DOI: 10.26693/jmbs07.05.278
УДК 57.086.13;57:536.483
*Рєпін М. В., Марченко Л. М., Чиж Ю. О.,*
*Говоруха Т. П., Строна В. І.*

# КІЛЬКІСНИЙ ТА ЯКІСНИЙ СКЛАД КРІОЕКСТРАКТІВ ПЛАЦЕНТИ ЩУРІВ ДО ТА ПІСЛЯ ЛІОФІЛІЗАЦІЇ

**Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України,**
**Харків, Україна**

*Метою* даної роботи було дослідити за допомогою гель-проникної хроматографії пептидний склад кріоекстрактів із тканини плаценти щурів до та після низькотемпературного зберігання та ліофілізації.

*Матеріали та методи.* Кріоекстракти (КЕП) одержувались із гомогенатів тканини плаценти щурів самиць методом заморожування (–20 °С, 1 доба), наступного відігріву, центрифугування. Аналізувались наступні види кріоекстрактів: КЕП-1 – безпосередньо після виготовлення; КЕП-2 – заморожений до –196 °С, який зберігався 1 місяць при цій температурі; КЕП-3 – підданий кріосублімації після зберігання при –196 °С і розморожування. Окремі фракції кріоекстрактів одержували методом гель-хроматографії на колонці 27х2 см з сефадексом G-100. Вміст білка вимірювали спектрофотометричним методом. Кількісну та якісну оцінку пептидного складу кріоекстракту для речовин молекулярною масою (Мм) від 100 до 12000 Да проводили за допомогою гель-проникної хроматографії на колонці розміром 400 × 16 мм, заповненої полівініловим гелем.

*Результати та обговорення.* При аналізі гель-хроматограм виявлено, що об'ємна доля білка з Мм від 20 до 150 кДа в кріоекстракті плаценти складала 80,28 %, а сумарна концентрація білка дорівнювала 23,81±1,03 мг/мл. Доля низькомолекулярних фракцій з молекулярною масою від 12 до 4 кДа складала 19,60%. За даними методу гель-проникної хроматографії виявлено, що екстракти містили від 7 до 10-12 білково-пептидних фракцій з Мм від 447 до ≥12000 Да. Основними піками були піки Pr з Мм ≥12000, а також піки груп: A (Мм від 7500 до 2000 Да), B (Мм від 1413Да), C (Мм від 888 до 949 Да); D (Мм від 706 до 694 Да), E (Мм 846 Да), F (Мм 556 Да), H (Мм 447 Да). Екстракти КЕП-1 були представлені в основному п'ятьма фракціями групи А, частка яких становила 7,59% від загального обсягу кріоекстракту. Об'ємна частка низькомолекулярних пептидів Мм від 1249 до 706 Да становила 20,82%. У кріоекстрактів після зберігання при –196 °С (КЕП-2), об'ємна частка фракцій групи А становила 7,76%, низькомолекулярна фракція – 25,15%. У екстрактів після сублімації (КЕП-3) були відсутні 5 високомолекулярних пептидних фракцій групи А і відзначалась наявність 6 низькомолекулярних пептидних фракцій – піки B, C, E, F, H, з Мм від 1873 до 447 Да. Сумарна об'ємна частка низькомолекулярної фракції була значна і становила 24,97%.

*Висновки.* У кріоекстрактах, підданих ліофілізації, спостерігалося зростання об'ємної частки як високомолекулярних фракцій, так і пептидів молекулярною масою до 1000 Да, що може бути пов'язано з коагуляцією білків, а також їх руйнуванням в процесі сублімаційного висушування. За умов заморожування до –196 °С та ліофілізації кріоекстракту спостерігалась стійка тенденція до збільшення вмісту низькомолекулярних сполук пептидної природи.

**Ключові слова:** кріоекстракт плаценти, гель-проникна хроматографія, ліофілізація, низькотемпературне зберігання.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Робота виконана за планом НДР «Дослідження впливу кріоекстрактів фетоплацентарного походження на процеси регенерації тканини нирок та функціональний стан нирок щурів в умовах гострого ураження різної етіології», № державної реєстрації 0116U003495.

**Вступ.** Відомо, що біологічні структури різного ступеня організації (клітини, органоїди, комплекси макромолекул і макромолекули різної природи) можуть пошкоджуватися під впливом низьких температур та ліофілізації внаслідок фізико-хімічних факторів (зневоднення, зміна pH середовища, підвищення концентрації електролітів) [1, 2]. Результатами такого впливу є денатурація білків, ушкодження мембран клітин та органоїдів, розрив міжмолекулярних зв'язків та ін. До дії вказаних факторів менш чутливі низькомолекулярні речовини (пептиди, полісахариди, амінокислоти, нуклеотиди), тому вони можуть зберігатися певний час у ліофілізованому стані або при помірно низьких температурах (–80…–130 °С). При температурі –80 °С з біомолекулами ще залишається міцно пов'язана вода, що сприяє їх низькотемпературній стабілізації [2]. Вибраний спосіб ліофілізації з залишковою вологістю 1–2% у висушеному біопрепараті дозволяє підтримувати конформацію біологічних полімерів, які після регідратації не втрачають свої біологічні властивості. Попереднє заморожування

зразка фіксує його молекулярну структуру, а подальше сушіння в режимі кріосублімації практично пригнічує окислювальні процеси, оскільки дифузія молекулярного кисню вкрай утруднена в замороженому стані, зразок постійно перебуває у вакуумі та не контактує з киснем [3]. Це зумовлює перспективу зберігання зразків у даних умовах.

**Метою** даної **роботи** було дослідити за допомогою гель-проникної хроматографії пептидний склад кріоекстрактів із тканини плаценти щурів до та після низькотемпературного зберігання та ліофілізації.

**Матеріал та методи дослідження.** Матеріалом дослідження були кріоекстракти, які були отримані з гомогенатів плаценти білих безпородних щурів самиць (n=5) на 18-ту добу вагітності.

Всі маніпуляції з тваринами проводились відповідно до положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 2005) і «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», схвалених V Національним конгресом з біоетики (Київ, 2013).

Кріоекстракти одержувались із гомогенатів тканини плаценти (КЕП) за класичною методикою – одноразове заморожування (–20 °С, 1доба), наступний відігрів, центрифугування [4]. Аналізувались наступні види кріоекстрактів: КЕП-1 – безпосередньо після виготовлення; КЕП-2 – заморожений до –196 °С, який зберігався 1 місяць при цій температурі; КЕП-3 – підданий кріосублімації після зберігання при –196 °С і розморожування.

Окремі фракції кріоекстрактів, об'єм яких складав 3 мл, одержували методом гель-хроматографії на колонці 27х2 см з сефадексом G-100 («Pharmacia Fine Chemicals UppSala», Швеція). На колонку наносили 3 мл кріоекстракту. Для калібрування колонки використовували сироватковий альбумін бика (САБ) з молекулярною масою (Мм) 66 кДа (Sigma), цитохром С Мм 12 кДа (Sigma).

Вміст білка у кріоекстрактах та їх фракціях вимірювали спектрофотометричним методом [5] на спектрофотометрі "Pye Unicam SP 8000" (Велика Британія).

Кількісну та якісну оцінку пептидного складу кріоекстракту для речовин молекулярною масою від 100 до 12000 Да проводили також за допомогою гель-проникної хроматографії [6] на колонці розміром 400 × 16 мм, заповненої полівініловим гелем TSK-Gel Toyopearl HW-40 Fine (Toyo Soda Manufacturing Co, Японія). Через петльовий інжектор в колонку вводились проби в об'ємі 0,2 мл і за допомогою перистальтичного насоса Microperpex LKB 2132 (Швеція) подавався елюювальний буферний фосфатно-сольовий розчин (18 мМ $Na_2HPO_4$, 12 мМ $NaH_2PO_4$, 100 мМ NaCl; pH 7,4). Швидкість потоку елюєнтів становила 1,63 мл/хв. Отримані фракції низькомолекулярних речовин білково-пептидної природи реєстрували за допомогою ультрафіолетового оптичного монітора Uvicord SII LKB 2238 (Швеція) за довжини хвилі 280нм. Сигнал монітора записувався у вигляді хроматограм 2-канальним самописним потенціометром Recorder LKB 2210 (Швеція) і подавався на інтегратор Waters 746 Data Module (США), що записує час утримання фракції та площу під піком [6]. Статистичну обробку результатів проводили за допомогою програмного пакета Statgraphics Plus version 2.1 для операційної системи Windows (Manugistic, Rockville, MD, USA).

**Результати дослідження та їх обговорення.** При аналізі гель-хроматограми виявлено, що об'ємна доля білка з Мм від 20 до 150 кДа в кріоекстракті плаценти складала 80,28 %, а сумарна концентрація білка дорівнювала 23,81±1,03 мг/мл. Як видно з хроматограми (**рис. 1**), доля низькомолекулярних фракцій (№ 23–30) з молекулярною масою від 12 до 4 кДа була незначна і складала 19,60%.

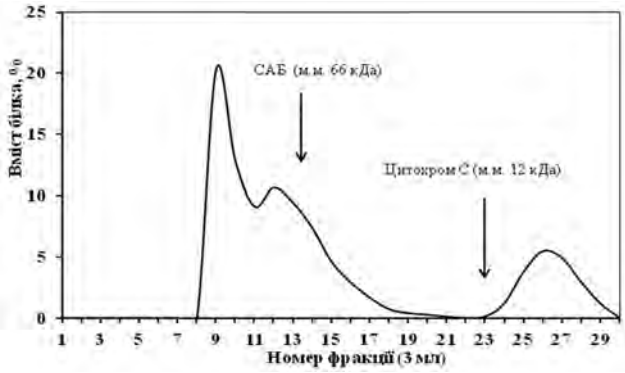


**Рис. 1** – Гель-хроматограма кріоекстракту з плаценти щура

В наступному фрагменті роботи за допомогою гель-проникної хроматографії було досліджено склад та розподіл за молекулярною масою речовин білково-пептидної природи кріоекстрактів плаценти щура, виготовлених за класичною методикою та після зберігання при –196 °С. Частина кріоекстрактів зазнала сублімаційного сушіння, для яких так само аналізувався розподіл за молекулярною масою. В результаті аналізу експериментальних даних встановлено, що екстракти містять від 7 до 10-12 білково-пептидних фракцій з Мм від 447 до ≥12000 Да. Основними піками, які були виявлені в результаті аналізу хроматографічного поділу низькомолекулярних речовин білкової та пептидної природи з кріоекстрактів, є піки Pr з молекулярною масою ≥12000, а також піки груп: A (Мм від 7500 до 2000 Да), B (Мм від 1413 Да ), C (Мм від 888 до 949 Да); D (Мм від 706 до 694 Да). а також E (Мм 846 Да), F (Мм 556 Да), H (Мм 447 Да) (**рис. 2, табл. 1**).

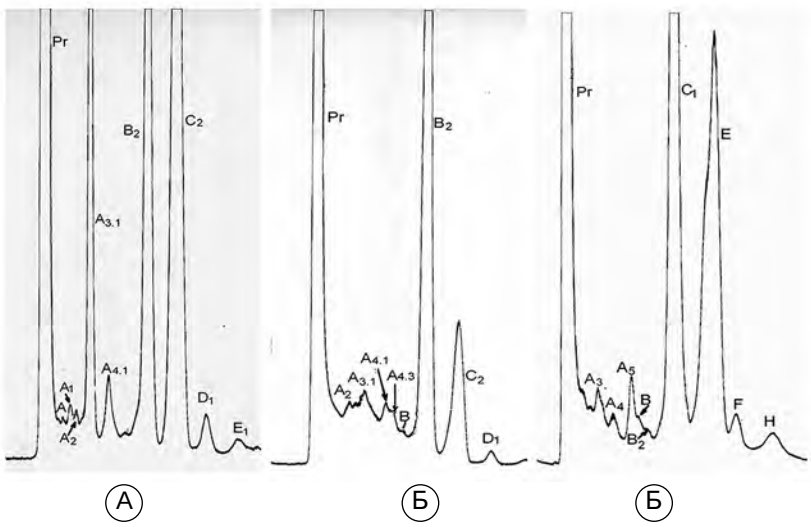


**Рис. 2** – Типові хроматограми розподілу білково-пептидних фракцій кріоекстрактів плаценти щурів:
а – КЕП-1; б – КЕП-2; в – КЕП-3

Для КЕП-1 білкова фракція, молекулярна маса якої більша за 12000 Да, становила 71,42±3,57% від загального обсягу кріоекстракту. Ці екстракти представлені в основному п'ятьма фракціями групи А (піки А, $A_1$, $A_2$ та $A_{3.1}$, $A_{4.1}$), яка містить високомолекулярні пептидні фракції від 7500 до 2500 Да (**табл. 1**). Проте частка цих фракцій незначна і становила 7,59% від загального обсягу кріоекстракту. Із пептидних фракцій найбільше були представлені низькомолекулярні пептиди Мм від 1249 до 706 Да. Їхня об'ємна частка становила 20,82%.

Як видно з **рис. 2**, якісний склад низькомолекулярних речовин пептидної природи кріоекстрактів плаценти в процесі низькотемпературного зберігання та ліофілізації суттєво змінювався. У кріоекстрактів, після зберігання при –196 °С (КЕП-2), об'ємна частка фракцій групи А становила 7,76%. Низькомолекулярна фракція в обсязі 25,15% та була представлена групами: В (Мм 1754 Да), $B_2$ (Мм 1241 Да), $C_2$ (Мм 888 Да), $D_1$ (Мм 694 Да). Білкова фракція з молекулярною масою більше 12 кДа, становила 67,09% від загального обсягу кріоекстракту.

Слід зазначити, що у екстрактів після сублімації були відсутні 5 високомолекулярних пептидних фракцій (піки А, $A_1$, $A_2$, $A_{3.1}$, $A_{4.1}$) і відзначалась наявність 6 низькомолекулярних пептидних фракцій – піки В (Мм 1873 Да), С (Мм 949 Да), Е (Мм 846 Да), F (Мм 556 Да), Н (Мм 447 Да).

**Таблиця 1** – Характер розподілу білково-пептидних фракцій КЕП щурів за молекулярною масою.

| | КЕП-1 | | КЕП-2 –196 °С | | КЕП-3 сублімований | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Фракція** | **Площа піка, %** | **Середня молекулярна маса фракції, Да** | **Площа піка, %** | **Середня молекулярна маса фракції, Да** | **Площа піка, %** | **Середня молекулярна маса фракції, Да** |
| Pr. | 71,42±3,57 | ≥12000 | 67,09±4,13 | ≥12000 | 74,28±4,35 | ≥12000 |
| A | 0,26±0,011 | 7500 | | | | |
| $A_1$ | 0,42±0,019 | 6298 | | | | |
| $A_2$ | 0,31±0,015 | 5396 | 1,42±0,058 | 5315 | | |
| $A_3$ | | | | | 0,25±0,010 | 4651 |
| $A_{3.1}$ | 5,52±0,265 | 3771 | 3,71±0,152 | 3771 | | |
| $A_4$ | | | | | 0,14±0,005 | 3013 |
| $A_{4.1}$ | 1,08±0,055 | 2512 | 1,54±0,078 | 2452 | | |
| $A_{4-3}$ | | | 1,09±0,943 | 2167 | | |
| $A_5$ | | | | | 0,36±0,013 | 1978 |
| B | | | 0,42±0,017 | 1754 | 0,30±0,012 | 1873 |
| $B_2$ | 8,70±0,426 | 1249 | 20,12±1,026 | 1241 | | |
| $C_1$ | | | | | 13,88±0,680 | 949 |
| $C_2$ | 11,60±0,545 | 902 | 4,36±0,187 | 888 | | |
| $D_1$ | 0,53±0,021 | 706 | 0,25±0,009 | 694 | | |
| E | | | | | 9,91±0,466 | 846 |
| F | | | | | 0,52±0,023 | 556 |
| H | | | | | 0,36±0,014 | 447 |

Частка фракцій $A_3$ та $A_4$ з молекулярною масою 4651 та 3013 Да була незначна і становила 0,39%. Об'ємна частка низькомолекулярних пептидів з молекулярною масою від 1873 до 447 Да була значна і становила 24,97%. Білкова фракція з молекулярною масою більше 12 кДа, складала 74,28±4,35% від загального обсягу кріоекстракту.

Як було зазначено вище, вибраний спосіб низькотемпературного зберігання та ліофілізації дозволяє підтримувати конформацію біологічних полімерів, які після регідратації не втрачають свої біологічні властивості [2]. Поява нових фракцій молекул з іншими молекулярними масами, що відображає перебудови, які відбуваються наприклад у плазмі крові, можуть бути опосередковані впливом гіпотермії на організм [7]. У цій роботі зроблено спробу оцінити вплив таких фізичних факторів як низькі температури, умови сублімаційного висушування на кількісні параметри біологічного об'єкту – екстракту, який звичайно позбавлений зв'язку з організмом. В літературі практично не зустрічаються кількісні характеристики змін у білково-пептидному складі кріоекстрактів плаценти після низькотемпературного зберігання та ліофілізації, проте це важливо для їх використання в якості лікувального засобу на рівні клітин та організму.

**Висновки**. Таким чином, у кріоекстрактах, підданих ліофілізації, спостерігалося зростання об'ємної частки як високомолекулярних фракцій, так і пептидів молекулярною масою до 1000 Да, що може бути пов'язано з коагуляцією білків, а також їх руйнуванням в процесі сублімаційного висушування.

За умов заморожування до –196 °C та ліофілізації кріоекстракту спостерігалась стійка тенденція до збільшення вмісту низькомолекулярних сполук пептидної природи.

**Перспективи подальших досліджень**. Планується порівняльне дослідження пептидного складу кріоекстрактів плаценти та фетальних тканин щурів за різних умов їх виготовлення, низькотемпературного зберігання та ліофілізації для подальшого застосування з лікувально-профілактичною метою при патології нирок в експерименті.

## References


1. Fuller B, Green C, Grischenko VI. Cryopreservation for cell banking: current concepts at the turn of the 21st century. *Probl Cryobiol.* 2003;13(2):62–83.
2. Gulevskyy O, Moiseyeva N, Gorina O, Nikolchenko A, Schenyavsky I. Comparative Evaluation of biological activity of fraction below 5 kDa from cattle cord blood after low-temperature storage (at –80°C) or lyophilization to treat burn wounds in rats. *Probl Cryobiol Cryomed*. 2020;30(1):47–57. doi: 10.15407/cryo30.01.047
3. Osetsky AI, Grishchenko VI, Snurnikov AS, Osetskiy AI, Shabanov IYe, Babijchuk GA. Cryosublimation fractionation of biological materials. *Probl Cryobiol*. 2006;16(2):230-40.
4. Repin NV, Chizh YuA, Marchenko LN, Govorukha TP. Morfologicheskaya kharakteristika endoteliya aorty krys s pochechnoy nedostatochnostyu posle korrektsii allogennym krioekstraktom platsenty [Morphological characteristics of aortal endothelium in rats with renal insufficiency following correction by allogenic placental cryoextract]. *Ukr ž med bìol sportu*. 2020;4(26):379–85. [Russian]. doi: 10.26693/jmbs 05.04.379
5. Harris DA. Spectrophotometric assays. In: *Spectrophotometry & spectrofluorimetry*. Washigton: IRL Press; 1987. p. 49–90.
6. Shevchenko MV, Sukach AN, Semenchenko AYu. Molecular mass distribution of peptides in rat tissue extracts depending on the stage of their development. *Bulletin of Problems of Biology and Medicine*. 2013;3(2):103–107.
7. Shylo OV, Lomako VV, Semenchenko OYu. Gel Chromatographic Examination of Serum of Rats and Hamsters Under Artificial and Natural Hibernation. *Probl Cryobiol Cryomed.* 2021;31(3):191–202. doi: 10.15407/cryo31.03.191


**UDC** 57.086.13;57:536.483

**Quantitative and Qualitative Composition of Rat Placental Cryoextracts prior to and after Lyophilization**

***Repin N. V., Marchenko L. N., Chizh Yu. A., Govorukha T. P., Strona V. I.***

**Abstract.** *The purpose of the study* was to investigate a peptide composition of cryoextracts from rat placental tissue using a gel-penetrating chromatography prior to and after low temperature storage and lyophilization.

*Materials and methods*. Cryoextracts were harvested from tissue homogenates of the rat placenta with a method of freezing (-20°C, 1 day), subsequent thawing and centrifugation. The following types of cryoextracts were analyzed: cryoextracts-1 – immediately after preparation; cryoextracts-2 – frozen down to –196 °C and stored for 1 month at this temperature; cryoextracts-3 – subjected to cryosublimation after storage at –196 °C and thawing. Separate fractions of cryoextracts were obtained with a method of gel chromatography using columns of 27x2 cm with a Sephadex G-100. Protein load was measured with a method of spectrophotometry.

The quantitative and qualitative evaluation of a peptide content in the substances with molecular masses from 100 to 12,000 Da was done with the help of gel-penetrating chromatography with a column of 400x16 mm, filled with a polyvinyl gel.

*Results and discussion*. The analysis of gel chromatograms showed the volume ratio of proteins with molecular masses from 20 to 150 kDa in placental cryoextracts to be 80.28%, while total concentration of protein equaled 23.81 ± 1.03 mg/ml. A portion of low molecular fractions with molecular masses from 12 to 4 kDa comprised 19.60%. The data, obtained by gel-penetrating chromatography, demonstrated the extracts to contain from 7 to 10–12 protein-peptide fractions with molecular masses from 447 to ≥12,000 kDa. The basic points were the peaks Pr with molecular masses ≥12000 Da, and also in the following groups: A (molecular masses from 7,500 to 2,000 Da), B (molecular masses from 1,413 Da), C (molecular masses from 888 to 949 Da), D (molecular masses from 706 to 694 Da), E (molecular masses of 846 Da), F (molecular masses of 556 Da) and H (molecular masses of 447 Da). The cryoextracts-1 were represented mainly by 5 fractions of the group A, while comprised 7.59% from the total volume of a cryoextract. The volume ratio of low molecular peptides with molecular masses from 1,249 to 706 Da was 20.82%. In cryoextracts, stored at –196 °C (cryoextracts-2), the volume ratio of the group A fractions comprised 7.76%, while concentration of low molecular fraction was as high as 25.15%. In cryoextracts, subjected to sublimation (cryoextracts-3), 5 high molecular peptide fractions of the group A were missing. The total volume ratio of low molecular fraction was significant and comprised 24.97%. It contained 6 low molecular peptide fractions – peaks B, C, E, F, H with molecular masses from 1,873 to 447 Da.

*Conclusion*. Cryoextracts, subjected to freeze-drying, demonstrated an increase in the volume ratio of both high molecular fractions and peptides with molecular masses up to 1,000 Da, which may be due to coagulation of proteins as well as their destruction in the process of evaporative drying. Freezing down to –196 °C and lyophilization of cryoextracts resulted in a strong tendency to increase the content of low molecular compounds of a peptide nature.

**Keywords:** placental cryoextracts, gel-penetrating chromatography, lyophilization, low-temperature storage.

**ORCID and contributionship:**
Nikolay V. Repin : 0000-0001-8983-4789 [A,D,F]
Larisa N. Marchenko : 0000-0002-5152-2218 [B,D,E]
Yulia A. Chizh : 0000-0001-7529-6326 [B,C]
Tatyana P. Govorukha : 0000-0002-5293-6324 [B,C]
Vera I. Strona : 0000-0003-0939-6833 [E]

A – Work concept and design, B – Data collection and analysis,
C – Responsibility for statistical analysis, D – Writing the article,
E – Critical review, F – Final approval of the article

**CORRESPONDING AUTHOR**
**Nikolay V. Repin**
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National
Academy of Sciences of Ukraine,
Laboratory of Cryomorphology
23, Pereyaslavskaya St., Kharkiv 61015, Ukraine
tel: +38057 373 4143, e-mail: cryo.ua@gmail.com

*The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of coauthors of the article.*

Стаття надійшла 15.08.2022 р.
*Рекомендована до друку на засіданні редакційної колегії після рецензування*