

УДК 536.6:615.361.013.85:615.451.16

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

Влияние автоклавированных экстрактов плаценты человека на фазовое поведение суспензий клеток при температуре ниже 0°C

UDC 547.42/43:547.569.2:577.336:576.311.332/336

A.V. Zinchenko*, E.N. Bobrova, M.I. Schetinsky, Yu.S. Govorova

Influence of Autoclaved Placenta Extracts on Phase Behavior of Cell Suspensions Below 0°C

Реферат. Исследовали фазовые переходы в экстрактах плаценты человека при замораживании до -196°C и влияние свежеприготовленного и автоклавированного экстрактов на фазовые переходы в клеточных суспензиях. Обнаружено, что после замораживания со скоростью $3,3(3)\text{град/с}$ в клеточных суспензиях и средах их суспендирования развивается процесс завершения кристаллизации на этапе нагрева со скоростью $8,3(3)\times 10^{-3}\text{ град/с}$. После разведения суспензий клеток *Candida albicans* и СПЭВ автоклавированным экстрактом этот процесс не регистрируется. Показано, что при замораживании экстрактов плаценты развивается кристаллизация эвтектических составов в отличие от смеси экстрактов с эритроцитами и клетками *C. albicans*.

Ключевые слова: фазовые переходы, дифференциальный сканирующий калориметр, экстракт плаценты, автоклавирование, суспензии клеток, СПЭВ, эритроциты, *Candida albicans*.

Реферат. Досліджували фазові переходи в екстрактах плаценти людини при заморожуванні до -196°C та вплив свіжовиготовленого і автоклавованого екстракту на фазові переходи в клітинних суспензіях. Виявлено, що після заморожування зі швидкістю $3,3(3)\text{град/с}$ в клітинних суспензіях і середовищах їх суспендування розвивається процес завершення кристалізації на етапі нагріву зі швидкістю $8,3(3)\times 10^{-3}\text{ град/с}$. Після розведення суспензій клітин *Candida albicans* і СПЕВ автоклавованим екстрактом цей процес не реєструється. Показано, що при заморожуванні екстрактів плаценти розвивається кристалізація евтектичних сумішей на відміну від суміші екстрактів з еритроцитами та клітинами *C. albicans*.

Ключові слова: фазові переходи, диференційний скануючий калориметр, екстракт плаценти, автоклавовання, суспензії клітин, СПЕВ, еритроцити, *Candida albicans*.

Abstract. Phase transitions in human placental extracts during cooling at -196°C and the effect of fresh and autoclaved extracts on phase transitions in cell suspensions were studied. It has been found that after cooling with the rate of $3.3(3)\text{deg/s}$ in cell suspensions or suspending media the process of crystallization termination developed at the stage of heating with the rate of $8.3(3)\times 10^{-3}\text{ deg/s}$. After dilution of the suspension of *Candida albicans* and SPEV cells with autoclaved extract this process was not observed. It was found that the crystallization of eutectic mixtures was developed in frozen placental extracts unlike the mixture of extracts with erythrocytes and *C. albicans* cells.

Key words: phase transitions, differential scanning calorimeter, placenta extract, autoclaving, cell suspensions, SPEV, erythrocytes, *Candida albicans*.

В настоящее время экстракты плаценты человека (ЭПЧ) благодаря наличию большого количества биологически активных веществ (белки, пептиды, РНК, ДНК, аминокислоты, микроэлементы, гормоны) широко используют для получения препаратов с высокой биологической активностью, которые применяют в клинической практике для лечения ряда заболеваний [12, 13]. Криогенные технологии позволяют не только получить уникальные фракции из экстрактов плаценты, но и сохранить их биологическую активность в течение длительного времени [8]. Однако на каждом этапе

Nowadays, human placental extracts (HPEs) due to the presence of various biologically active substances (proteins, peptides, RNA, DNA, aminoacides, microelements, hormones) have been widely used to create medicinal preparations with a high biological activity, applied in clinical practice to treat some diseases [12, 13]. Cryogenic technologies allow not only to obtain unique fractions from placental extracts, but also to preserve their biological activity for a long time [8]. However, each stage of technological process, particularly, cryosublimation fractioning, low-temperature extraction with freon solvents or derivation of

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

*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

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

Поступила 30.11.2012
Принята в печать 31.01.2013

Received November, 30, 2012
Accepted January, 31, 2013

Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2013. – Т. 23, №1. – С. 40–48.
© 2013, Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины

Problems of Cryobiology and Cryomedicine. – 2013. – Vol. 23, Nr. 1. – P. 40–48.
© 2013 Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

технологического процесса, в частности криосублимационное фракционирование, низкотемпературная экстракция хладоновыми растворителями или получение белково-пептидной фракции, возрастает риск бактериальной и вирусной контаминации.

Для снижения риска контаминации, предотвращения осложнений при использовании препаратов, в том числе анафилактических, и увеличения срока их хранения применяют разные виды стерилизации. Автоклавирование, или высокотемпературная стерилизация [10], – один из перспективных методов, позволяющих при определенных условиях частично сохранить биологическую активность экстрактов плаценты [7], очистить их от высокомолекулярных белков и нуклеиновых кислот, что является необходимым условием для приготовления некоторых фармакопейных препаратов. Обычно автоклавирование биологических препаратов осуществляется в течение 3–4 ч при 125...130°C и давлении 1,8–2 атм, при этом полностью денатурируют белки и аминокислоты, разрушаются вещества, обеспечивающие антиоксидантную активность. В настоящее время широкое распространение получили щадящие режимы автоклавирования препаратов (15–20 мин при 120...122°C и давлении 1,8–2 атм), которые обеспечивают удовлетворительную их стерилизацию и частичное сохранение биологической активности. При этом режиме, в отличие от режимов с пролонгированным временем автоклавирования, денатурирует часть белков и нуклеиновых кислот, происходит распад сахарозы на глюкозу и фруктозу без последующей деградации [10, 11]. Ранее было показано, что имеет место изменение биологической активности экстрактов после автоклавирования по отношению к клеткам [5]. По нашему мнению, это может быть обусловлено особенностями межмолекулярных взаимодействий смеси экстрактов и суспензий клеток с молекулами воды. Таким образом, инкубирование клеточных суспензий с автоклавированными экстрактами плаценты может быть источником, с одной стороны, биологически активных веществ для поддержания энергетического статуса клеток, а с другой – дополнительного количества связанной воды, необходимой при криоконсервировании.

В то же время для успешного криоконсервирования суспензий клеток необходима информация о фазовых переходах в системе, особенностях протекания процессов кристаллизации, рекристаллизации и т. д. до и после их инкубирования в экстрактах. Исследование фазовых переходов при температуре ниже 0°C является методическим подходом для изучения взаимодействий компонентов сложных биологических систем и образования комплексов между ними. Результаты, полученные методами дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) и ядерного магнитного резонанса высокого

protein-peptide fraction, is accompanied with increasing risk of bacterial and virus contamination.

There are different types of sterilization to decrease contamination risk, to avoid complications when using the preparations, including anaphylactic shock and increase the term of their storage. Autoclaving or a high temperature sterilization [10] is the one of perspective methods, under certain conditions enabling to preserve partial biological activity of placental extracts [7], purge away high molecular proteins and nucleic acids, that is a necessary condition to prepare some pharmacopeial preparations. Usually autoclaving of biological preparations is performed for 3–4 hrs at 125...130°C and 1.8–2 atm pressure, herewith proteins and aminoacids are completely denaturated, and the substances with antioxidant activity are damaged. Nowadays, mild regimens of autoclaving of preparations (15–20 min at 120...122°C and 1.8–2 atm pressure), providing their proper sterilization and partial preservation of biological activity, have been widely used. At this regimen unlike the ones with prolonged time of autoclaving, a part of proteins and nucleic acids is denaturated, dissociation of sucrose into glucose and fructose without further degradation occurs [10, 11]. Previously it has been shown that autoclaving resulted in the changed biological activity of extracts in respect to the cells [5]. We believe it may be stipulated by the peculiarities of water molecules interactions in the mixture of extracts and cell suspensions. Thus, incubation of cell suspensions with autoclaved placental extracts could lead, on the one hand, to the supply of biologically active substances for support cell energetic status, and on another hand, to the appearance of additional amount of bound water important for cryopreservation.

At the same time, the successful cryopreservation of cell suspensions requires the information about phase transitions in the system, peculiarities of crystallization and recrystallization processes *etc.* prior to and after the incubation of the cells with the extracts. Investigation of phase transitions at the temperature below 0°C is a methodical approach for studying the interactions of components of complex biological systems and formation of the complexes between them. The results obtained by the methods of differential scanning calorimetry (DSC) and nuclear magnetic resonance of a high resolution on protons (¹H-NMR), may testify to the change of molecule-to-molecule interactions and structural peculiarities of membranes of the studied objects when supplementing the cell suspensions with autoclaved placental extract.

The research aim was to study the effect of autoclaved extracts on phase transitions in cell suspensions within the temperature range of –196...0°C.

Materials and methods

There were investigated 5 placentas of 38 weeks gestation term derived from the maternity patients. The



разрешения на протонах (^1H -ЯМР), могут свидетельствовать об изменении межмолекулярных взаимодействий и о структурных особенностях мембран исследуемых объектов при добавлении автоклавированного экстракта в клеточные суспензии.

Целью исследования было изучение влияния автоклавированных экстрактов на фазовые переходы в клеточных суспензиях в диапазоне температур $-196\dots 0^\circ\text{C}$.

Материалы и методы

Исследовали 5 образцов плацент рожениц на сроке беременности 38 недель. Образцы плаценты получали при информированном согласии рожениц и после прохождения теста на наличие вирусных инфекций. Свежую плаценту отмывали от крови физиологическим раствором, который несколько раз меняли. Удаляли амниотические оболочки и соединительнотканые участки котиледонов, затем срезали тонкий слой ткани (3×2 см) в области котиледонов. Полученные фрагменты плаценты опускали в сосуд с физиологическим раствором в соотношении 1:5 и перемешивали 2–3 мин, удаляли надосадок и меняли физиологический раствор. Процедуру повторяли 3–4 раза. Для получения водно-солевых экстрактов отмытые кусочки плаценты измельчали в течение 5 мин на высокоскоростном гомогенизаторе MPW-302 (Польша) и разбавляли физиологическим раствором в соотношении 1:1. Полученный гомогенат выдерживали 12 ч при 4°C , затем центрифугировали 15 мин при 1500g и снимали надосадочную жидкость (водно-солевой экстракт плаценты человека).

Экстракт плаценты автоклавировали в течение 10–15 мин в закрытых полимерных контейнерах объемом 20 мл в смеси водяного пара с воздухом в герметично закрытой емкости при температуре $120\dots 122^\circ\text{C}$ и давлении 1,8–2,0 атм. Затем нерастворимые агрегаты отфильтровывали через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.

Эритроциты донорской крови II группы трижды отмывали физиологическим раствором (pH 7,4) и центрифугировали в течение 5 мин при 1500 g. Клетки *Candida albicans* выращивали 48 ч на агаризованной среде Сабуро [1] при 37°C и исследовали в ростовой среде и в физиологическом растворе. Клетки перевиваемой культуры эпителия почки свиньи (СПЭВ) выращивали при 37°C в ростовой среде 199 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки [4]. Все клетки осаждали центрифугированием в течение 5 мин при 1500g и смешивали с экстрактом плаценты в соотношении 1:1, инкубировали в течение 2 ч, после чего замораживали.

placentas were derived with an informed consent of maternity patients and after tested absence of viral infections. Fresh placenta was washed free of blood with physiological solution, which was changed several times. Amnion and connective tissue fragments of cotyledons were removed, then cut a slices (3×2 cm) of cotyledon tissue. The obtained placental fragments were placed into vessel with physiological solution in 1:5 ratio and mixed for 2–3 min, supernatant was removed and physiological solution was changed. This procedure was repeated 3–4 times. To derive aqueous-saline extracts the washed placenta was fragmented for 5 min with a high-rate homogenizer MPW-302 (Poland) and diluted with physiological solution in 1:1 ratio. The obtained homogenate was exposed for 12 hrs at 4°C , then centrifuged for 15 min at 1500 g and supernatant was collected (aqueous-saline extract of human placenta).

Placental extracts were autoclaved for 10–15 min in closed polymer containers of 20 ml in the mixture of aqueous vapor with air in pressurized tank at $120\dots 122^\circ\text{C}$ and 1.8–2.0 atm pressure. Then non-soluble aggregates were filtered out by membrane filter with 0.45 μm pore diameter.

Erythrocytes of donor blood of II group were thrice washed with physiological solution (pH 7.4) and centrifuged for 5 min at 1500 g. *Candida albicans* cells were cultured for 48 hrs in Sabouraud agar [1] at 37°C and used thereafter either in growth medium or physiological saline. The cells of inoculated culture of pig kidney epithelium (SPEV) were cultured at 37°C in growth medium 199 supplemented with 10% embryonic bovine serum [4]. All the cells were sedimented for 5 min at 1500g and mixed with placental extracts in 1:1 ratio, incubated for 2 hrs, and thereafter the specimens were frozen.

Low temperature phase transitions within the temperature ranges of $0\dots -196^\circ\text{C}$ were studied with differential scanning calorimeter (DSC) designed at the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine [2]. The samples were cooled with average rate of 3.3(3) deg/sec with the plunging into liquid nitrogen. Thermograms were recorded during heating with the rate of $8.3(3)\times 10^{-3}$ deg/sec. Error of temperature measuring made $\pm 0.2^\circ\text{C}$.

NMR-studies were performed with high resolution spectrometer TESLA BS 567 A (Czech Republic). To determine amount of bound water we used the method of Kuntz [9], according to which motility of molecules of bound water below 0°C remains high, and their NMR-signal in protons appears as a narrow line while a signal of frozen water broadens by several orders and is not observed in high resolution spectra.



Исследования низкотемпературных фазовых переходов в области температур 0...–196°C проводили на дифференциальном сканирующем калориметре (ДСК), разработанном в ИПКиК НАН Украины [2]. Образцы охлаждали со средней скоростью 3,3(3) град/с погружением в жидкий азот. Термограммы регистрировали при нагреве со скоростью 8,3(3)×10⁻³ град/с. Погрешность измерения температуры составляла ±0,2 °С.

ЯМР-исследования проводили на спектрометре высокого разрешения «TESLA BS 567 А» (Чехия). Для определения количества связанной воды использовали метод И.Кюнца [9], согласно которому подвижность молекул связанной воды ниже 0°C сохраняется высокой, а их ЯМР-сигнал на протонах имеет вид узкой линии, в то время как сигнал вымерзшей воды уширяется на несколько порядков и не регистрируется в спектрах высокого разрешения.

Результаты и обсуждение

На первом этапе исследовали низкотемпературные фазовые переходы в эритроцитарном осадке, осадке *C. albicans* в физиологическом растворе и сусле, суспензии клеток СПЭВ, а также в соответствующих средах.

Стрелками на рис.1 обозначены характерные эндо- и экзотермические эффекты, которые классифицированы нами по форме кривой и диапазону температур согласно ранее полученных данных [2], из которых видно, что во всех исследованных образцах, кроме физиологического раствора, регистрируется размытый экзотермический пик 2, соответствующий завершению кристаллизации на этапе нагрева. Этот пик на термограммах наблюдается в диапазоне температур от –25 до –46°C. На термограмме физиологического раствора зарегистрирован острый пик эвтектического плавления (пик 3) при температуре –21,3°C (рис. 1, А), характерный для водных растворов NaCl. На ДСК-термограммах среды суспендирования для клеток СПЭВ (рис. 1, F) и клеток СПЭВ в суспендирующей среде (рис. 1, G) также регистрируется пик плавления эвтектики значительно меньшей интенсивности. Несмотря на присутствие различных солей в суспендирующей среде для клеток СПЭВ, основной вклад в развитие кристаллизации и плавления эвтектических составов вносит NaCl, о чём свидетельствует характерная для его водного раствора температура плавления эвтектики. При температуре –73°C на термограмме среды суспендирования для клеток СПЭВ зарегистрирован экзотермический пик 1, который отображает, вероятнее всего, инверсию молекул, имеющих углерод-углеродные связи. Для названия данного эффекта в ли-

Results and discussion

At the first stage we studied low temperature phase transitions in erythrocyte supernatant, *C. albicans* suspension in physiological solution and wort, suspension of SPEV cells, as well as in appropriate media.

The arrows in Fig.1 points the characteristic endo- and exothermic phenomena, which were classified as for the shape of the curve and temperature range according to the previous data [2], and it is seen that in all the studied samples, except physiological saline, a broadened exothermic peak 2 exists, which corresponds to completed crystallization during heating. This peak in thermograms is observed within the temperature range from –25 to –46°C. In thermogram of physiological saline, a sharp peak of eutectic melting (peak 3) at –21.3°C (Fig. 1A) is found, which is characteristic for aqueous solutions of NaCl. In DSC thermograms of suspending medium for SPEV cells (Fig. 1F) and

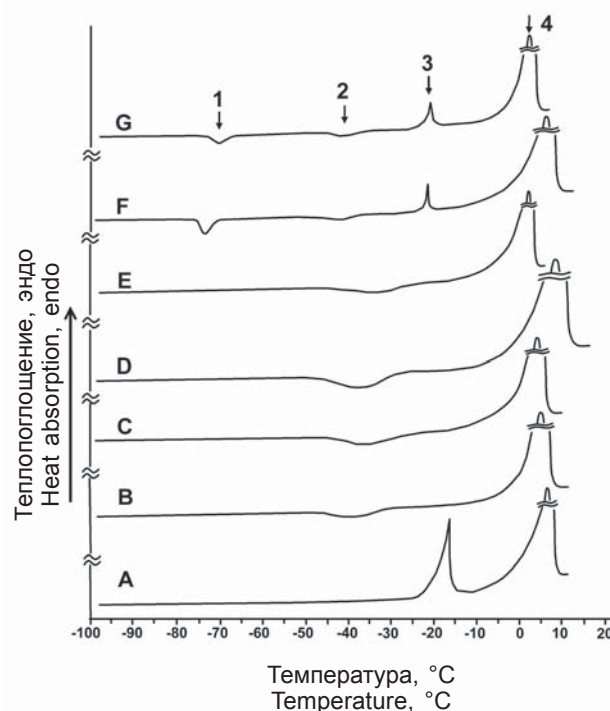


Рис. 1. ДСК-термограммы: А – физиологический раствор; В – эритроцитарная масса; С – *C. albicans* в физиологическом растворе; D – сусло; E – *C. albicans* в сусле; F – среда суспендирования для клеток СПЭВ; G – клетки СПЭВ в суспендирующей среде; 1 – инверсия молекул; 2 – завершение кристаллизации льда при нагреве; 3 – плавление эвтектики; 4 – плавление льда.

Fig. 1. DSC thermograms: A – physiological solution; B – erythrocyte mass; C – *C. albicans* in physiological solution; D – wort; E – *C. albicans* in wort; F – suspending medium for SPEV cells; G – SPEV cells in suspending medium; 1 – molecule inversion; 2 – completion of ice crystallization during heating; 3 – eutectic melting; 4 – ice melting.

Рис. 2. ДСК-термограммы: А – водно-солевой экстракт плаценты; В – эритроцитарная масса и экстракт плаценты (1:1); С – *C. albicans* в сусле и экстракт плаценты (1:1); D – *C. albicans* в физиологическом растворе и экстракт плаценты (1:1); Е – клетки СПЭВ и экстракт плаценты (1:1); 2 – завершение кристаллизации льда при нагреве; 3 – плавление эвтектики; 4 – плавление льда.

Fig. 2. DSC thermograms: A – aqueous-saline placental extract; B – erythrocyte mass and placental extract (1:1); C – *C. albicans* in wort and placental extract (1:1); D – *C. albicans* in physiological saline and placental extract (1:1); E – SPEV cells and placental extract (1:1); 2 – completion of ice crystallization during heating; 3 – eutectic melting; 4 – ice melting.

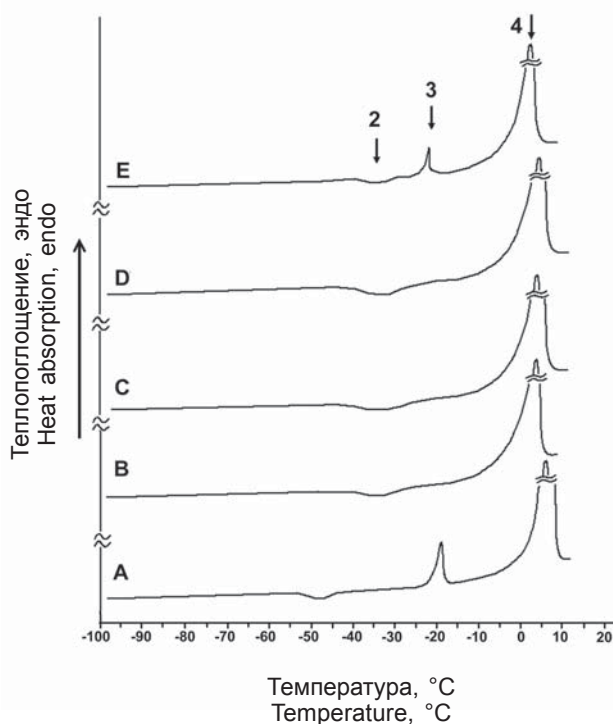
температуре используют термин «обращение конфигурации», связанный с процессом изомеризации [3]. На ДСК-термограммах клеток СПЭВ в суспендирующей среде при температуре -70°C также регистрируется пик инверсии меньшей интенсивности.

На термограмме суспензии эритроцитов пик плавления эвтектических составов не регистрируется, несмотря на то, что эритроциты отмывали физиологическим раствором (рис. 1, В). Кристаллизация и плавление эвтектик в растворах криопротекторов и водно-солевых растворах исчезают при добавлении в них гидрофильных органических соединений, что, возможно, объясняется образованием соединений криопротекторов и солей с органическими веществами [2].

При определенных температурах, характерных для исследуемых систем, регистрируются пики теплопоглощения 4, соответствующие процессу плавления.

ДСК-термограммы ЭПЧ и его смесей с эритроцитами, клетками *C. albicans* и СПЭВ в соотношении 1:1 приведены на рис. 2. Видно, что завершение процесса кристаллизации при нагреве в ЭПЧ (рис. 2, А) происходит при более низких температурах по сравнению с температурами тех же процессов в суспензиях клеток. Можно предположить, что в исследуемых системах межмолекулярные взаимодействия между растворенными компонентами запускают кинетические факторы, замедляющие рост кристаллов льда [6]. Пик 3 на термограмме ЭПЧ свидетельствует о том, что при охлаждении экстракта произошла кристаллизация эвтектики.

ДСК-термограммы автоклавированного ЭПЧ и его смеси с эритроцитами, клетками *C. albicans* и СПЭВ приведены на рис. 3. Можно отметить, что на термограмме автоклавированного экстракта, в отличие от термограммы свежеприготовленного экстракта, пик 2, соответствующий процессу завершения кристаллизации льда при нагреве, не



SPEV cells in suspending medium (Fig. 1G) the eutectic melting peak characterized by a significantly lower intensity is also found. In spite of present various salts in suspending medium for SPEV cells, the main contribution into crystallization and eutectic melting is made by NaCl, as it is evidenced by temperature of eutectic melting characteristic for its aqueous solution. An exothermic peak 1 is present in thermogram at -73°C for SPEV cells, which represents most probably the inversion of molecules with carbon-carbon bonds. This effect is called as ‘configuration transformation’, and is associated with isomerization [3]. An inversion peak of low intensity is also found at -70°C in DSC thermograms of SPEV cells in suspending medium.

No peak of eutectic mixture melting was found in thermogram of erythrocyte suspension, though the erythrocytes were washed with physiological solution (Fig. 1B). The signals of crystallization and melting of eutectics in cryoprotective solutions and aqueous-saline solutions disappear after addition of hydrophilic organic compounds, and this could be probably explained by the formation of complexes of cryoprotectants and salts with organic substances [2].

The peaks of thermal adsorption 4 relevant to melting are recorded at certain temperatures characteristic for the studied systems.

DSC thermograms of HPEs and their mixtures with erythrocytes, *C. albicans* and SPEV cells in 1:1 ratio are shown in Fig. 2. It can be seen that crystallization completion under heating in HPEs (Fig. 2A) occurs under lower temperatures if compared with the values

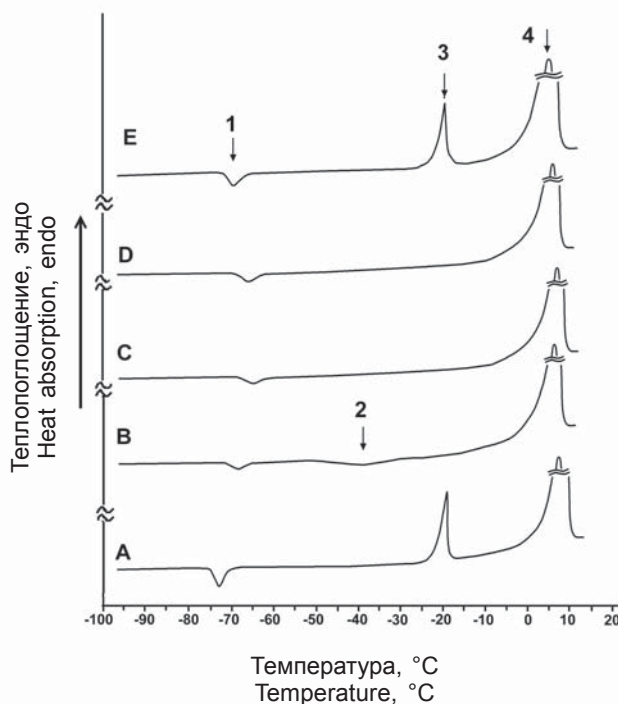


Рис. 3. ДСК-термограммы: А – автоклавированный экстракт плаценты; В – эритроцитарная масса и автоклавированный экстракт плаценты (1:1); С – *C. albicans* в сусле и автоклавированный экстракт плаценты (1:1); D – *C. albicans* в физиологическом растворе и автоклавированный экстракт плаценты (1:1); E – клетки СПЭВ в суспендирующей среде и автоклавированный экстракт плаценты (1:1); 1 – инверсия молекул; 2 – завершение кристаллизации льда при нагреве; 3 – плавление эвтектики; 4 – плавление льда.

Fig. 3. DSC thermograms: A – autoclaved placental extract; B – erythrocyte mass and autoclaved placental extract (1:1); C – *C. albicans* in wort and autoclaved placental extract (1:1); D – *C. albicans* in physiological solution and autoclaved placental extract (1:1); E – SPEV cells in suspending medium and autoclaved placental extract (1:1); 1 – molecule inversion; 2 – completion of ice crystallization during heating; 3 – eutectic melting; 4 – ice melting.

регистрируется. Очевидно, при охлаждении автоклавированного экстракта произошла кристаллизация всей жидкой фазы. При этом по данным метода ЯМР-спектроскопии количество связанной воды составляло всего 0,1–0,3% относительно всей воды в системе. Интенсивность пика 3 плавления эвтектических составов на термограмме автоклавированного экстракта (рис. 3, А) значительно выше, чем свежеприготовленного (см. рис. 2, А), что свидетельствует о кристаллизации большего количества эвтектического состава при охлаждении автоклавированного экстракта. Этот факт может быть связан с уменьшенным содержанием белка в автоклавированных экстрактах и соответственно меньшим количеством связанной воды. На термограмме автоклавированного экстракта регистрируется экзотермический эффект инверсии молекул (пик 1) при температуре -73°C .

На термограммах смеси автоклавированного экстракта с эритроцитарным осадком (рис. 3, В), клетками *C. albicans* в сусле (рис. 3, С) и в физиологическом растворе (рис. 3, D) пик плавления эвтектических составов отсутствует. При этом количество связанной воды по данным ЯМР-спектроскопии составляло 8–11% для эритроцитов и 9–12% для *C. albicans* относительно всей воды в системе. Причем для последнего объекта значения были такими же, как и без добавления экстракта, что объясняется строением стенок этих клеток, обуславливающим постоянную их форму в экстремальных условиях, в том числе и при снижении температуры. На термограмме смеси экстракта с эритроцитами регистрируется размытый экзотермический пик 2 в диапазоне $-34\text{...}-46^{\circ}\text{C}$ (рис. 3, В), соответствующий, как указано выше, процессу завершения кристаллизации льда при нагреве. Интенсивность этого процесса в смеси эритроцитов



characteristic for the same processes in cell suspensions. It may be suggested that molecular interactions in the studied systems among dissolved components could activate kinetic factors, which inhibit growth of ice crystals [6]. Peak 3 in thermogram of HPEs testifies the presence of eutectic crystallization during cooling of extract.

DSC thermograms of autoclaved HPE and its mixture with erythrocytes, *C. albicans* and SPEV cells are shown in Fig. 3. It should be noted that in thermogram of autoclaved extract unlike the thermogram of fresh extract there is no peak 2 corresponding to completion of ice crystallization during heating. It is obvious that during cooling of autoclaved extract the whole liquid phase was crystallized. Moreover, according to the NMR data an amount of bound water made only 0.1–0.3% of all the water in system. Intensity of peak 3 corresponding to the melting of eutectic mixture in thermogram of autoclaved extract (Fig. 3A) is significantly higher, than the peak of fresh extract one (Fig. 2A), that testifies to crystallization of higher amount of eutectic mixture during cooling of autoclaved extract. This fact may be associated with a decreased protein content in autoclaved extracts and, accordingly, lower amount of bound water. In thermogram of autoclaved extract an exothermic phenomenon of molecule inversion (peak 1) is observed at -73°C .

In thermograms of mixture of autoclaved extract with erythrocyte sediment (Fig. 3B), *C. albicans* cells in wort (Fig. 3C) and physiological saline (Fig. 3D) no peak of eutectic mixture melting is observed. Herewith,

и автоклавированного экстракта ниже, чем в эритроцитарном осадке (см. рис. 1, В). Этот факт обусловлен меньшей вязкостью разбавленной экстрактом суспензии эритроцитов, в которой межклеточная жидкость не влияет на процесс завершения кристаллизации льда на этапе нагрева.

На ДСК-термограммах смеси автоклавированного экстракта с клетками СПЭВ, *C. albicans* в физиологическом растворе и сусле (рис. 3) пик 2 не регистрируется, так как на этапе нагрева образца процесс завершения кристаллизации льда не развивается в отличие от смесей клеток со свежеприготовленным экстрактом (см. рис. 2). В смеси автоклавированного экстракта и суспензии клеток СПЭВ регистрируется процесс плавления эвтектических составов в отличие от смеси экстракта плаценты с эритроцитами и клетками *C. albicans* (рис. 3). Причем пик плавления эвтектических составов в несколько раз интенсивнее, чем на термограммах смеси суспензии клеток СПЭВ со свежеприготовленным экстрактом плаценты (см. рис. 2, Г). В смесях суспензий клеток и автоклавированного экстракта значения температуры инверсии (пик 1) повышаются на 3–7°C, что, вероятно, объясняется связыванием молекул, участвующих в процессе инверсии, с клеточными мембранами и затруднением развития процесса инверсии. Обычно процесс инверсии протекает в узком диапазоне температур, однако нами был зарегистрирован пик в более широком температурном диапазоне. Вероятнее всего, вышеуказанный факт обусловлен тем, что в процессе участвуют молекулы со сходными значениями температуры инверсии.

Как отмечалось ранее [5], использование щадящего режима автоклавирования с малым временем нагрева (15–20 мин при температуре 120...122°C и давлении 1,8–2,0 атм) приводит к полной денатурации высокомолекулярных белков и увеличению количества белков и нуклеотидов с молекулярной массой 10–15 кДа, что способствует сохранению антиоксидантной и биологической активности экстрактов плаценты по отношению к эритроцитам. Вероятно, что в условиях выбранного нами режима автоклавирования такое перераспределение состава белков и нуклеотидов по молекулярным массам изменяет фазовое поведение смеси экстрактов и суспензий клеток при температуре ниже 0°C после их инкубирования с автоклавированными в этом режиме экстрактами плаценты.

Выводы

В результате использования щадящего режима автоклавирования на термограммах ДСК экстракта плаценты человека наблюдается экзотерми-

the amount of bound water according to the NMR data made 8–11% for erythrocytes and 9–12% for *C. albicans* relatively to whole amount of water in the system. Moreover, for the last object the values were the same as in the case without extract, that could be explained by the structure of walls of these cells, responsible for their constant shape under extreme conditions, including low temperatures. In thermogram of mixture of extract with erythrocytes a broadened exothermic peak 2 within the range of –34...–46°C is found (Fig. 3B), which corresponds as mentioned above to ice crystallization completion during heating. Intensity of this process in the mixture of erythrocytes and autoclaved extract is lower, than in erythrocyte sediment (Fig. 1B). This fact is caused by lower viscosity of erythrocyte suspension dissolved with extract, where intercellular liquid does not affect the ice crystallization completion during heating.

In DSC thermograms of mixtures of autoclaved extract with SPEV and *C. albicans* cells in physiological saline and wort (Fig. 3) no peak 2 is present, since during heating of the sample no ice crystallization completion occurs unlike mixtures of cell suspensions and fresh extract (see Fig. 2). In the mixture of autoclaved extract and SPEV cell suspension the melting of eutectic mixture is observed unlike the mixture of placental extract with erythrocytes or *C. albicans* cells (Fig. 3). Moreover, the peak of eutectic mixture melting is several times more intensive than in thermograms of mixture of SPEV cell suspension with fresh placental extract (Fig. 2G). In the mixtures of cell suspensions and autoclaved extract the values of inversion temperature (peak 1) increase by 3–7°C, that is probably explained by binding of molecules, taking part in inversion, with cell membranes and complicated development of inversion. Usually the inversion proceeds within narrow temperature range, however, we recorded the peak within broadened temperature range. Above mentioned fact is most likely stipulated by the fact that the process of inversion involves the molecules with close values of inversion temperature.

It was shown [5] that utilization of mild regimen of autoclaving with a short heating period (15–20 min at 120...122°C and 1.8–2.0 atm pressure) resulted in a complete denaturation of high-molecular proteins and increase of amount of proteins and nucleotides with molecular mass of 10–15 kDa enabling to preserve antioxidant and biological activity of placental extracts regarding to erythrocytes. Most likely, the regimen of autoclaving selected by us and the resulted redistributed by molecular masses proteins and nucleotides content contributed to the changed phase behavior of mixture of extracts and cell suspensions at the temperatures below 0°C after their incubation with placental extracts autoclaved by this regimen.



ческий эффект при -73°C , вероятно, связанный с инверсией молекул в ЭПЧ.

При замораживании автоклавированного ЭПЧ происходит полная кристаллизация льда, о чем свидетельствует отсутствие размытого экзотермического пика на термограммах ДСК, соответствующего завершению кристаллизации льда при нагреве. При этом количество связанной воды составляло 0,1–0,3% относительно всей воды в системе.

На термограммах ДСК автоклавированных экстрактов увеличивается пик плавления эвтектики на этапе нагрева, что свидетельствует о ее кристаллизации при замораживании. Однако в смеси автоклавированного ЭПЧ с суспензиями эритроцитов и клетками *C. albicans* кристаллизация эвтектических составов не развивается. При этом количество связанной воды существенно не увеличивается относительно ее величины в суспензиях клеток *C. albicans* без экстрактов.

Изменения состава экстракта плаценты человека при автоклавировании (отсутствие белков и нуклеотидов с высокими молекулярными массами и увеличение их количества с низкими (ниже 15 кДа)) влияют на фазовые переходы при низких температурах.

Conclusions

After using mild regimen of autoclaving of human placental extract the exothermic phenomenon at -73°C is observed in DSC thermograms, evidently, reflecting the inversion of HPE molecules.

During freezing of autoclaved HPEs a complete ice crystallization occurs, that is evident from the absence of broad exothermic peak in DSC thermograms, corresponding the completion of ice crystallization during heating. Herewith, the amount of bound water makes 0.1–0.3% of whole water in the system.

The peak of eutectic melting at heating increases in DSC thermograms of autoclaved extracts, testifying to eutectic crystallization during freezing. However, in mixture of autoclaved HPEs with suspensions of erythrocytes and *C. albicans* cells the crystallization of eutectic mixtures was not developed. Herewith, amount of bound water was not significantly increased relatively to its amount in *C. albicans* cell suspension without added extracts.

The changes of composition of human placental extract at autoclaving (absence of proteins and nucleotides of high molecular masses and increasing number of molecules with low masses (below 15 kDa)) affect the phase transitions at low temperatures.

Литература

1. Вирина А.М., Фейгин А.М., Белоусова И.И. и др. Изменение состава клеток *Candida albicans* при возникновении резистентности к полиеновым антибиотикам // Микробиология. – 1976. – Т. XLV, Вып. 4. – С. 679–682.
2. 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. – Киев, 1983. – 20 с.
3. Потапов В.М. Стереохимия. – М.: Химия, 1988. – 463 с.
4. Розанов Л.Ф., Высеканцев И.П., Петренко Т.Ф. и др. Чувствительность клеток перевиваемой клеточной линии СПЭВ и грибов *Candida albicans* к процессам вне- и внутриклеточной кристаллизации // Проблемы криобиологии. – 2004. – №3. – С. 18–25.
5. Розанова С.Л., Щетинский М.И., Розанова Е.Д., Нардид О.А. Некоторые свойства и биологическая активность автоклавированных экстрактов плаценты // Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования. – 2010. – Т. 2. – С.90–94.
6. Шахпаронов М.И. Механизмы быстрых процессов в жидкостях. – М.:Высш. шк., 1980. – 325 с.
7. Пат. 5120 Украина, МПК⁷ А 61 К 35/50. Спосіб переробки тканини плаценти людини / В.І. Грищенко, О.І. Осецький, Г.О. Бабійчук., Ю.Г. Федченко, М.І. Щетинський, М.О. Осецька; заявлено 07.07.2004; опубл.15.02.2005, Бюл. №2.
8. Kuntz I. D. Hydration of macromolecules // J. Amer. Chem. Soc. – 1971. – Vol. 93, №2. – P. 514–516.
9. Msogoya T. J., Maerere A. P., Nzogela Y. et. al. Changes in acidity of plant growth media during heat sterilization // J. Applied Biosciences. – 2008. – Vol. 10. – P. 488–490.

References

1. Virina A.M., Feygin A.M., Belousova I.I. et al. Change of composition of *Candida albicans* cells at occurrence of resistance to polyene antibiotics // Mikrobiologiya. – 1976. – Vol. XLV, Issue 4. – P. 679–682.
2. Zinchenko A.V. The studying of phase transitions and physical states of aqueous solutions of polyatomic alcohols within the temperature range of $-150^{\circ}\text{C} \dots 0^{\circ}\text{C}$: Abstract of the thesis of candidate of physical and mathematical sciences. – Kiev, 1983. – 20 p.
3. Potapov V.M. Stereochemistry. – Moscow: Khimiya, 1988. – 463 p.
4. Rozanov L.F., Vysekantsev I.P., Petrenko T.F. et al. Cell sensitivity of recultured cell SPEV line and *Candida albicans* fungi to extra- and intracellular crystallization processes // Problems of Cryobiology. – 2004. – N3. – P. 18–25.
5. Rozanova S.L., Schetinsky M.I., Rozanova E.D., Nardid O.A. Some properties and biological activity of autoclaved placental extracts // Vysokie tekhnologii, fundamentalnye i prikladnye issledovaniya. – 2010. – Vol. 2. – P. 90–94.
6. Shakhparonov M.I. Mechanisms of rapid processes in fluids. – Moscow: Vysshaya shkola, 1980. – 325 p.
7. Patent 5120 (Ukraine), IPC⁷ A61K35/50. Treatment method of human placental tissue / V.I. Grischenko, O.I. Osetskiy, G.O. Babiychuk, Yu.G. Fedchenko, M.I. Schetinsky, M.O. Osetska; Applied 07.07.2004; Publ. 15.02.2005. Bull. N2.
8. Kuntz I. D. Hydration of macromolecules // J. Amer. Chem. Soc. – 1971. – Vol. 93, N2. – P. 514–516.
9. Msogoya T. J., Maerere A. P., Nzogela Y. et. al. Changes in acidity of plant growth media during heat sterilization // J. Applied Biosciences. – 2008. – Vol. 10. – P. 488–490.



10. Onuaguluchi G., Ghasi S. The pharmacological basis for the use of dried placenta in traditional obstetric practice in Nigeria // J. Ethnofarmacology. – 1996. – Vol. 54, №1. – P.27–36.
 11. Shibasaki T., Odagiri E., Shizume K., Ling N. Corticotropinreleasing factor like activity in human placental extracts // J. Clin Endocrinol. Metab. – 1982. – Vol. 55. – P. 384–386.
 12. Shinde V., Dhalwal K., Paradkar A.R. et. al. Evaluation of in-vitro antioxidant activity of human placental extract // Pharmacology online. – 2006. – Vol. 3. – P. 172–179.
 13. Togashi S., Takashi N., Kubo Y. et. al. Purification and identification of antioxidant substances in human placenta extracts // J. Health Sci. – 2000. – Vol. 46, №2. – P. 117–125.
10. Onuaguluchi G., Ghasi S. The pharmacological basis for the use of dried placenta in traditional obstetric practice in Nigeria // J. Ethnofarmacology. – 1996. – Vol. 54, №1. – P.27–36.
 11. Shibasaki T., Odagiri E., Shizume K., Ling N. Corticotropinreleasing factor like activity in human placental extracts // J. Clin Endocrinol. Metab. – 1982. – Vol. 55. – P. 384–386.
 12. Shinde V., Dhalwal K., Paradkar A.R. et. al. Evaluation of in-vitro antioxidant activity of human placental extract // Pharmacology online. – 2006. – Vol. 3. – P. 172–179.
 13. 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.

