

capacity. Presenile male rats are characterized by an increase in the absolute capacity of the delta activity by 3.3 times, theta activity by 2 times, alpha activity by 9 times, beta-activity by 4.5 times compared with mature male rats.

It is shown that with age, the dynamics of normalized capacities of the frequency EGtG components, deviated from the ergotropic zone of the hypothalamus, significantly changes. Juvenile male rats had almost equal distribution between high-frequency and low-frequency oscillations. Young male rats had been characterized by the highest rates of beta activity (57.54±3.23 %), prevalence of high-frequency oscillations and therefore desynchronization was observed. The bioelectric activity of the ergotropic zone of the hypothalamus in mature male rats was represented by slow-wave synchronization processes, where the highest percentages were registered in the delta range (49.03±8.6 %). In presenile male rats a sharp increase in alpha activity (30±3.5 %) by 1.9 times was observed as compared with young and mature rats. We believe that the results of the study on age-related modulation of bioelectric activity of the ergotropic zone of the hypothalamus in male rats reflect adaptive-compensatory changes in central neurotransmission in general.

Key words: ergotropic zone of the hypothalamus, Electric Hypothalamus Test (EGtG), normalized capacities of bioelectric activity, male rats, age.

Рецензент – проф. Міщенко І. В.
Стаття надійшла 13.05.2018 року

DOI 10.29254/2077-4214-2018-2-144-206-209

УДК 57.086.13:577.112:544.77.022.542

Нарожный С. В., Розанова Е. Д., Нардид О. А.

ВЛИЯНИЕ НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУР ХРАНЕНИЯ НА БЕЛКИ ИНКАПСУЛИРОВАННЫЕ В АЛЬГИНАТНЫЕ МИКРОСФЕРЫ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины (г. Харьков)

stas.narozhnyi@gmail.com

Связь публикации с плановыми научно-исследовательскими работами. Работа выполнена соответственно научному направлению работы отдела криобиофизики ИПКИК НАН Украины по теме: «Влияние криоконсервирования плаценты и ее водно-солевых экстрактов на антиоксидантное и противовоспалительное действие экстрактов» (№ государственной регистрации – 0116U003491).

Вступление. Одним из часто используемых подходов к замораживанию белков является их замораживание в водно-солевых растворах [1,2,3]. С целью лучшей сохранности структурно-функциональных свойств макромолекул применяются метод витрификации или протоколы с использованием криозащитных сред [4,5]. Но при этом оба эти подхода обладают рядом недостатков. Так основным недостатком витрификации является малый объем вещества, в котором можно развить высокие скорости охлаждения. Использование криозащитных сред так же имеет ряд недостатков, таких как взаимодействие белка с криопротектором, а так же технологические проблемы, связанные с удалением криопротектора из криозащитного раствора после отогревания. Поэтому разработка новых подходов к криоконсервированию изолированных белков с условием сохранения их функциональных свойств, остается актуальной проблемой криобиологии.

Одним из подходов к защите белков от влияния низких температур может стать их инкапсуляция в матрицы на основе биополимеров. Одним из таких биополимеров является альгинат натрия. Основными достоинствами его использования является биосовместимость, простота гелеобразования и низкая стоимость [6]. Матрицы на основе этого полимера уже нашли свое применение в биотехнологии [7], медицине [8], фармакологии [9] и пищевой промышленности [10], а так же и в криобиологии при замораживании клеток [11].

Матрицы на основе альгината натрия, используются в качестве стабилизирующей структуру белко-

вых молекул в биотехнологии, повышая их стабильность [12,13,14]. Это свойство представляет интерес и для криобиологии, так как одним из основных факторов криоповреждения белков является изменение их третичной или четвертичной структуры [15,16], что приводит изменению или потере их ферментативной активности.

Цель работы. Целью данной работы является изучение влияния хранения белков гемолизата, инкапсулированных в альгинатные микросферы при -20°C на их каталазную активность.

Объект и методы исследования

Получение гемолизата. Гемолизат получали из эритроцитов, полученных из цельной донорской крови, путем трехкратного центрифугирования при 1500 g в течение 5 мин. Затем эритроциты смешивали с дистиллированной водой в соотношении 1:3, по истечению 30 мин. воздействовали на них ультразвуком в течении 3-х мин. Полученный гемолизат фильтровали через мембранный фильтр 0,45 мкм (Millipore Corp. Carrigtwohill, Co. Cork, Ирландия).

Концентрацию гемоглобина определяли по полюсе Соре.

Получение альгинатных микросфер с гемолизатом. Для получения альгинатных микросфер могут быть применены различные методы [17]. В данной работе использовали метод капельной экстракции.

Для получения микросфер альгината, 2%-й раствор альгината натрия смешивали с гемолизатом в пропорциях, приведенных в **таблице 1**. После чего pH раствора довели до значения 4,5 – 5,5, при помощи 0,1 М раствора HCl. После чего смесь альгината с гемолизатом хранили в течении 12 ч. при 4°C. Далее полученный раствор прокапывали в ванну, содержащую 2% раствор CaCl₂. Микросферы экспонировали в растворе CaCl₂ в течении 1-го часа. После чего их осаждали центрифугированием, и помещали в соответствующий буфер, для проведения дальнейших исследований.

Таблиця 1.

Состав раствора для приготовления микросфер

Образец	V _{альгината} (мл)	V _{гемолизата} (мл)	pH	V _{дистиллят} (мл)
1	0,5	0,3	4,5	9,2
2	0,5	0,3	5,5	9,2
3	0,5	0,5	5,5	9,0
4	0,5	1,0	5,5	8,5

Загрузку белка в микросферы рассчитывали по формуле:
$$\text{Загрузка (\%)} = \left(\frac{N_{\text{Hb микросф.}}}{N_{\text{Hb общ.}}} \right) \cdot 100$$

Где N_{Hb микросф.} – количество гемоглобина инкапсулированного в микросферы (мг), N_{Hb общ.} – общая концентрация гемоглобина (мг).

Микросферы альгината натрия с гемолизатом замораживали в физиологическом растворе pH=5,8 (физ. р-р.) и в фосфатно-солевом буфере pH=7,4 (ФСБ). Замораживание осуществлялось с низкой скоростью охлаждения, порядка 2 °С в мин. до -20 °С. Раствор микросфер хранили при -20 °С в течении 18 месяцев. Отогревания проводили на водной бане при 37 °С.

Размер микросфер оценивали при помощи микроскопии на микроскопе МБС-10.

Изучение каталазной активности. Для оценки каталазной активности гемолизата заключенного в альгинатные микросферы был использован спектрофотометрический метод [18]. Для этого 0,1 мл раствора микросфер добавляли 2 мл 0,03%-го раствора H₂O₂. Реакционную смесь инкубировали при комнатной температуре в течении 10 мин., реакцию останавливали добавлением 0,5 мл 4%-го раствора молибдата аммония. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре при длине волны 410 нм в 1-сантиметровой кювете.

Результаты каталазной активности приведены в процентах по отношению к «холостой» пробе (вместо раствора микросфер добавляли 0,1 мл дистиллированной воды), в пересчете на концентрацию белка.

Результаты исследования и их обсуждение. В ходе эксперимента были получены альгинатные микросферы, диаметр которых составлял 143±86 мкм.

Было обнаружено, что загрузка белка в микросферы зависит от нескольких параметров, таких как:

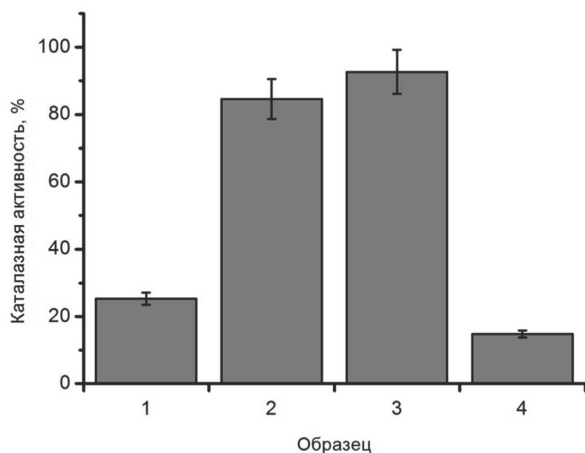


Рис. 1. Каталазная активность микросфер альгината натрия с гемолизатом.

значение pH и концентрации инкапсулируемого белка. В данной работе была проведена серия экспериментов для определения влияния каждого из этих параметров на загрузку белка из гемолизата в полученные микросферы альгината натрия, для этого последовательно изменяли только один из исследуемых параметров, в то время как остальные оставались неизменными.

Изменение pH при приготовлении раствора альгината натрия с гемолизатом, практически не влияет на загрузку белком альгинатных микросфер (табл. 2). Наибольшее влияние оказывает увеличение концентрации загружаемого белка. Так увеличение концентрации белка в растворе в два раза приводит к увеличению загрузки в 5 раз (табл. 2).

Таблиця 2.

Загрузка белка в микросферы альгината натрия

Образец	C _{белка} (мг/мл)	Загрузка (%)
1	0,54	31,4±2,2
2	0,54	32,4±2,3
3	1,8	5,2±0,4
4	3,6	25,1±1,8

В то же время эти два параметра оказывают влияние на каталазную активность белков из гемолизата инкапсулированного в микросферы альгината натрия. Исходя из данных приведенных на рис. 1 мы можем предположить, что изменение значения pH при приготовлении раствора альгината натрия с гемолизатом приводит к уменьшению или увеличению количества инкапсулированной каталазы. Так снижение pH до значения 4,5 значительно уменьшает количество связанной каталазы, о чем мы можем судить исходя из низкого показателя каталазной активности. В то же время увеличение pH до значения 5,5 приводит к связыванию большего количества каталазы, что отражается на значении каталазной активности микросфер. При этом увеличение общей концентрации белка в приготовленном растворе, не только не приводит к увеличению количества связанной каталазы, а наоборот приводит к его снижению. Скорее всего, это связано с конкурентным связыванием альгината натрия с белком. Гемолизат является смесью гемопroteинов, основным из которых является гемоглобин (до 98%), при чем соотношение гемоглобина и каталазы в эритроцитах является числом постоянным, вследствие чего увеличение концентрации белка приводит к значительному увеличению концентрации гемоглобина, что приводит к увеличению количества этого белка в микросферах, тем самым уменьшая количество загруженной каталазы, что отражается на значении каталазной активности.

Так же следует отметить, что величина pH раствора, в котором происходит хранение альгинатных микросфер может влиять на выход инкапсулированного вещества. Так проведенные исследования Z. Zhang et al. показали, что изменение значения pH раствора в котором хранятся альгинатные микросферы при комнатной температуре, оказывает значительное влияние на выход инкапсулируемого вещества [19]. Для изучения влияния pH на выход белка при хранении микросфер альгината натрия, мы осуществляли

хранения в растворах с различным значением водородного показателя (табл. 3).

Таблица 3.
Выход белка из альгинатных микросфер в следствии хранения в течении 18 месяцев при -20°С

Образец	Выход белка (%)	Значения pH
3	28,7±2,2	5.8
4	36,6±2,6	
3	25,3±1,8	7.4
4	46,6±3,3	

Исходя из полученных результатов можно предположить, что использование растворов с более низким значением pH для хранения микросфер предпочтительней, так как выход белка меньше, что в свою очередь позволяет сохранить большее количества инкапсулированного вещества. Эти результаты согласуются с литературными данными, полученными для хранения при комнатной температуре.

После хранения микросферы альгината натрия с инкапсулированными веществами из гемолизата сохраняют каталазную активность (рис. 2).

Такое изменение каталазной активности, скорее всего, связано с выходом гемоглобина из микросфер. Такое предположение вызвано тем, что альгинатная мембрана изменяет свою проницаемость, при хранении, для молекул, молекулярная масса которых не превышает 150 кДа [20]. Так как молекулярная масса гемоглобина равняется 66,8 кДа, а молекулярная масса каталазы лежит в пределах 240 кДа, мы можем предположить, что в связи с длительным хранением часть гемоглобина вышла из микросфер уменьшив общую концентрацию белка, и тем самым увеличив концентрацию каталазы, что и привело к значительному увеличению каталазной активности исследуемого микросфер после хранения.

При однократном замораживании раствора каталазы, наблюдается 30% снижение ее активности, по сравнению с свежесыведенной, в диапазоне температур от -12°С до -75°С [21]. Одним из криопротекторов, который может препятствовать потери ее актив-

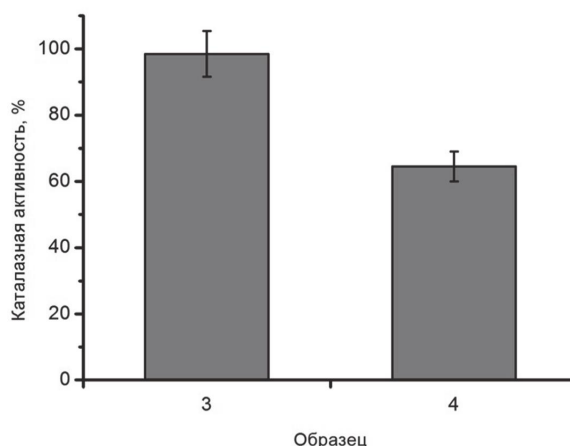


Рис. 2. Каталазная активность микросфер альгината натрия с гемолизатом хранившихся в течении 18 месяцев при -20°С.

ности, является желатин [21,22]. При использовании желатина в качестве криопротектора, каталаза сохраняет свою активность на уровне свежесыведенной, в указанном интервале температур [21]. Исходя из того, что желатин как и альгинат образует матрицу с встроенными в него биологическими веществами, возможно предположить, что альгинат так же выступает в качестве криопротектора, сохраняя функциональную активность встроенных в него белков.

Выводы. Установлены параметры, влияющие на загрузку микросфер белком. К ним относятся значение pH раствора альгината с загружаемым веществом, а так же концентрация инкапсулируемого вещества.

Установлено, что при хранении альгинатных микрокапсул с инкапсулированными белками из гемолизата, в течении 18 месяцев при -20°С они сохраняют свою каталазную активность.

Перспективы дальнейших исследований. Дальнейшие исследования предполагают изучение влияния низкотемпературного хранения альгинатных микрокапсул с инкапсулированными белками, на структуру инкапсулируемого материала.

Литература

1. Strambini GB, Gonnelli M. Protein stability in ice. *Biophys J.* 2007 Dec;92(6):2131-8.
2. Rozanova SL, Rozanova ED, Nardid OA. Antioxidant properties of proteins after freezing-thawing. *Ukr. Biochem. J.* 2012 Feb;84(1):53-9.
3. Moiseev VA, Rozanova ED, Tarasenko EI. Effect of freezing and thawing on functional characteristics of cytochrome c and cytochrome oxidase. *Kriobiologiya i kriomeditsina.* 1981;8:4-6.
4. Corradini D, Strelakova EG, Stanley HE, Gallo P. Microscopic mechanism of protein cryopreservation in an aqueous solution with trehalose. *Sci Rep.* 2013 Feb;3:1218.
5. Singh SK, Kolhe P, Wang W, Nema S. Large-Scale freezing of biologics. *Bioprocess Int.* 2009 Oct;7(9):34-44.
6. Lee KY, Mooney DJ. Alginate: properties and biomedical applications. *Prog Polym Sci.* 2012 Jan;37(1):106-26.
7. Datta S, Christena LR, Rajaram YRS. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *3 Biotech.* 2013 Feb;3(1):1-9.
8. Ivancic A, Macaev F, Aksakal F, Boldescu V, Pogrebnoi S, Duca G. Preparation of alginate-chitosan-cyclodextrin micro- and nanoparticles loaded with anti-tuberculosis compounds. *Beilstein J. Nanotechnol.* 2016 Aug;7:1208-18.
9. Lam PL, Gambari R. Advanced progress of micro-encapsulation technologies: in vivo and in vitro models for studying oral and transdermal drug deliveries. *J. Controlled Release.* 2014 Jan;178:25-45.
10. Martín MJ, Lara-Villoslada F, Ruiz MA, Morales ME. Microencapsulation of bacteria: a review of different technologies and their impact on the probiotic effects. *Innov Food Sci Emerg Techno.* 2015 Feb;27:15-25.
11. Malpique R, Osório LM, Ferreira DS, Ehrhart F, Brito C, Zimmermann H, et al. Alginate encapsulation as a novel strategy for the cryopreservation of neurospheres. *Tissue Eng Part C Methods.* 2010 Oct;16(5):965-77.
12. Varg JE, Dussán J. Encapsulation and immobilization of the s-layer protein of lysinibacillus sphaericus in an alginate matrix for chromium adsorption. *Int Biodeterior Biodegradation.* 2017 Jan;116:141-6.
13. Geethanjali S, Subash A. Optimization and immobilization of purified labeo rohita visceral protease by entrapment method. *Enzyme Res.* 2013 Jan;2013:1-7.

14. Keerti, Gupta A, Kumar V, Dubey A, Verma AK. Kinetic characterization and effect of immobilized thermostable β -glucosidase in alginate gel beads on sugarcane juice. ISRN Biochem. 2014 Dec;2014:1-8.
15. Nardid OA. Effect of low temperatures on protein systems. Probl. Cryobiol. Cryomed. 2014;24(2):83-101.
16. Privalov PL. Cold denaturation of proteins. Crit Rev Biochem Mol Biol. 1990;25(4):281-305.
17. Prusse U, Bilancetti L, Bucko M, Bugarski B, Bukowski J, Gemeiner P, et al. Comparison of different technologies for alginate beads production. Chem. Papers. 2008 Jul;62(4):364-74.
18. Korolyuk MA, Ivanova LI, Mayorova IT. Method for determination of catalase activity. Laboratornoe delo. 1988;1:16-9.
19. Zhang Z, Zhang R, Zou L, McClements DJ. Protein encapsulation in alginate hydrogel beads: effect of pH on microgel stability, protein retention and protein release. Food Hydrocolloids. 2016 Jul;58:308-15.
20. Shoichet MS, Li RH, White ML, Winn SR. Stability of hydrogels used in cell encapsulation: an in vitro comparison of alginate and agarose. Biotechnol Bioeng. 1996 May;50(4):374-81.
21. Shikama K, Yamazaki I. Denaturation of catalase by freezing and thawing. Nature. 1961 Apr;190:83-4.
22. Ashwood-Smith MJ, Warby C. Protective effect of low and high molecular weight compounds on the stability of catalase subjected to freezing and thawing. Cryobiology. 1972 Apr;9(2):137-40.

ВПЛИВ НИЗЬКИХ ТЕМПЕРАТУР ЗБЕРІГАННЯ НА БІЛКИ ІНКАПСУЛЬОВАНІ В АЛЬГІНАТНІ МІКРОСФЕРИ

Нарожний С. В., Розанова Е. Д., Нardid О. А.

Резюме. Вивчено вплив низьких температур зберігання на ферментативну активність білків з гемолізату, інкапсульованих у альгінатні мікросфери. Показано що при зберіганні мікросфер з інкапсульованим матеріалом протягом 18 місяців за температури -20°C , вбудовані білки зберігають каталазну активність.

Ключові слова: альгінатні мікросфери, каталазна активність, низькі температури, інкапсульовані білки, низькотемпературне зберігання.

ВЛИЯНИЕ НИЗКИХ ТЕМПЕРАТУР ХРАНЕНИЯ НА БЕЛКИ ИНКАПСУЛИРОВАННЫЕ В АЛЬГИНАТНЫЕ МИКРОСФЕРЫ

Нарожный С. В., Розанова Е. Д., Нардид О. А.

Резюме. Изучено влияние низких температур хранения на ферментативную активность белков из гемолизата, инкапсулированных в альгинатные микросферы. Показано что при хранении микросфер с инкапсулированным материалом в течении 18 месяцев при -20°C , встроенные белки сохраняют каталазную активность.

Ключевые слова: альгинатные микросферы, каталазная активность, низкие температуры, инкапсулированные белки, низкотемпературное хранение.

EFFECT OF LOW-TEMPERATURE STORAGE ON PROTEINS ENCAPSULATED IN ALGINATE MICROSPHERES

Narozhnyi S. V., Rozanova Ye. D., Nardid O. A.

Abstract. The protein encapsulation in matrices based on sodium alginate has already demonstrated its effectiveness in biotechnology as a stabilizing structure for encapsulated compounds. This property of alginate microspheres has been studied at room and positive temperatures. However, the stabilization of macromolecular structure is of special interest for cryobiology, since the low temperatures cause the changes in their structural and functional properties. Therefore, the study of low-temperature storage effect on encapsulated proteins in alginate microspheres provides widening of the application field for matrices based on this biopolymer.

The aim of the study was to evaluate the effect of low-temperature storage of proteins from hemolysate encapsulated in alginate microspheres on their catalase activity.

Object and methods. Alginate microspheres were obtained by dropwise extrusion. For this purpose sodium alginate with hemolysate was dropped into gelling solution. Solution of calcium chloride 2% served as gelling solution. Hemolysate was prepared from erythrocytes obtained from whole blood donation using ultrasound. The catalase activity was determined spectrophotometrically. In this regard the concentration of undecomposed hydrogen peroxide after its incubation with microspheres was assessed recording the colored product of hydrogen peroxide with ammonium molybdate. The size and shape of alginate microspheres were evaluated with light microscopy using MBS-10 microscope.

Results. The conducted study has determined the main parameters affecting the microspheres loading from sodium alginate. They included the value of hydrogen index of alginate solution with encapsulated substance and concentration of encapsulated substance.

Conclusions. It was determined that low-temperature storage of alginate microspheres with encapsulated proteins from hemolysate retained their catalase activity during 18 months at temperature -20°C .

Key words: alginate microspheres, catalase activity, low temperatures, encapsulated proteins, low-temperature storage.

Рецензент – проф. Костенко В. О.

Стаття надійшла 19.04.2018 року