytic activities [8], as well as serve as a stimulating agent of reparation for biological tissues [10]. Pogozhikh D.N. *et al.* [2] found the ability of human placental extracts to reduce osmotic fragility of erythrocytes and increase their resistance to the effect of NaCl hyperconcentration and low pH. These results

Институт проблем криобиологии и криомедицины
НАН Украины, г. Харьков

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

* 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

* 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

гиперконцентрации NaCl и низкого pH. Эти результаты дают основание полагать, что биологически активные вещества экстрактов плаценты непосредственно взаимодействуют с мембранами клеток, другими клеточными структурами и связываются с ними. Одним из способов проверки данного предположения может быть исследование фазовых переходов в водно-солевых экстрактах плаценты, а также в смесях суспензий клеток с экстрактами и их фракциями при температурах ниже 0°C. Из анализа характера проявления фазовых переходов может быть извлечена информация о межмолекулярных взаимодействиях в системе и об образовании комплексов между компонентами системы [1].

Цель работы – методом дифференциальной сканирующей калориметрии изучить фазовые переходы в суспензиях клеток эритроцитов и *Saccharomyces cerevisiae* с добавлением фракций экстрактов плаценты с молекулярной массой до 5; 50–70 и 750 кДа при температуре ниже 0°C.

Материалы и методы

Водно-солевые экстракты выделяли из ткани плаценты человека по методике, описанной в [4], после тестирования на наличие вирусных инфекций. Экстракты в зависимости от конечной температуры охлаждения были разделены на три группы: первую и вторую охлаждали до температуры –20 и –80°C соответственно, затем хранили их в морозильных камерах в течение 2,5 месяцев; третью группу экстрактов охлаждали до –196°C в сосуде с жидким азотом. Экстракты размораживали в водяной бане при 20°C, затем разделяли их методом гель-хроматографии на колонке 22×2 см с сефадексом G-200. Для калибровки колонки использовали голубой декстран с молекулярной массой 2000000, глюкозооксидазу (180 кДа), бычий сывороточный альбумин (64 кДа) и цитохром C (12 кДа). Получили три типа фракций с молекулярной массой 5; 50–70 и 750 кДа. Концентрацию белка определяли спектрофотометрическим методом.

Донорскую кровь на консерванте “Глюгицир” центрифугировали в течение 5 мин при 800 g. Эритроцитарный осадок дважды отмывали физиологическим раствором. Полученную эритроцитарную массу смешивали с фракциями экстрактов плаценты в соотношении 1:1. Дрожжи *S. cerevisiae* выращивали на скошенной среде Сабуро в течение 48 ч при температуре 30°C, затем выращенные культуры смывали физиологическим раствором. Концентрация клеток в образце составляла 10⁸ КОЕ/мл. Жизнеспособность дрожжей определяли чашечным методом Коха по колониеобразованию на агаризованной среде Сабуро [5]. Полученные дрожжи смешивали с фракциями экстрактов плаценты в соотношении 1:1.

enable the supposition that biologically active substances of placental extracts directly interact with cell membranes and other cell structures making bounds with them. One of the ways to check this supposition may be the study of phase transitions in placental aqueous-saline extracts, as well as in the mixtures of cell suspensions with the extracts and their fractions under the temperatures below 0°C. The analysis of the manifestation character of phase transitions may provide the information about intermolecular interactions in the system and about the formation of complexes between the system components [1].

The research aim was to investigate the phase transitions in red blood cell and *Saccharomyces cerevisiae* suspensions supplemented with the placenta extract fractions of molecular weight up to 5; 50–70 and 750 kDa below 0°C by means of differential scanning calorimetry method.

Materials and methods

Aqueous-saline extracts were derived from human placenta tissue according to the method described by Rozanova S.L. *et al.* [4], after testing for the absence of viral infections. Depending on final cooling temperature the extracts were divided into three groups: the first and second ones were cooled down to –20 and –80°C, correspondingly, later they were stored in freezing chambers for 2.5 months; the third group of extracts was cooled down to –196°C in the vessel with liquid nitrogen. The extracts were thawed in water bath at 20°C, afterwards they were separated by gel chromatography using 22×2 cm column with Sephadex G-200. Blue dextran with molecular weight 2,000,000, glucose oxidase (180 kDa), BSA (64 kDa) and cytochrome C (12 kDa) were used to calibrate the column. Three types of fractions with molecular weight of 5; 50–70 and 750 kDa were obtained. Protein concentration was examined with spectrophotometric method.

Donor blood with “Glugicyr” preservative was centrifuged for 5 min at 800g. Erythrocyte sediment was twice washed with physiological solution. The obtained erythrocyte mass was mixed with the placental extract fractions in 1:1 ratio. *S. cerevisiae* yeasts were grown on Sabouraud’s medium slope for 48 hrs at 30°C, then grown cultures were washed with physiological solution. Cell concentration in the sample made 10⁸ CFU/ml. Yeast viability was assessed as colony formation activity with Koch’s plate technique in Sabouraud’s medium [5]. The resulted yeast suspension was 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 [1]. This device according to Wendlandt’s classification can be referred to the apparatuses of DSC type (DTA) [6]. The

Исследования фазовых переходов проводили на дифференциальном сканирующем калориметре, разработанном в ИПКиК НАНУ [1]. Данный прибор согласно классификации Уэндландта можно отнести к приборам типа “ДСК” (ДТА) [6]. Принцип его работы основан на регистрации тепловых потоков, поступающих в образец в процессе его непрерывного нагрева [1, 6]. Особенность данного калориметра в том, что его рабочую камеру можно предварительно охладить до заданной температуры в диапазоне 0...–196°C, затем поместить в ячейку образец, заранее охлажденный с требуемой скоростью.

Образцы массой около 1000 мг помещали в тонкостенный стакан из нержавеющей стали с толщиной стенок 0,1 мм, закрывали крышкой и охлаждали погружением в жидкий азот со средней скоростью охлаждения 3,3 град/с. Температуру фазовых переходов определяли на основании термограмм, полученных при нагреве со скоростью $8,3 \times 10^{-3}$ град/с в диапазоне температур –150...0°C. Интерпретацию термограмм проводили, как описано в работах [1, 6].

Результаты и обсуждение

На ДСК-термограмме фракции с молекулярной массой до 5 кДа из свежеполученного экстракта плаценты (рис. 1, А) зарегистрировали следующие термические эффекты: 1 – узкий экзотермический пик при температуре –85,5°C отображает, вероятнее всего, инверсию молекул, имеющих углерод-углеродные связи. Для данного эффекта в литературе употребляется термин “обращение конфигурации”, связанный с процессом изомеризации [3]; 2 – узкий интенсивный эндотермический пик при –21°C соответствует плавлению эвтектических составов из механической смеси кристаллов NaCl и воды; 3 – плавление льда в системе [1].

На термограммах фракций с молекулярными массами 50–70 и 750 кДа из свежеприготовленных экстрактов плаценты человека зарегистрировали аналогичные фазовые переходы (рис. 2, А и 3, А).

Замораживание экстрактов и хранение их при –20°C не приводят к значительным изменениям интенсивности инверсии на термограмме фракции, содержащей низкомолекулярные белки, а плавление эвтектики и плавление системы остаются неизменными (см. рис. 1, В).

Смешивание суспензии эритроцитов с низкомолекулярной фракцией из экстракта, замороженного и предварительно хранившегося при –20°C в течение 2,5 месяцев, приводит к значительному снижению интенсивности пика инверсии и пика плавления эвтектики (см. рис. 1, С).

На рис. 2, В представлена термограмма смеси суспензии эритроцитов и фракции с молекулярной

принципе его функционирования основан на регистрации тепловых потоков, поступающих в образец в процессе его постоянного нагрева [1, 6]. The peculiarity of this calorimeter consists in the fact that its operating chamber may be preliminarily cooled down to the set temperature within the range of 0...–196°C, later the sample preliminarily cooled with a required rate to be placed into the well.

The samples of 1,000 mg were placed into thin-wall stainless jar with 0.1 mm wall width, covered and cooled by plunging into liquid nitrogen with an average cooling rate of 3.3 deg/s. Temperature of phase transitions were determined on the base of thermograms obtained when heating with the rate of 8.3×10^{-3} deg/s within the temperature range of –150...0°C. Thermograms were interpreted as described earlier [1, 6].

Results and discussion

In DCS thermogram of the fractions with molecular weight up to 5 kDa from fresh placental extract (Fig. 1A) the following thermal effects were recorded: 1 – narrow exothermic peak at 85.5°C likely represents the inversion of molecules possessing carbon-

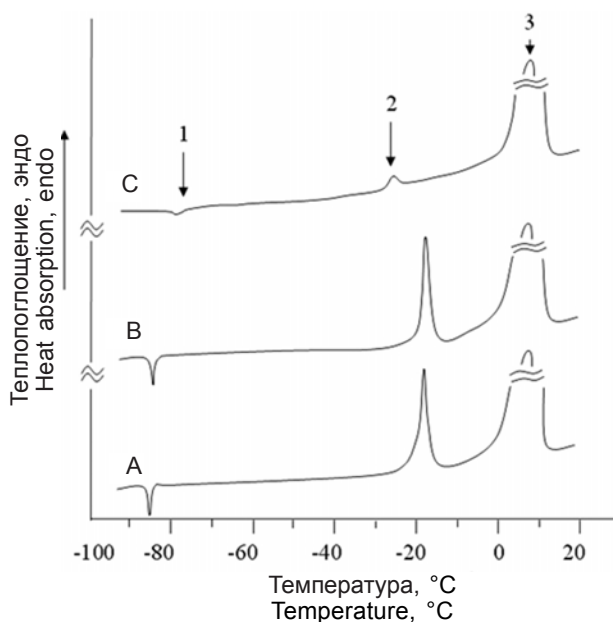


Рис. 1. ДСК-термограммы: А – низкомолекулярная фракция с молекулярной массой до 5 кДа из свежеприготовленного экстракта плаценты; В – низкомолекулярная фракция с молекулярной массой до 5 кДа из замороженного и хранившегося при –20°C экстракта плаценты; С – суспензия эритроцитов с низкомолекулярной фракцией до 5 кДа из замороженного и хранившегося при –20°C экстракта плаценты (1:1).

Fig. 1. DSC-thermograms: A – low molecular fraction with molecular weight up to 5 kDa from fresh placental extract; B – low molecular fraction with molecular weight up to 5 kDa from fresh and stored at –20°C placental extract; C – suspension of erythrocytes with low molecular fraction up to 5 kDa from frozen and stored at –20°C placental extract (1:1).

массой 50–70 кДа, полученной из замороженного и хранившегося при -20°C экстракта. Как и в рассмотренном выше случае, наблюдается снижение интенсивности пиков инверсии и плавления эвтектики. Еще больший эффект снижения интенсивности указанных процессов зарегистрирован на термограмме для смеси суспензии эритроцитов и данной фракции, замороженной и хранившейся при -80°C (рис. 2, С).

Таким образом, хранение экстрактов плаценты при более низких температурах приводит к снижению интенсивности пика инверсии и пика плавления эвтектики, что оказывает более благоприятное действие на биологические объекты, так как фактически исчезают низкотемпературные фазовые переходы, способные вызывать определенные криповреждения биологических структур.

На рис. 3 приведены результаты исследования смеси суспензии эритроцитов и фракции с молекулярной массой до 750 кДа. На термограммах фракции из свежеприготовленного экстракта (рис. 3, А) и фракции из экстракта, хранившегося при -20°C (рис. 3, В), отличий в регистрации инвер-

carbon bonds. This effect is defined in the literature as the “configuration rotation” related to the process of isomerization [3]. 2 – narrow intensive endothermic peak at -21°C which corresponds to melting of eutectic compositions being mechanical mixture of NaCl crystals and water. 3 – ice melting in the system [1].

In thermograms of fractions with molecular weights of 50–70 and 750 kDa from fresh human placental extracts we recorded the same phase transitions (Fig. 2A and 3A).

Freezing of the extracts and their storage at -20°C do not lead to significant changes of inversion intensity in thermogram of the fraction, containing low molecular proteins, and the eutectics melting and the melting of the system remain unchanged (see Fig. 1B).

Mixing of erythrocyte suspension with low molecular fraction from the extract, frozen and preliminarily stored at -20°C during 2.5 months results in a significant reduction of inversion intensity and eutectics melting peak (see Fig. 1C).

Fig. 2B demonstrates the thermogram of mixed erythrocyte suspension and the fraction with molecular weight of 50–70 kDa, derived from frozen and stored at -20°C extract. Like in the described above case we observed the reduced intensity of peaks of inversion and eutectics melting. Much higher decreasing in the intensity of the mentioned processes was recorded in the thermogram for the mixture of erythrocyte suspension and the fraction frozen and stored at -80°C (Fig. 2C).

Thus the storage of placental extracts at lower temperatures results in the reduced intensity of inversion peak and the peak of eutectics melting, that affects the biological objects more favorably, since low temperature phase transitions, capable of causing the certain cryodamages of biological structures, actually disappear.

Fig. 3 shows the research results for the mixture of erythrocyte suspension and the fraction with molecular weight up to 750 kDa. In the thermograms of fraction from fresh extract (Fig. 3A) and the fraction from the extract stored at -20°C (Fig. 3B) we noted no differences in peaks of the inversion, eutectic melting and melting of the system. However, like in previous experiments, the reduction of inversion intensity and eutectics melting was found in thermograms of the mixture of erythrocyte suspension and extract fraction with molecular weight up to 750 kDa (Fig. 3C).

The Table represents the temperature values for phase transitions resulting from analysis of thermograms of the studied system. In the mixtures of cell suspensions and fractions the inversion temperature values increase by 7–10 $^{\circ}\text{C}$, the temperatures of eutectics melting decrease by 5.5–6 $^{\circ}\text{C}$, the melting temperature values of the whole system remain unchanged within the error of the experiment. The binding of the

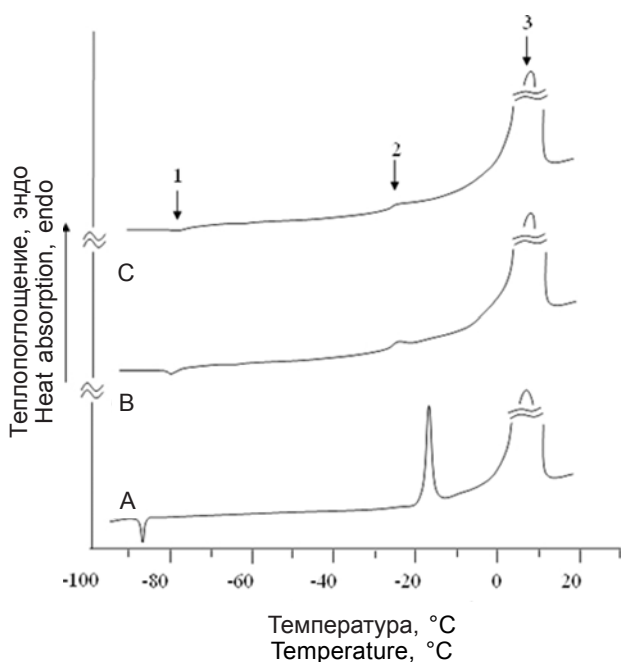


Рис. 2. ДСК-термограммы: А – фракция с молекулярной массой 50–70 кДа из свежеприготовленного экстракта плаценты; В – суспензия эритроцитов с фракцией 50–70 кДа из замороженного и хранившегося при -20°C экстракта плаценты (1:1); С – суспензия эритроцитов с фракцией 50–70 кДа из замороженного и хранившегося при -80°C экстракта плаценты (1:1).

Fig. 2. DSC-thermograms: А – fraction with molecular weight of 50–70kDa from fresh placental extract; В – suspension of erythrocytes with fraction of 50–70 kDa from frozen and stored at -20°C placental extract (1:1); С – suspension of erythrocytes with fraction of 50–70 kDa from frozen and stored at -80°C placental extract (1:1)

сии, эвтектического плавления и плавления системы не отмечено. Однако, как и в предыдущих экспериментах, установлено снижение интенсивности инверсии и плавления эвтектики на термограммах смеси суспензии эритроцитов и фракции экстракта с молекулярной массой до 750 кДа (рис. 3, С),

В таблице даны значения температур фазовых переходов, полученных на основании анализа термограмм исследуемых систем. В смесях суспензий клеток и фракций значения температуры инверсии повышаются на 7–10°C, плавления эвтектики понижаются на 5,5–6°C, значения температуры плавления всей системы остаются неизменными в пределах погрешности эксперимента. Связывание молекул, участвующих в процессе инверсии, с

Значения температур фазовых переходов в системах, содержащих суспензии эритроцитов и фракции экстрактов с различной молекулярной массой
Temperature values of phase transitions in the systems containing erythrocyte suspensions and extract fractions with various molecular weight

Молекулярная масса фракции экстракта, кДа Molecular weight of extract fractions, 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
	СЭ FE			Э(-20°C) E(-20°C)			Э(-20°C) + эритроциты E(-20°C) + RBC		
750	-87	-19	-0,5	-86	-19	-0,1	-77	-25	-1
50–70	-87	-19	-0,5	-86,5	-20	-1	-79	-25	-1
До/Up to 5	-85,5	-20,5	-0,5	-84	-20	-0,5	-79	-26	-1

Примечания: T_{inv} – температура инверсии; T_{me} – температура плавления эвтектики, T_m – температура плавления системы; СЭ – фракции из свежеприготовленного экстракта плаценты; Э(-20°C) – фракции из экстракта, замороженного и хранившегося при -20°C.

Notes: T_{inv} – inversion temperature; T_{me} – eutectics melting temperature; T_m – system melting temperature; FE – fractions from the fresh placental extract; E(-20°C) – fractions from the extract frozen and stored at -20°C.

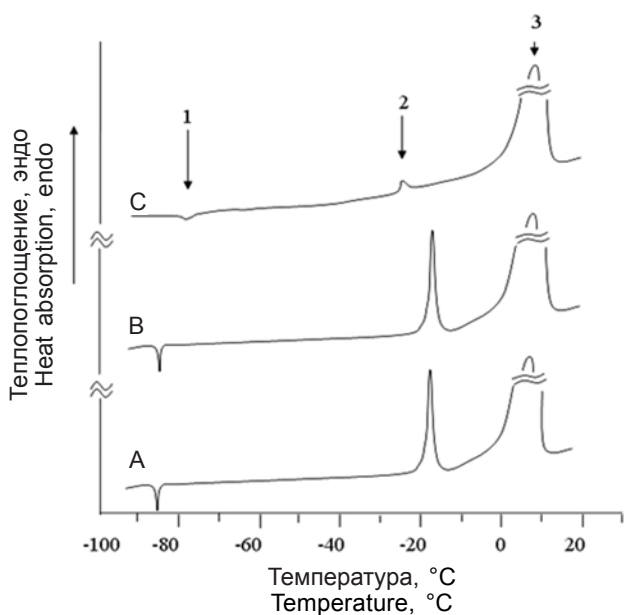


Рис. 3. ДСК-термограммы: А – фракция с молекулярной массой 750 кДа из свежеприготовленного экстракта плаценты; В – фракция с молекулярной массой 750 кДа из замороженного и хранившегося при -20°C экстракта плаценты; С – суспензия эритроцитов с фракцией 750 кДа из замороженного и хранившегося при -20°C экстракта плаценты (1:1).

Fig. 3. DSC-thermograms: A – fraction with molecular weight of 750kDa from fresh placental extract; B – suspension of erythrocytes with fraction of 750 kDa from frozen and stored at -20°C placental extract; C – suspension of erythrocytes with fraction of 750 kDa from frozen and stored at -80°C placental extract (1:1).

inversion-involved molecules with cell membranes makes the inversion difficult and thereby contributes to its decreased intensity and, as the Table shows, to the increased temperature of this process.

Low temperature phase transitions in the system containing low molecular fraction of placental extract and *S. cerevisiae* cell suspension were studied to examine general regularities of cell effects on physical processes in the suspensions, containing the fractions of placental extracts and cells when temperature alters.

When comparing thermograms of low molecular fraction of the extract obtained from fresh placental extract (Fig. 4A) and low molecular fraction of the extract frozen down to -196°C (Fig. 4B) one may note lower value of inversion peak intensity in Fig 4B. The rest transitions were not changed.

In the thermogram for *S. cerevisiae* cell suspension in physiological solution (Fig. 4) there is just one endothermic peak corresponding to cell suspension melting. In the thermogram of mixture of low molecular fraction of the extract with *S. cerevisiae* cell suspension in physiological solution (Fig. 4D) there are found the following changes: the process corresponding to the peak 1 (inversion) proceeds at higher temperature (-82°C) and with lower intensity if compared with the considered above frozen low molecular fraction of the extract (Fig. 4B). The intensity of eutectics melting peak significantly decreases.

The reduced intensity of eutectics melting in the mixtures containing both erythrocytes in the presence of fractions of all the types and *S. cerevisiae* with adding low molecular fraction if compared with those from

клеточными мембранами затрудняет инверсию и тем самым способствует снижению её интенсивности и, как видно из таблицы, повышению температуры данного процесса.

Исследования низкотемпературных фазовых переходов в системе, содержащей низкомолекулярную фракцию экстракта плаценты и клеточную суспензию *S. cerevisiae*, были проведены для определения общих закономерностей влияния клеток на физические процессы в суспензиях, содержащих фракции экстрактов плаценты и клетки при изменении температуры.

Сравнивая термограммы низкомолекулярной фракции свежеприготовленного экстракта плаценты (рис. 4, А) и низкомолекулярной фракции экстракта, замороженного до -196°C (рис. 4, В), можно отметить более низкое значение интенсивности пика инверсии на рис. 4, В. Остальные переходы не претерпевали изменений.

На термограмме для суспензии клеток *S. cerevisiae* в физиологическом растворе (рис. 4, С) имеется лишь один эндотермический пик, соответствующий плавлению клеточной суспензии. На термограмме смеси низкомолекулярной фракции экстракта с суспензией клеток *S. cerevisiae* в физиологическом растворе (рис. 4, D) наблюдаются такие изменения: процесс, соответствующий пику 1 (инверсия), протекает при более высокой температуре (-82°C) и с меньшей интенсивностью по сравнению с рассмотренной выше замороженной низкомолекулярной фракцией экстракта (рис. 4, В). Значительно снижается интенсивность пика плавления эвтектики.

Снижение интенсивности плавления эвтектики в смесях, содержащих как эритроциты в присутствии фракций всех типов, так и *S. cerevisiae* с добавлением низкомолекулярной фракции, по сравнению с фракциями из свежеприготовленного экстракта, возможно, обусловлено тем, что определенная часть молекул воды связывается с органическими компонентами фракции экстрактов и в образовании эвтектических составов не принимает участия.

Мы полагаем, что снижение интенсивности инверсии, наблюдаемое при смешивании фракции с суспензией *S. cerevisiae*, по сравнению с контрольным образцом фракции экстракта, также определяется связыванием молекул, участвующих в инверсии, с клеточными мембранами. Как свидетельствуют полученные данные, изменение интенсивности и температуры процессов инверсии и эвтектики является общим физико-химическим свойством систем, содержащих фракции экстрактов плаценты при добавлении к ним различных клеток.

fresh extract is likely stipulated with the fact that the certain part of molecules is bound with organic components of the extract fraction and does not participate in the formation of eutectic compositions.

We believe that the reduced inversion intensity, observed when mixing the fractions with *S. cerevisiae* suspension if compared with the control sample of extract fraction is also determined by the binding of inversion-involved molecules with cell membranes. As the findings demonstrate the change in intensity and temperature of inversion and eutectics processes is a common physical-chemical feature of the systems, containing the fractions of placental extracts when supplementing them with various cell suspensions.

Conclusions

In the research the common regularities of cell effect on low temperature phase transitions in different placental extract fractions were found.

1. In the presence of cells the eutectics melting intensity in aqueous-saline solutions of proteins, representing the placental extract fractions, decreased. The obtained results may be explained by the change in

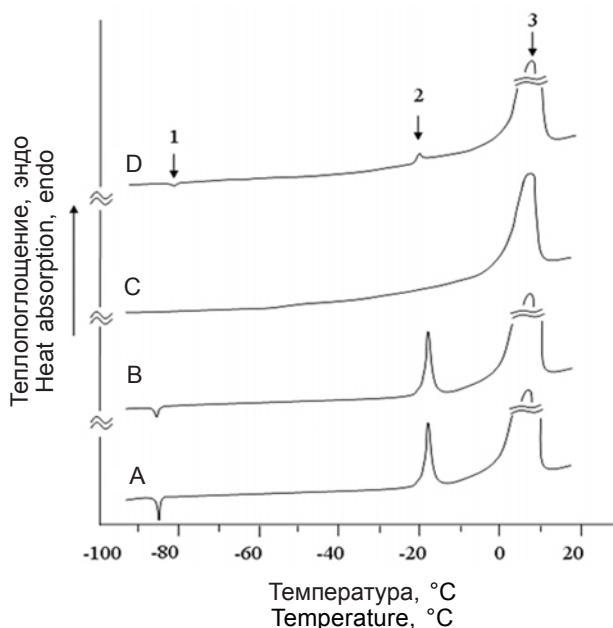


Рис. 4. ДСК-термограммы: А – фракция до 5 кДа из свежеприготовленного экстракта плаценты; В – фракция до 5 кДа из предварительно замороженного до -196°C экстракта; С – дрожжи *S. cerevisiae* в физиологическом растворе; D – суспензия дрожжей *S. cerevisiae* в физиологическом растворе и фракция до 5 кДа из экстракта свежеприготовленной плаценты (1:1).

Fig. 4. DSC-thermograms: A – fraction with molecular weight of up to 5 kDa from fresh placental extract; B – suspension of erythrocytes with fraction of 5 kDa from preliminarily frozen down to -196°C extract; C – *S. cerevisiae* in physiological solution; D – *S. cerevisiae* in physiological solution and fraction up to 5 kDa from the fresh placental extract (1:1).

Выводы

В работе выявлены общие закономерности влияния клеток на низкотемпературные фазовые переходы в различных фракциях экстрактов плаценты.

1. В присутствии клеток уменьшается интенсивность плавления эвтектики в водно-солевых растворах белков, представляющих собой фракции экстрактов плаценты. Полученные результаты можно объяснить изменением межмолекулярных взаимодействий в жидкой фазе в результате конкуренции между активными центрами органических молекул за присоединение молекул воды.

2. Интенсивность низкоэнергетического процесса инверсии, связанного с конформационным изменением молекул во фракциях экстрактов, значительно снижается при добавлении к ним клеточных суспензий в результате взаимодействия белковых молекул фракций, участвующих в процессе инверсии, с клетками.

Авторы выражают благодарность канд. биол. наук Розановой Е.Д. за получение фракций экстрактов плаценты человека и инж. I категории Артуянц А.Ю. за получение клеточной суспензии S. cerevisiae.

Литература

1. Зинченко А.В. Исследование фазовых переходов и физических состояний водных растворов многоатомных спиртов в диапазоне температур -150°C – 0°C : Автореф. дис. ... канд. физ.-мат. наук.– Киев, 1983.– 20 с.
2. Погожих Д.Н., Розанова Е.Д., Нардид О.А. Изменение некоторых структурных параметров эритроцитов под действием экстрактов плаценты // Гематология і переливання крові.– 2006.– №3.– С. 139–141.
3. Потапов В.М. Стереохимия.– М.: Химия, 1988.– 463 с.
4. Розанова С.Л., Науменко Е.И., Розанова Е.Д., Нардид О.А. Изменение антиоксидантных свойств экстрактов плаценты человека после замораживания // Проблемы криобиологии.– 2010.– Т. 20, №3.– С. 288–295.
5. Сиренко А.Ю., Марценюк В.Ф., Высеканцев И.П. Сахаролитические свойства и чувствительность к антимикотикам грибов рода *Candida* после криоконсервирования // Вісник проблем біології і медицини.– 2008.– Вип. 4.– С. 38–42.
6. Уэндландт У. Термические методы анализа.– М.: Мир, 1978.– 526 с.
7. Goldfarb G., Doan Ba Tri R., Duran A. Human placental extract for chronic leg ulcer // Lancet.– 1980.– Vol. 316, N8184.– P. 40.
8. Sur T.K., Biswas T.K., Ali L., Mukherjee D. Anti-inflammatory and anti-platelet aggregation activity of human placental extract // Acta Pharmacol. Sin.– 2003.– Vol. 24, N2.– P. 187–192.
9. Togashi S., Takashi N., Kubo Y. et al. Purification and identification of antioxidant substances in human placenta extracts // J. Health Sci.– 2000.– Vol. 46, N2.– P. 117–125.
10. Tonello G., Daglio M., Zaccarelli N. et al. Characterization and quantitation of active polynucleotide fraction (PDRN) from human placenta, a tissue repair stimulating agent // J. Pharm Biomed. Anal.– 1996.– Vol. 14, N11.– P. 1555–1560.

*Поступила 05.08.2011
Рецензент А.И. Осецкий*

intermolecular interactions in a liquid phase as a result of competition between active centers of organic molecules to bind the water molecules.

2. Intensity of low energetic process of inversion, related to conformational change of molecules in the extract fractions, significantly reduces when adding to them of cell suspensions as a result of interaction of protein molecules of inversion-involved fractions with the cells.

The authors express their thanks to Dr. E.D. Rozanova for the deriving of human placental extract fractions as well as to research assistant A. Yu. Artuyants for the obtaining of S. cerevisiae cell suspension

References

1. Zinchenko A.V. Study of phase transitions and physical states of aqueous solutions of multi-atom alcohols within the temperature range of -150°C .. 0°C : Author's abstract of the thesis of cand. of physical and mathematical sciences.– Kiev, 1983.– 20 p.
2. Pogozhykh D.N., Rozanova E.D., Nardid O.A. Change of some structural parameters of erythrocytes under effect of placental extracts // Hematologiya i Perelyvannya Krovi.– 2006.– N3.– P. 139–141.
3. Potapov V.M. Stereochemistry.– Moscow: Khimiya, 1988.– 463 p.
4. Rozanova S.L., Naumenko E.I., Rozanova E.D., Nardid O.A. Change of antioxidative properties of human placental extracts after freezing // Problems of Cryobiology.– 2010.– Vol. 20, N3.– P. 288–295.
5. Sirenko A.Yu., Martsenyuk V.F., Vysekantsev I.P. Saccharolytic properties and sensitivity to antimycotics of *Candida* fungi after cryopreservation// Visnyk Problem Biologii i Meditsyny.– 2008.– Issue 4.– P. 38–42.
6. Wendlandt W. Thermal methods of analysis.– Moscow: Mir, 1978.– 526 p.
7. Goldfarb G., Doan Ba Tri R., Duran A. Human placental extract for chronic leg ulcer // Lancet.– 1980.– Vol. 316, N8184.– P. 40.
8. Sur T.K., Biswas T.K., Ali L., Mukherjee D. Anti-inflammatory and anti-platelet aggregation activity of human placental extract // Acta Pharmacol. Sin.– 2003.– Vol. 24, N2.– P. 187–192.
9. Togashi S., Takashi N., Kubo Y. et al. Purification and identification of antioxidant substances in human placenta extracts // J. Health Sci.– 2000.– Vol. 46, N2.– P. 117–125.
10. Tonello G., Daglio M., Zaccarelli N. et al. Characterization and quantitation of active polynucleotide fraction (PDRN) from human placenta, a tissue repair stimulating agent // J. Pharm Biomed. Anal.– 1996.– Vol. 14, N11.– P. 1555–1560.

Accepted 05.08.2011