

УДК 57.043:611.013.85:577.3

О.А. Нардід*, К.Д. Розанова, Я.О. Черкашина, С.В. Репіна, Е.О. Нардід

Вплив зберігання тканини плаценти при -20°C на властивості її водно-сольових екстрактів

UDC 57.043:611.013.85:577.3

О.А. Nardid*, K.D. Rozanova, Ya.O. Cherkashina, S.V. Repina, E.O. Nardid

Effect of Storage of Placenta Tissue at -20°C on Properties of Its Aqueous and Saline Extracts

Реферат: Метою роботи було дослідження впливу зберігання тканини плаценти людини при -20°C на властивості отриманих з неї водно-сольових екстрактів і деяких їх фракцій. У роботі використовували методи гель-хроматографії, оптичну спектроскопію та ЕПР спінового зонда. Методом ЕПР спінового зонда показано, що експозиція еритроцитів із фракцією екстрактів плаценти людини менше 5 кДа не впливала на мікр'язкість цитозолу еритроцитів. Поряд із цим спостерігалась модифікація температурної залежності рухливості спінового зонда при експозиції із такою ж фракцією екстрактів тканин плаценти, які зберігалися 6 місяців при -20°C . Цей факт узгоджується зі зниженням кислотної стійкості еритроцитів під дією цієї фракції.

Ключові слова: низькотемпературне зберігання, екстракти плаценти, еритроцити, кислотна стійкість, електронний парамагнітний резонанс.

Реферат: Целью работы являлось исследование влияния хранения ткани плаценты человека при -20°C на свойства полученных из нее водно-солевых экстрактов и некоторых их фракций. В работе использовали методы гель-хроматографии, оптическую спектроскопию и ЭПР спинового зонда. Методом ЭПР спинового зонда показано, что экспозиция эритроцитов с фракцией экстрактов плаценты человека меньше 5 кДа не влияла на микровязкость цитозоля эритроцитов. Наряду с этим наблюдалась модификация температурной зависимости подвижности спинового зонда при экспозиции с такой же фракцией экстрактов тканей плаценты, которые хранились 6 месяцев при -20°C . Это согласуется со снижением кислотности устойчивости эритроцитов под действием этой фракции.

Ключевые слова: низкотемпературное хранение, экстракты плаценты, эритроциты, кислотная устойчивость, электронный парамагнитный резонанс.

Abstract: Research was aimed to study the effect of human placenta tissue storage at -20°C on the features of procured from it aqueous-saline extracts and their certain fractions. The methods of gel-chromatography, optical spectroscopy and spin probe EPR were used in the research. Spin probe EPR demonstrated the exposure of erythrocytes with fraction of human placenta extracts below 5 kDa as not affecting the microviscosity of erythrocyte cytosol. Along with that we observed the modification of temperature dependence of spin probe mobility under exposure with the same fraction of placenta extracts, stored for 6 months at -20°C . This correlated with a decrease in acid resistance of erythrocytes under the effect of this fraction.

Key words: low temperature storage, placenta extracts, erythrocytes, acid resistance, electron paramagnetic resonance.

Вивчення змін, які відбуваються у тканинах і розчинах біомакромолекул у процесі низькотемпературного зберігання, є однією з важливих задач кріобіології. До об'єктів, для яких рішення цієї задачі має не тільки теоретичне, але й практичне значення, відносять плаценту людини, оскільки її екстракти виявилися ефективними при корекції різних патологічних порушень в організмі людини [1–3]. Відомо, що плацента містить великий набір гормонів, вітамінів, імунорегуляторів, факторів росту та інших біологічно активних речовин, які забезпечують розвиток плода [1, 8].

Істотною перешкодою для застосування у клінічній практиці фетоплацентарного матеріалу є ко-

Studying the changes occurring in tissues and solutions of biomacromolecules during low temperature preservation is one of the most important tasks of cryobiology. The objects for which the solution of this task has both theoretical and practical value include human placenta because its extracts appeared to be effective when correcting the various pathological disorders in human organism [5–7]. Placenta is known to comprise a wide range of hormones, vitamins, immune regulators, growth factors and other biologically active substances providing fetus development [5, 15].

Significant obstacle for applying fetoplacental material in clinical practice is a short time period since its procurement till using due to autolysis occurring during

Відділ кріобіофізики, Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:
вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61015;
тел.: (+38 057) 373-31-41, факс: (+38 057) 373-30-84,
електронна пошта: olnard@mail.ru

Надійшла 23.07.2013
Прийнята до друку 27.09.2013

Проблемы кріобіології і кріомедицини. – 2014. – Т. 24, №1. – С. 28–37.
© 2014 Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України

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 3733141, fax: +380 57 373 3084,
e-mail: olnard@mail.ru

Received August 23, 2013
Accepted September 27, 2013

Probl. Cryobiol. Cryomed. 2014. 24(1): 28–37.
© 2014 Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

роткий термін від його одержання до використання внаслідок аутолізу при гіпотермічному зберіганні [7]. Це також не дозволяє якісно провести тестування тканин для виключення бактеріальної та вірусної контамінації. Тому розробка методів низькотемпературного зберігання тканини та екстрактів плаценти людини (ЕПЛ) допоможе розширити можливості їх застосування в медицині [12].

Дослідження, проведені в ІПКіК НАН України, дозволили встановити дію низьких температур на активність дегідрогеназ, вміст гормонів і стан ліпопероксидації в аlogenній плаценті, а також вплив препаратів кріоконсервованої плаценти на показники перекисного окислення у хворих стабільною стенокардією [14]. Антиокислювальна активність і активність супероксиддисмутази у сироватці крові, серці та печінці тварин після введення кріоконсервованого екстракту плаценти нормалізувалися, що свідчило про позитивний стабілізуючий вплив на організм [13].

У клінічній практиці препарати з плаценти використовуються у вигляді фрагментів тканини, гомогенатів, водно-сольових і спиртових екстрактів після низькотемпературного зберігання і ліофілізації, тому важливим є пошук їхньої діючої основи.

За результатами наших досліджень було встановлено, що властивості ЕПЛ залежать від морфофункціонального стану початкового матеріалу, а також екстракти відрізняються за концентрацією білків і нуклеотидів та їх розподілом за молекулярними масами [9]. Було також показано, що при зберіганні плаценти більше місяця за температури -20°C знижується активність окислювально-відновного процесу в екстрактах [10].

Зважаючи на те, що використання ЕПЛ у клінічній практиці є досить перспективним [2], виникає потреба в попередньому їх тестуванні *in vitro* на клітинних суспензіях, наприклад на суспензії еритроцитів. Ці клітини є зручною й обґрунтованою моделлю для досліджень, оскільки вони функціонують в усіх частинах організму, добре вивчені та мають простішу структуру порівняно з ядромісними клітинами. За станом і властивостями мембран, цитозолу і гемоглобіну еритроцитів донорської крові можна об'єктивно судити про процеси, що проходять у клітинах під дією біологічно активних компонентів фракцій ЕПЛ, у тому числі із плацент після їх заморожування-відігріву і зберігання за низьких температур.

Таким чином, необхідно визначити вплив низькотемпературного зберігання плаценти на біологічну активність окремих фракцій екстрактів відносно еритроцитів. Значення таких досліджень визначається до того ж підвищеною увагою до біологічної активності та терапевтичної ефективності низь-

hypothermic storage [13]. Moreover, this does not enable to thoroughly tests the tissues to exclude bacterial and viral contamination. Thus it is obvious, that development of methods for low temperature preservation of human placenta extracts (HPE) and tissues will promote to extend the possibilities of their application in medicine [19].

The studies carried out at the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine allowed to determine the effect of low temperatures on activity of dehydrogenases, content of hormones and state of lipoperoxidation in allogeneic placenta, as well as to estimate an impact of cryopreserved placenta preparations on the indices of peroxidation in patients with stenocardia [20]. Antioxidant activity and superoxide dismutase activity in blood serum, heart and liver of mammals after injection of cryopreserved placenta extract were restored to the norm, indicating a positive stabilizing effect on an organism [3].

Clinical practice utilizes such placenta preparations as tissue fragments, homogenates, aqueous-saline and alcoholic extracts after low temperature preservation or freeze-drying, so the determination of their active agents is important.

The results of our studies showed that HPE properties depended on morphofunctional state of primary material and the extracts differed by concentration of proteins and nucleotides and their molecular weight distribution [17]. Moreover, we have established that the activity of redox processes in extracts were decreased if the placenta was stored more than one month at -20°C [18].

Considering the fact that application of HPE in clinical practice is quite prospective [6], it is necessary to perform preliminary *in vitro* tests with cell suspensions, for instance erythrocytes. These cells are convenient and feasible model for investigations, since they function in all the parts of an organism, are well studied and have much simpler structure if compared to the nucleated cells. By the state and properties of membranes, cytosol and hemoglobin of donor blood erythrocytes one can reasonably judge about the processes occurring in cells under effect of biologically active components of HPE fractions, including ones from placentas after their freeze-thawing and storage at low temperatures.

Collectively, we have to determine the effect of low temperature storage of placenta on biological activity of isolated fractions of the extracts in relation to erythrocytes. Moreover, the importance of such research is stipulated by an increased attention to biological activity and therapeutic efficiency of low-molecular fractions (to 5 kDa) derived from cryohemolysate of bovine cord blood [8] as well as from brain of fish adapted to cold [9]. Such isolated fraction of placenta aqueous-saline extract was not analyzed so far.

комолекулярних фракцій (до 5 кДа), отриманих як з криогемолізату кордової крові великої рогагої худоби [4], так і з мозку адаптованих до холоду риб [5]. Аналогічна фракція з водно-сольового екстракту плаценти в ізольованому стані не досліджувалась.

Мета роботи – дослідити вплив зберігання тканини плаценти при -20°C на властивості отриманих з неї водно-сольових екстрактів і деяких їхніх фракцій відносно взаємодії з мембранами та цитозолем еритроцитів.

Матеріали та методи

У дослідженнях використовували екстракти плаценти людини. Плацента була одержана від породілей із їхньої інформованої згоди в Українському науково-практичному центрі акушерства, гінекології та репродуктології МОЗ України (м. Харків). Для приготування екстрактів плаценту ретельно відмивали від слизу і крові ізотонічним розчином NaCl, який декілька разів змінювали. Відміту плаценту переносили у лоток і ножицями відділяли плідні оболонки (амніотичну та хоріальну), після чого шматками 3×2 см зрізали тонкий шар тканини в зоні котиледонів. Одержані фрагменти плаценти занурювали у ємність із фізіологічним розчином у співвідношенні плаценти і розчину 1:5 та перемішували 2–3 хв. Надосад зливали і додавали свіжу порцію фізіологічного розчину, повторюючи цю процедуру 3–4 рази. Для отримання ЕПЛ до відмитих шматочків плаценти додавали 0,15 М NaCl у об'ємному співвідношенні 1:1 та гомогенізували на високошвидкісному гомогенізаторі MPW-302 протягом 5 хв, після чого витримували 12 годин при 4°C і центрифугували впродовж 15 хв при 1500g. Надосадову рідину відбирали і фільтрували. Фільтрат, що є ЕПЛ, розливали в пробірки для подальших досліджень. Частину плаценти заздалегідь заморожували при низьких швидкостях (от 1 до 7 град/хв) і зберігали за температури -20°C . Після розморожування із плаценти отримували екстракти як описано вище. Подібність досліджуваних ЕПЛ контролювали методом гель-хроматографії, а також за вмістом білка. Для досліджень використано ЕПЛ від десяти породілей.

Окремі фракції екстрактів об'ємом 3 мл одержували методом гель-хроматографії з сефадексом G-200 на колонці 21×2 см. Для калібрування колонок використовували блакитний декстран з м.м. 2000 кДа («Sigma», США), глюкозооксидазу з м.м. 180 кДа («Faizyme», ПАР), сироватковий альбумін бика з м.м. 66 кДа («Sigma»), цитохром С з м.м. 12 кДа («Sigma»). Вміст білка в екстрактах і фракціях вимірювали спектрофотометричним методом [18]. Усі спектрофотометричні дослідження прово-

The objective of the research was to study the effect of storage of placenta tissue at -20°C on the properties of derived from it aqueous-saline extracts and their several fractions with respect to interrelation with membranes and erythrocyte cytosol.

Materials and methods

The research was carried out in human placenta extracts. Placenta was obtained from women in labour with their informed consent in Ukrainian Scientific-Practical Center of Obstetrics, Gynecology and Reproductivity of the Ministry of Healthcare of Ukraine (Kharkiv, Ukraine). To prepare the extracts, placenta was thoroughly washed from mucus and blood with isotonic NaCl solution which was changed several times. The washed placenta was transferred into dish and fetal membranes (amniotic and chorial) were separated by scissors, afterwards thin tissue layers were cut as 3×2 cm slices in cotyledon zone. The derived placenta fragments were plunged into the container with physiological saline in 1:5 placenta/solution ratio and mixed for 2–3 min. The supernatant was poured and supplemented with a fresh portion of physiological saline, this procedure was repeated 3–4 times. To derive HPE the washed placenta pieces were mixed with 0.15 M NaCl solution in 1:1 volumetric ratio and homogenized with a high speed homogenizer MPW-302 for 5 min, afterwards the mixture was kept for 12 hrs at 4°C and centrifuged during 15 min at 1500g. The supernatant liquid was collected and filtered. The filtrate, which was the HPE, was poured to vials for the further studies. The part of placentas was previously frozen with low cooling rates (from 1 to 7 deg/min) and stored at -20°C . After thawing the extracts were procured from placentas as described above. The similarity of the studied HPEs was controlled by gel chromatography as well as by protein content. For our research we have used HPEs from placentas of ten women in labour.

Isolated fractions of extract of 3 ml volume were obtained by gel chromatography with Sephadex G-200 in 21×2 cm column. To calibrate the columns we used blue dextran of 2000 kDa molecular weight (Sigma, USA), glucose oxydase of 180 kDa (Faizyme, SAR), bovine serum albumin of 66 kDa (Sigma), cytochrome C of 12 kDa (Sigma). Protein content in extracts and fractions was measured spectrophotometrically [10]. Spectrophotometric analysis was performed with Pye Unicam SP 8000 spectrophotometer (UK).

Erythrocytes were derived from donor male blood (group II) procured from healthy donors at Kharkiv regional blood transfusion station using Glugycir preservative. To remove plasma and leukocytes the blood was centrifuged for 5 min at 1500g. Erythrocyte sedi-



дили на спектрофотометрі «Pye Unicam SP 8000» (Велика Британія).

Еритроцити одержували з донорської крові чоловіків (група II), заготовленої на консерванті «Глюгіцер» від здорових донорів на Харківській обласній станції переливання крові. Для видалення плазми і лейкоцитів кров центрифугували 5 хв при 1500g. Осад еритроцитів тричі відмивали фосфатно-сольовим буфером (150 mM NaCl, 5 mM фосфатного буфера, pH 7,4). Підготовлені таким чином еритроцити піддавали 2-годинній інкубації з окремими фракціями ЕПЛ. Після експозиції еритроцити тричі відмивали ізотонічним розчином NaCl і вивчали необхідні параметри.

Кислотну стійкість еритроцитів характеризували за часом 50%-го гемолізу після перенесення клітин до цитратно-фосфатного буфера, pH 3,8. Час 50%-го гемолізу розраховували за кінетичною кривою зміни оптичної густини при 700 нм [15].

Для досліджень методом ЕПР до 0,5 мл еритроцитарної маси контрольної або інкубованої з окремими фракціями екстракту додавали 50 мкл водного розчину спінового зонда з концентрацією 10^{-2} М, 50 мкл водного розчину $K_3Fe(CN)_6$ з концентрацією 1 М і реєстрували спектри ЕПР у діапазоні температур (37...0)°C на спектрометрі «Bruker» (Німеччина) з термостатичним пристроєм (точність $\pm 0,5^\circ C$). Для вивчення температурозалежної динаміки стану цитозолу еритроцитів застосовували гідрофільний спіновий зонд ТЕМПОН (2,2,6,6-тетраметил-4-оксопіперидин-1-оксил; «Sigma»). Як поширювач використовували фериціанід калію (ФК) – $K_3Fe(CN)_6$, який не проникає в інтактні еритроцити [6]. У цьому випадку реєструється виключно спектр зондів у цитоплазмі. При цьому важливим є підбір концентрації ФК, за якої він не впливає на стан мембран і не ушкоджує клітин [6]. Застосований підхід за умов використання встановлених концентрацій зонда та фериціаніду (1 та 100 мМ відповідно) дозволяє оцінити динамічний стан цитозолу та бар'єрні властивості мембрани. Із спектрів визначали відношення інтенсивностей центрального (h_0) до високопольового ($h_{(-)}$) компонентів ($h_0/h_{(-)}$), яке може характеризувати рухливість зонда та ширину центрального компонента спектра ЕПР (ΔH_0 , Гс). Як параметр обертальної дифузії спінових зондів використовували величину ν (1/с), яку умовно називають «частотою обертання» радикала й визначають за формулою [6]:

$$\frac{1}{\nu} = 2,78 \cdot \Delta H_0 \left(\sqrt{\frac{h_0}{h_{(-)}} - 1} \right) \cdot 10^{-10} \text{ с.}$$

ment was thrice washed with phosphate buffered saline (150 mM NaCl, 5 mM phosphate buffer, pH 7.4). Prepared by this way erythrocytes were incubated for 2 hrs with isolated HPE fractions. Following the exposure the erythrocytes were thrice washed with NaCl isotonic solution and the needed parameters were studied.

Acidic resistance of erythrocytes was characterized by time of 50% hemolysis after transferring cells to citrate phosphate buffer, pH 3.8. Time of 50% hemolysis was calculated by kinetic curve of optical density changes at 700 nm [1].

For EPR investigations 0.5 ml of erythrocyte mass both control and incubated with isolated fractions of the extract were mixed with 50 μ l of aqueous solution of spin probe of 10^{-2} M concentration, 50 μ l of aqueous solution $K_3Fe(CN)_6$ of 1 M concentration and the EPR spectra were recorded within the temperature range of (37...0)°C using Bruker spectrometer (Germany) equipped with thermostat ($\pm 0.5^\circ C$ accuracy). To analyze temperature-dependent dynamics of erythrocyte cytosol state we used hydrophilic spin probe TEMPON (2,2,6,6-tetramethyl-4-oxypyridine-1-oxyl, Sigma). As an extender we used potassium ferricyanide (PF) – $K_3Fe(CN)_6$ which does not penetrate into intact erythrocytes [12]. In this case only spectrum of probes in cytoplasm is recorded. Moreover, of importance is the selection of PF concentration, which does not affect the state of membranes and does not damage the cells [12]. The used approach in case of the proper concentrations of probe and PF (1 and 100 mM, respectively) enabled the assessing of dynamic state of cytosol and barrier properties of membrane. The spectra could give the information about the ratio of intensities of central (h_0) to high field ($h_{(-)}$) components ($h_0/h_{(-)}$), characterizing mobility of probe and width of central component of EPR spectrum (ΔH_0 , G). As a parameter of rotational diffusion of spin probes we used value ν (1/s) conventionally called 'rotation frequency' of radical and calculated by the following formula [12]:

$$\frac{1}{\nu} = 2,78 \cdot \Delta H_0 \left(\sqrt{\frac{h_0}{h_{(-)}} - 1} \right) \cdot 10^{-10} \text{ s.}$$

Error of value ν measurement is determined by differentiation of the preceding formula:

$$\frac{1}{\nu} = 2,78 \cdot \Delta H_0 \left(\sqrt{\frac{h_0}{h_{(-)}} - 1} \right) \cdot 10^{-10} + \frac{1}{2} \cdot 10^{-10} \cdot \left[\frac{h_0}{h_{(-)}} \Delta H \left(\frac{h_0}{h_{(-)}} + \frac{h_{(-)}}{h_0} \right) \right] \text{ s.}$$



Помилка виміру величини v визначається диференціюванням попередньої формули:

$$\frac{1}{v} = 2,78 \cdot \Delta H_0 \left(\sqrt{\frac{h_0}{h_{(-1)}}} - 1 \right) \cdot 10^{-10} + \frac{1}{2} \cdot 10^{-10} \cdot \left[\frac{h_0}{h_{(-1)}} \Delta H \left(\frac{h_0}{h_{(-1)}} + \frac{h_{(-1)}}{h_0} \right) \right] \text{ с.}$$

При $v < 10^{10} \text{ с}^{-1}$ значення другого члена в правій частині формули зазвичай таке, яким можна зневажити. Оскільки точність вимірів величини H_0 змінюється від спектра до спектра, то величину помилки для загального випадку можна оцінити лише приблизно. Для v у районі 10^9 с^{-1} вона не більша за $0,06 \times 10^9 \text{ с}^{-1}$.

Для статистичної обробки отриманих даних застосовували пакет прикладних програм «Statistica 6.0». Результати дослідження кислотного гемолізу представлено у вигляді середніх значень \pm стандартна помилка середнього. Для оцінки статистичної значущості розходжень між значеннями кислотного гемолізу використовували t -критерій Стьюдента. Вірогідними вважали відмінності при $p < 0,05$.

Результати та обговорення

Під час попередніх досліджень впливу ЕПЛ на структурний стан еритроцитів донорської крові було показано, що еритроцити є зручною та адекватною клітинною моделлю для вивчення біологічної активності ЕПЛ [9]. Була виявлена різна дія на структурні показники еритроцитів ЕПЛ зі свіжоотриманої та підданої різним низькотемпературним впливам тканини плаценти (або низькотемпературним впливам на самі ЕПЛ), що корелювало зі змінами білкового та/або нуклеотидного складу ЕПЛ у відповідь на ці впливи [10, 11].

Виявлення діючої речовини у водно-сольових ЕПЛ та повніше розкриття молекулярних механізмів дії ЕПЛ на структурно-динамічний стан компонентів еритроцитів ускладнене тим, що у випадку ЕПЛ, як й інших складних біоактивних розчинів, можна очікувати синергізм, антагонізм чи адитивність окремих фракцій. Тому актуальним є вивчення впливу окремих фракцій ЕПЛ на стан еритроцитів та можливості його зміни після заморожування-відігріву і зберігання тканини плаценти у замороженому стані. При цьому одним із важливих чинників, які впливають на стан розмороженої тканини плаценти, є температура її зберігання. Раніше було встановлено, що ЕПЛ як із свіжоотриманої плаценти, так і з тканини, що зберігалась за температури -196°C упродовж року, підвищують осмотичну

If $v < 10^{10} \text{ s}^{-1}$, the value of the second term in the right side of formula is usually neglectable. Since the accuracy of measurement of value H_0 varies from spectrum to spectrum, the measurement error for general case can be only approximately estimated. For v within the range 10^9 s^{-1} it is not higher than $0.06 \times 10^9 \text{ s}^{-1}$.

To statistically process the findings we used Statistica 6.0 software. The results of the study of acid hemolysis are presented as mean values \pm standard error of the mean. To assess statistical significance of differences between the values of acid hemolysis we used Student's t -test. The differences were considered significant at $p < 0.05$.

Results and discussion

Previous investigations of the HPE effect on structural state of donor blood erythrocytes showed that these cells were convenient and adequate model to study HPE biological activity [17]. The HPEs from fresh placenta tissue and the one subjected to different low temperature exposures (or following low temperature exposures on the very HPEs) exhibited different effects on erythrocytes structural indices, and that correlated with the changes in HPE protein and/or nucleotide composition in response to these exposures [16, 18].

The revealing of active agent in aqueous-saline HPEs and more complete exploration of molecular mechanisms of HPE effect on structural and dynamic state of erythrocyte components are complicated by the fact that in case of HPE like in other complex bioactive mixtures one may expect the synergism, antagonism or additivity of some fractions. Therefore the study of the effect of isolated HPE fractions on erythrocyte state is important, along with the investigation of possible changes arised from freeze-thawing and storage of placenta tissue in a frozen state. At the same time, one of the important indices affecting the state of frozen-thawed placenta tissue is the temperature of its storage. Previously it was established that the HPEs both from a fresh placenta and from the tissue, stored under -196°C for one year, increased osmotic fragility and resistance of erythrocytes to the effect of highly concentrated sodium chloride solutions and low pH [17, 18]. At the same time the storage of placenta tissue over a month under -20°C resulted in significant changes of features of obtained extracts, which were manifested in the increased oxidation of heme iron in corresponding proteins of extracts, as well as in a decrease of their antiradical activity, a loss of capability to increase the erythrocyte osmotic and acid resistance, *i. e.* the features intrinsic to the extracts of fresh placenta. Therefore it was expedient to find out exactly which HPE fractions lost their biological effect



крихкість та стійкість еритроцитів до дії високих концентрацій хлориду натрію і низьких рН [9, 10]. У той же час зберігання тканини плаценти понад місяць за температури -20°C приводило до значних змін властивостей отриманих екстрактів, які проявлялися в збільшенні ступеня окислюваності гемового заліза у відповідних білках екстрактів, зниженні їх антирадикальної активності, втраті здатності до підвищення осмотичної та кислотної стійкості еритроцитів, притаманної для екстрактів свіжоотриманої плаценти. Тому доцільно було з'ясувати, які саме фракції ЕПЛ втрачають біологічний ефект на еритроцити після зберігання тканини плаценти за умов помірно низьких температур.

Для досліджень обрали таку характеристику еритроцитів, як кінетика кислотного гемолізу, що відповідає стійкості мембран в умовах, які виходять за межі фізіологічних значень рН, та деякою мірою відображає зв'язування дисоційованих молекул кислот і лугів. Тому зміна рівня кислотного гемолізу еритроцитів водно-сольовими екстрактами плаценти і їхніми окремими фракціями може об'єктивно характеризувати ці суспензії білків.

Проведені дослідження показали, що інкубація еритроцитів з ЕПЛ зі свіжоотриманої плаценти й окремими фракціями ЕПЛ приводить до підвищення їхньої кислотної стійкості. Поряд з цим інкубація еритроцитів з ЕПЛ із плаценти, яка зберігалася при -20°C , знижує кислотну стійкість еритроцитів (рис. 1). Дослідження впливу окремих фракцій показало, що найбільше її зниження спричиняла експозиція з фракцією ЕПЛ менше 5 кДа (рис. 2).

У зв'язку з цим важливо було визначити, як впливатиме фракція ЕПЛ менше 5 кДа на стан цитозолу еритроцитів. Така зацікавленість обумовлена тим, що результати досліджень останніх років доводять, що зміни міжмолекулярних взаємодій компонентів цитозолу, а отже і його структурно-динамічного стану є головними у регуляції як мембранних взаємодій, так і функціонального стану еритроцита в цілому. Зокрема, було показано, що головною ланкою механізму регуляції фізіології еритроцитів, стабільності та здатності до деформації мембрани є міжбілкові взаємодії, які значною мірою забезпечують стабільність динамічної системи мембрана-цитоскелет-цитозоль [16, 20].

Вочевидь зміни конформації компонентів цитозолу повинні відбиватися на його стані, зокрема на балансі вільної та зв'язаної води, а це, у свою чергу, пов'язано з мікророзмірністю цитозолу. Вплив окремих фракцій ЕПЛ на динамічний стан цитозолу еритроцитів можна оцінювати за параметром обертальної рухливості спінового зонда ТЕМПОН

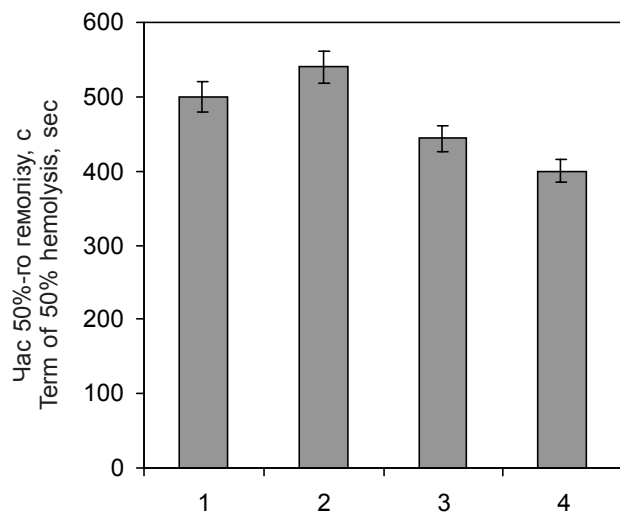


Рис. 1. Вплив експозиції з ЕПЛ на час 50%-го гемолізу еритроцитів при рН 3,8: 1 – нативні еритроцити; 2 – еритроцити після експозиції з ЕПЛ зі свіжоотриманої плаценти; 3 – еритроцити після експозиції з ЕПЛ з плаценти, яка зберігалася 6 місяців при -20°C ; 4 – еритроцити після експозиції з ЕПЛ із плаценти, яка зберігалася 12 місяців при -20°C ; * – значущі відмінності порівняно з нативними еритроцитами.

Fig. 1. Effect of exposure with HPE on time of 50% hemolysis of erythrocytes at pH 3.8: 1 – native erythrocytes; 2 – erythrocytes after exposure with HPE from freshly procured placenta; 3 – those after exposure with HPE from placenta, stored for 6 months at -20°C ; 4 – erythrocytes after exposure with HPE from placenta, stored for 12 months at -20°C ; * – differences are statistically significant as compared to native erythrocytes.

on erythrocytes after the placenta tissue being stored under moderately low temperatures.

For the study we selected such erythrocyte characteristics as kinetics of acid hemolysis which corresponded to membrane resistance under the conditions, exceeding the limits of physiological pH values and reflecting in some way the binding of dissociated molecules of acids and alkalis. Therefore a change in acid hemolysis level found in erythrocytes mixed with placental aqueous-saline extracts and their isolated fractions may objectively characterize these protein suspensions.

The performed experiments demonstrated, that erythrocyte incubation with HPE from fresh placentas and with isolated HPE fractions resulted in an increase of their acid resistance. Along with that, the erythrocyte incubation with HPEs from placenta stored at -20°C reduced the acid resistance of erythrocytes (Fig. 1). The study of the influence of certain fractions demonstrated, that the greatest decrease was found after the exposure with HPE fraction below 5 kDa (Fig. 2).

In this connection it was important to determine how HPE fraction below 5 kDa would affect the erythrocyte cytosol state. Such an interest was stipulated

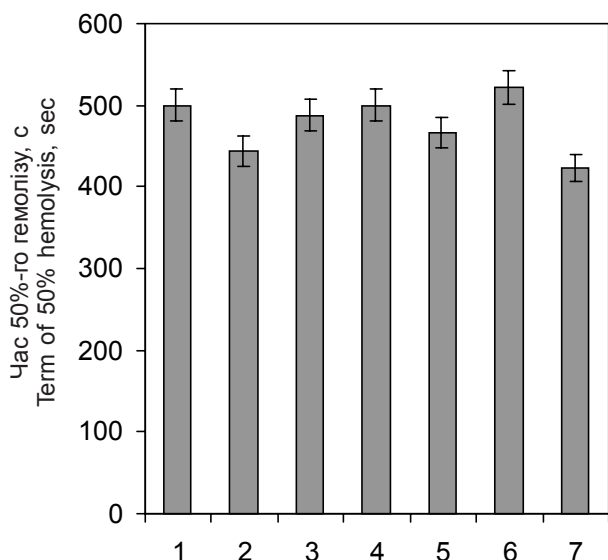


Рис. 2. Вплив експозиції з ЕПЛ із плаценти, яка зберігалася 6 місяців при -20°C , на час 50%-го гемолізу еритроцитів при рН 3,8: 1 – нативні еритроцити; 2 – після експозиції з ЕПЛ; 3 – з фракцією 700 кДа; 4 – 180 кДа; 5 – 65 кДа; 6 – 12 кДа; 7 – менше 5 кДа; * – значущі відмінності порівняно з нативними еритроцитами.

Fig. 2. Effect of exposure with HPE from placenta, stored for 6 months at -20°C on time of 50% erythrocyte hemolysis at pH 3.8: 1 – native erythrocytes; 2 – after exposure with HPE; 3 – with 700 kDa fraction; 4 – 180 kDa; 5 – 65 kDa; 6 – 12 kDa; 7 – below 5 kDa; * – differences are statistically significant as compared to native erythrocytes.

у цитозолі та його температурними залежностями у діапазоні $(37...0)^{\circ}\text{C}$.

Отримані результати щодо впливу інкубації еритроцитів з окремими фракціями ЕПЛ зі свіжоотриманої плаценти показали, що стан цитозолу еритроцитів залежить як від молекулярної маси фракцій, так і від початкового стану еритроцитів. Встановлено, що фракція з м.м. менше 5 кДа практично не впливає на стан цитозолу свіжих повноцінних еритроцитів (рис. 3).

Інкубація еритроцитів із низькомолекулярними фракціями екстрактів, отриманих із плаценти після її заморожування-відігріву та довгострокового зберігання при -20°C , впливає на стан цитозолу еритроцитів. Проведені дослідження показали, що інкубація еритроцитів з фракцією екстрактів з м. м. меншою за 5 кДа з плаценти, яка зберігалася при -20°C , на відміну від фракції зі свіжоотриманої плаценти, змінює характер залежності Ареніуса рухливості спінового зонда в дослідженому діапазоні температури (рис. 4). Спостерігається зменшення мікров'язкості цитозолу, особливо за температури нижче 20°C ($1/T \times 10^{-3} = 3,41$). Частота обертального руху спінового зонда при 13°C становить $(2,63 \pm 0,06) \times 10^9 \text{ s}^{-1}$ у зразках, інкубованих із фракцією екстрактів зі свіжоотриманої плаценти і $(1,57 \pm 0,06) \times 10^9 \text{ s}^{-1}$ у цитозолі еритроцитів після інкубації з фракцією ЕПЛ, яка зберігалася при -20°C . Як відомо, за температури близько 20°C відбуваються термоіндуковані перебудови білок-ліпідних компонентів мембрани еритроцитів та/або взаємодії цитоскелета з білком смуги 3. Виходячи з вищевикладеного, можна припустити, що зміни в цитозолі еритроцитів близько 20°C обумовлені впливом фракції з м.м. 5 кДа ЕПЛ із плаценти, яка зберігалася при -20°C , на білкові компоненти мембран

by the recently reported findings about the importance of changes in intermolecular relationships of cytosol components, *i. e.* their structural and dynamic state, in regulating both membrane interactions and functional state of erythrocytes in a whole. In particular, the protein-protein relationships providing in a great measure the stability of dynamic system of membrane-cytoskeleton-cytosol, were designated as the main link of regulation of erythrocyte physiology, stability and capability to membrane deformation [2, 14].

Evidently the conformation changes in cytosol components should affect its state, in particular, the balance of free and bound water, being in its turn associated with cytosol microviscosity. The influence of isolated HPE fractions on dynamic state of erythrocyte cytosol may be assessed by the parameter of rotational mobility of TEMPON spin probe in cytosol and by its temperature dependences within the range of $(37...0)^{\circ}\text{C}$.

The obtained results concerning the effect of erythrocyte incubation with isolated HPE fractions from fresh placenta demonstrated that state of erythrocyte cytosol was dependent on both molecular mass of fractions and initial state of erythrocytes. The fraction below 5 kDa was established as nearly not affecting the cytosol state of fresh intact erythrocytes (Fig. 3).

The incubation of erythrocytes with low molecular fractions of extracts procured from placenta after its long-term storage at -20°C affected the erythrocyte cytosol state. The performed experiments demonstrated that erythrocyte incubation with the fraction of extracts below 5 kDa from placenta stored at -20°C resulted in changed character of Arrhenius dependence of spin probe mobility within the studied temperature range, and this was unlike the effect observed in case of fresh placenta (Fig. 4). There was a decrease in cytosol microviscosity, especially at the tempe-



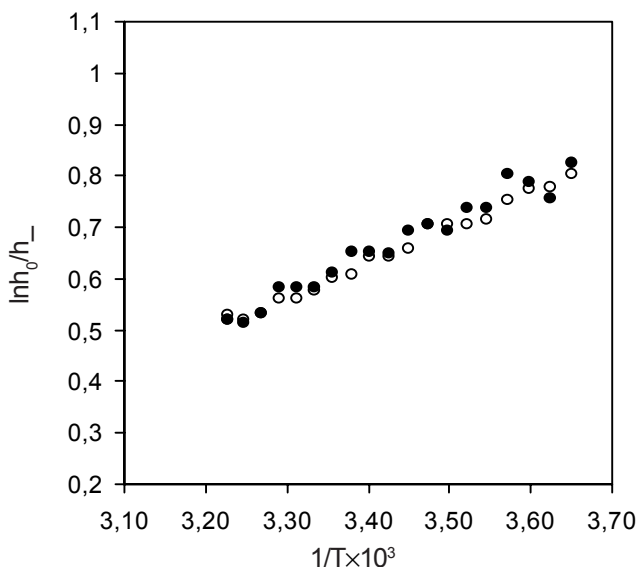


Рис. 3. Залежності Ареніуса параметра рухливості зонда TEMPON у цитозолі еритроцитів: ● – нативних, ○ – після інкубації з фракцією менше 5 кДа ЕПЛ із свіжоотриманої плаценти.

Fig. 3. Arrhenius dependences of mobility parameter of TEMPON probe in cytosol of erythrocytes: ● – native, ○ – after incubation with fraction below 5 kDa of HPE from freshly procured placenta.

еритроцитів. Цей ефект добре узгоджується з отриманими даними щодо зниження кислотної стійкості еритроцитів під впливом саме цієї фракції. Така узгодженість може пояснюватися тим, що кислотна стійкість еритроцитів залежить, насамперед, від стану білка смуги 3 [19].

Дані дослідження свідчать про вплив довгострокового зберігання тканини плаценти за температури -20°C на властивості отриманої з неї фракції з м.м. менше 5 кДа. Важливість цих результатів полягає у тому, що саме з низькомолекулярними білково-пептидними фракціями пов'язують терапевтичний ефект ряду біологічно активних сумішей. Раніше було показано [11], що у процесі зберігання тканини плаценти при -20°C у отриманих з неї екстрактах підвищується відносний вміст білків із м.м. менше 60 кДа, що може пов'язуватися з протіканням протеолітичних реакцій у процесі зберігання тканини плаценти за такої температури. Слід зазначити, що в ЕПЛ, отриманих із плаценти, яка зберігалася при -20°C більше місяця, відзначається підвищення рівня тривалентного гемового заліза. Це свідчить про появу в ЕПЛ окислювачів, присутність яких може приводити до окислення білків мембран еритроцитів та їхньої подальшої агрегації, у першу чергу білка смуги 3 [17], і до зниження кислотної стійкості клітин [15, 19]. Зміна агрегаційного стану білка смуги 3 може впливати на так званий цитоплазматичний його домен (cdb3), який

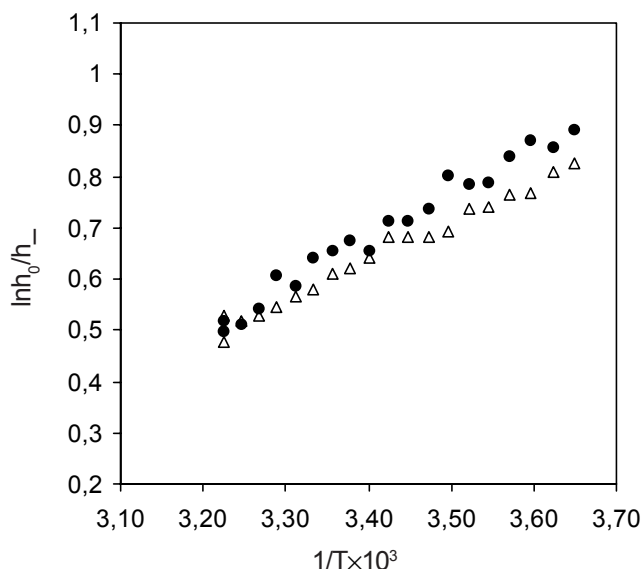


Рис. 4. Залежності Ареніуса параметра рухливості зонда TEMPON у цитозолі еритроцитів: ● – нативних, △ – після інкубації з фракцією менше 5 кДа ЕПЛ, що зберігалася при -20°C .

Fig. 4. Arrhenius dependences of mobility parameter of TEMPON probe in cytosol of erythrocytes: ● – native, △ – after incubation with fraction below 5 kDa of HPE from placenta tissue stored at -20°C .

rate below 20°C ($1/T \times 10^{-3} = 3.41$). The frequency of rotational mobility of spin probe at 13°C was $(2.63 \pm 0.06) \times 10^9 \text{ s}^{-1}$ in the samples incubated with the extract fraction from fresh placenta and $(1.57 \pm 0.06) \times 10^9 \text{ s}^{-1}$ in erythrocyte cytosol after incubation with HPE fraction stored at -20°C . It is known that temperatures of about 20°C are characteristic for therminduced rearrangements of protein-lipid components of erythrocyte membrane and/or interactions of cytoskeleton and band 3 protein. Proceeding from the mentioned above we may suggest that the changes in erythrocyte cytosol at temperatures about 20°C were stipulated by the effect on protein components of erythrocyte membranes exhibited by fraction below 5 kDa of HPEs from placenta, stored at -20°C . This effect agreed well with the obtained data concerning the reduction of acid resistance of erythrocytes under the influence of exactly this fraction. Such a conformity may be explained by the dependency of erythrocyte acid resistance on primarily band 3 protein state [11].

The results of the research testify to the effect of long-term storage of placenta tissue at -20°C on the peculiarities of isolated fraction with molecular weight below 5 kDa. The importance of the findings consists in the fact that a therapeutic effect of some biologically active mixtures is associated exactly with low molecular protein-peptide fractions. Recently it has been demonstrated that following storage of placenta tissue at -20°C the procured from it extracts had an increased

має місця конкурентного зв'язування ключових ферментів гліколізу, гемоглобіну, а також анкірину, білків смуг 4.1 та 4.2, що здійснюють зв'язок спектринового скелета з мембраною [16]. Встановлено, що цитоскелетні компоненти еритроцитів переходять у мембранозв'язаний стан або у «цитозольний», і ці переходи, як один із регуляторів фізіології клітини [16], вочевидь, впливають на баланс вільної та зв'язаної води у цитозолі, зміни в якому реєструються за його мікров'язкістю. Тому значення мікров'язкості, а в більшій мірі її температурна залежність можуть відображати зміни стану мембранозв'язаних білків. У зв'язку з цим і спостерігається узгодження впливу окремих фракцій екстрактів плаценти як на кислотну стійкість мембран, так і на стан цитозолу еритроцитів.

Висновки

Таким чином, експериментальне дослідження впливу ЕПЛ на властивості мембран еритроцитів показало, що експозиція клітин з екстрактами із плацент, які зберігалися протягом 6 місяців при -20°C , і деякими окремими їх фракціями приводить до зниження кислотної стійкості еритроцитів, до того ж найбільше впливає фракція з м.м. менше 5 кДа. При цьому експозиція еритроцитів із фракцією м.м. менше 5 кДа з таких плацент, на відміну від тієї ж фракції зі свіжоотриманої плаценти, змінює стан цитозолу, знижуючи його мікров'язкість та модифікуючи температурну залежність рухливості спінового зонда.

Література

1. Грищенко В.И. Роль криобиологии в создании биотехнологий клеточной и тканевой трансплантации // Проблемы криобиологии. – 2001. – №3. – С. 7–8.
2. Грищенко В.И., Гольцев А.Н. Трансплантация продуктов эмбриофетоплацентарного комплекса. От понимания механизма действия к повышению эффективности применения // Проблемы криобиологии. – 2002. – №1. – С. 54–84.
3. Грищенко О.В., Морозова Т.Ф., Лажно И.В. и др. Улучшение функциональных свойств тканевых препаратов в программе КТПЧ (Криоконсервированная ткань плаценты человека) // Вісник проблем біології і медицини. – 1998. – №19. – С. 20–25.
4. Гулевский А.К., Абакумова Е.С., Моисеева Н.Н. и др. Влияние фракции кордовой крови (до 5 кДа) крупного рогатого скота на биохимические показатели крови при экспериментальной субхронической язве желудка у крыс // Укр. біохім. журнал. – 2008. – Т. 80, №2. – С. 120–126.
5. Гулевский А.К., Грищенко В.И., Релина Л.И. и др. Влияние фракции до 5 кДа из мозга холодоадаптированных рыб на жизнеспособность караса серебряного в условиях холододового воздействия // Доповіді НАНУ. – 2009. – №11. – С. 155–159.
6. Лихтенштейн Г.И. Метод спиновых меток в молекулярной биологии. – М.: Наука, 1974. – 256 с.

relative content of proteins with molecular weight below 60 kDa, that may be related with proteolytic reactions occurring during placenta tissue storage at the stated temperature [16]. Of note is the fact that HPEs procured from placentas stored at -20°C longer than a month had an increased level of trivalent heme iron. This testified to the occurrence of oxidizers in HPE, which presence could result in oxidation of erythrocyte membrane proteins and their following aggregation, band 3 protein in particular [4], and in a reduction of acidic resistance of the cells [1, 11]. A change in aggregation state of band 3 protein could affect its so called cytoplasmic domain (cdb3), containing the sites of competitive binding of key enzymes of glycolysis, hemoglobin, as well as ankyrin, band 4.1 and 4.2 proteins, implementing the bond of spectrin skeleton with membrane [2]. Cytoskeletal components of erythrocytes were established to transit either into membrane-bound state or 'cytosol' one, and these transformations, being the triggers of cell physiology [2] apparently affected the balance of free and bound water in cytosol, the changes in which could be revealed by its microviscosity. Therefore, the values of microviscosity and mostly its temperature dependence may reflect the changes in a state of membrane-bound proteins. That is why there was a similarity of the effects of isolated fractions of placenta extracts on both acid resistance of the membrane and erythrocyte cytosol state.

Conclusions

Thus, the experimental study of HPE effect on erythrocyte membrane features demonstrated that the cell exposure with extracts from placentas, stored for 6 months at -20°C and their isolated fractions resulted in a decrease of acid resistance of erythrocytes, moreover the highest effect was found in case of fraction below 5 kDa. The erythrocytes' exposure with fraction below 5 kDa from such placentas, in contrast to the same fraction from fresh placentas, changed the cytosol state by decreasing its microviscosity and modifying the temperature dependency of spin probe mobility.

References

1. Arvint T., Cudd A., Shulz B. et. al. Low-pH association of proteins with the membranes of intact red blood cells. Studies of the mechanism. *Biochim Biophys Acta* 1989; 981(1): 51–61.
2. Campanella M.E., Chu H., Low P.S. Assembly and regulation of a glycolytic enzyme complex on the human erythrocyte membrane. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(7): 2402–2407.
3. Cheremskoy A.K., Nikitchenko Yu.V., Chizhevsky V.V. Effect of cryopreserved placenta extract on antioxidant system activity in rat tissues after general cooling. *Problems of Cryobiology* 2008; 18(1): 77–80.



7. Луценко Н.С., Прокопюк О.С., Бондаренко И.А. и др. Применение криоконсервированной плацентарной ткани при изоиммунизации беременных женщин // Проблемы криобиологии. – 2008. – Т. 18, №3. – С. 316–318.
8. Перчик О.А. Сравнительная характеристика результатов действия криоконсервированного экстракта плаценты и препарата «Овестин», применяемых для лечения урогенитальных расстройств у женщин в период климактерия // Экспериментальна і клінічна медицина. – 2006. – №1. – С. 148–150.
9. Погожих Д.Н., Нардид О.А., Розанова Е.Д. и др. Свойства экстрактов плаценты, полученных из замороженных тканей // Вісник проблем біології і медицини. – 2009. – №3. – С. 86–90.
10. Погожих Д.Н., Розанова Е.Д., Нардид О.А. Изменение некоторых структурных параметров эритроцитов под действием экстрактов плаценты // Гематологія і переливання крові. – 2006. – №33. – С. 139–141.
11. Погожих Д.Н., Розанова Е.Д., Нардид О.А. Изменение свойств водно-солевых экстрактов плаценты человека в процессе низкотемпературного хранения // Проблемы криобиологии. – 2008. – Т. 18, №1. – С. 22–26.
12. Прокопюк О.С., Петренко А.Ю., Прокопюк В.В., Чижевський В.В. Криоконсервирование плаценты различной степени зрелости // Проблемы криобиологии. – 2008. – Т. 18, №2. – С. 220.
13. Черемской А.К., Никитченко Ю.В., Чижевский В.В. Влияние криоконсервированного экстракта плаценты на активность антиоксидантной системы в тканях крыс после общего охлаждения // Проблемы криобиологии. – 2008. – Т. 18, №1. – С. 77–80.
14. Шепітько В.І. Вплив препаратів криоконсервованої плаценти на перекисні показники у хворих на стабільну стенокардію // Проблемы криобиологии. – 2004. – №1. – С. 70–74.
15. Arvint T., Cudd A., Shulz B. et. al. Low-pH association of proteins with the membranes of intact red blood cells. Studies of the mechanism // BBA. – 1989. – Vol. 981, №1. – P. 51–61.
16. Campanella M.E., Chu H., Low P.S. Assembly and regulation of a glycolytic enzyme complex on the human erythrocyte membrane // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2005. – Vol. 102, №7. – P. 2402–2407.
17. Fujino T., Ando K., Beppu M., Kiyomi K. Enzymatic removal of oxidized protein aggregates from erythrocyte membranes // J. Biochem. – 2000. – Vol. 127, № 6. – P. 1081–1086.
18. Harris D.A. Spectrophotometric assays in: Spectrophotometry & spectrofluorimetry. – Washington: IRL Press, 1987. – P. 49–90.
19. Ivanov I.T. Low pH-induced hemolysis of erythrocytes is related to the entry of the acid into cytosole and oxidative stress on cellular membranes // Biochim. Biophys. Acta. – 1999. – Vol. 1415. – P. 346–360.
20. Manno S., Takakuwa Y., Mohandas N. Modulation of erythrocyte membrane mechanical function by protein 4.1 phosphorylation // J Biol Chem. – 2005. – Vol. 280, №9. – P. 7581–7587.
4. Fujino T., Ando K., Beppu M., Kiyomi K. Enzymatic removal of oxidized protein aggregates from erythrocyte membranes. J Biochem 2000; 127(6): 1081–1086.
5. Grischenko V.I. The role of cryobiology in creation of biotechnologies for cellular and tissue transplantation. Problems of Cryobiology 2001; (3): 7–8.
6. Grischenko V.I., Goltsev A.N. Transplantation of products of embryofetoplacental complex. From understanding of action mechanism to increase in application efficiency. Problems of Cryobiology 2002; (1): 54–84.
7. Grischenko O.V., Morozova T.F., Lakhno I.V. et al. Improvement of functional properties of tissue preparations in CTHP (cryopreserved tissue of human placenta) program. Visnyk Problem Biologii i Medytsyny 1998; (19): 20–25.
8. Gulevsky A.K., Abakumova E.S., Moiseyeva N.N. et al. The effect of cattle cord blood fraction (below 5 kDa) on biochemical blood indices under experimental subchronic gastric ulcer in rats. Ukr. Biokhim. Zhurn. 2008; 80(2): 120–126.
9. Gulevsky A.K., Grischenko V.I., Relina L.I. et al. Effect of fraction below 5 kDa from brain of cold-adapted fish species on viability of *Carassius auratus* under cold effect conditions. Dopovidi NAN Ukrainy 2009; (11): 155–159.
10. Harris D.A. Spectrophotometric assays. In: Spectrophotometry & spectrofluorimetry. Washington: IRL Press; 1987: p. 49–90.
11. Ivanov I.T. Low pH-induced hemolysis of erythrocytes is related to the entry of the acid into cytosole and oxidative stress on cellular membranes. Biochim Biophys Acta 1999; 1415: 346–360.
12. Likhenshtein G.I. Method of spin labels in molecular biology. Moscow: Nauka; 1974.
13. Lutsenko N.S., Prokopyuk O.S., Bondarenko I.A. et al. Application of cryopreserved placental tissue at isoimmunization of pregnant women. Problems of Cryobiology 2008; 18(3): 316–318.
14. Manno S., Takakuwa Y., Mohandas N. Modulation of erythrocyte membrane mechanical function by protein 4.1 phosphorylation. J Biol Chem 2005; 280(9): 7581–7587.
15. Perchik O.A. Comparative characteristics of the results of the action of cryopreserved placental extract and 'Ovestin' administered for treating urogenital disorders in women in climacteric period. Eksperiment i Klinichna Medytsyna 2006; (1): 148–150.
16. Pogozhikh D.N., Nardid O.A., Rozanova E.D. et al. Properties of placenta extracts derived from frozen tissues. Visnyk Problem Biologii i Medytsyny 2009; (3): 86–90.
17. Pogozhikh D.N., Rozanova E.D., Nardid O.A. Change in certain structural parameters of erythrocytes under the effect of placental extracts. In: Hematology and blood transfusion. Volume 33. Kiev, 2006: 139–141.
18. Pogozhikh D.N., Rozanova E.D., Nardid O.A. Change of properties of human placenta aqueous-saline extracts during low temperature storage. Problems of Cryobiology 2008; 18(1): 22–26.
19. Prokopyuk O.S., Petrenko A.Yu., Prokopyuk V.V., Chizhevsky V.V. Cryopreservation of placenta with different maturity degree. Problems of Cryobiology 2008; 18(2): 220.
20. Shepit'ko V.I. Effect of cryopreserved placenta preparations on peroxidative indices in patients with stenocardia. Problems of Cryobiology 2004; (1): 70–74.

