

ЭПР-исследование окислительно-восстановительных реакций водно-солевых экстрактов плаценты человека: влияние температуры хранения и времени экстрагирования

С.В. РЕПИНА, О.А. НАРДИД, Е.Д. РОЗАНОВА, Л.В. ЦЫМБАЛ, М.И. ШЕТИНСКИЙ, Е.И. НАУМЕНКО
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

EPR-Study of Redox Reactions of Human Placenta Aqueous-Saline Extracts: Storage Temperature and Extraction Time Effects

S.V. REPINA, O.A. NARDID, E.D. ROZANOVA, L.V. TSYMBAL, M.I. SCHETINSKY, E.I. NAUMENKO
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine, Kharkov

Методом ЭПР исследовали реакции окисления-восстановления стабильного нитроксильного радикала ТЕМПОН водно-солевыми экстрактами плаценты человека в зависимости от температуры хранения ткани плаценты и времени экстрагирования. Показано, что увеличение времени экстрагирования с 2-х до 12-ти часов, а также хранение ткани плаценты при -20°C в течение месяца приводит к снижению активности окислительно-восстановительного процесса в экстрактах. Замораживание ткани плаценты до -196°C не вызывало существенных изменений окислительно-восстановительной активности экстрактов по сравнению с экстрактами из нативной плаценты. Результаты исследований белок-нуклеотидного состава получаемых водно-солевых экстрактов свидетельствуют о том, что более высокой восстановительной активностью по отношению к ТЕМПОНу обладают высокомолекулярные фрагменты экстрактов.

Ключевые слова: экстракты плаценты человека, ЭПР спиновых зондов, замораживание, белок-нуклеотидный состав, окислительно-восстановительные реакции.

Методом ЕПР досліджували реакції окислення-відновлення стабільного нітроксильного радикала ТЕМПОН водно-сольовими екстрактами плаценти людини в залежності від температури збереження тканини плаценти і часу екстрагування. Показано, що збільшення часу екстрагування з 2-х до 12-ти годин, а також збереження тканини плаценти при -20°C протягом місяця призводить до зниження активності окислювально-відновного процесу в екстрактах. Заморожування тканини плаценти до -196°C не викликає суттєвих змін окислювально-відновної активності екстрактів у порівнянні з екстрактами з нативної плаценти. Результати досліджень білок-нуклеотидного складу одержаних водно-сольових екстрактів свідчать про те, що більш високу відновлюючу активність відносно ТЕМПОНу мають високомолекулярні фрагменти екстрактів.

Ключові слова: екстракти плаценти людини, ЕПР спинових зондів, заморожування, білок-нуклеотидний склад, окислювально-відновні реакції.

Using EPR method there were investigated redox reactions of stable TEMPON nitroxyl radical with human placenta aqueous-saline extracts depending on placenta tissue storage temperature and extraction time. It was demonstrated, that with an increase in extraction time from 2 to 12 hrs, as well as placenta tissue storage at -20°C for a month, there was a decrease in redox process activity in extracts. Freezing of placenta tissue down to -196°C did not significantly affect redox activity of extracts in comparison with those from native placenta. Investigation results of protein-nucleotide composition in the obtained aqueous-saline extracts testify to the fact, that high-molecular extract fragments possess higher reductive activity in respect of TEMPON.

Key-words: human placenta extracts, EPR of spine probes, freezing, protein-nucleotide composition, redox reactions.

Экстракты плаценты человека (ЭПЧ) широко применяются в клинической практике, ветеринарии, косметологии, что обусловлено большим разнообразием биологически активных веществ, содержащихся в плаценте. Установлено, что водно-солевые ЭПЧ богаты различными биоактивными веществами, в частности белками, полидезоксирибонуклеотидами (PDRN), РНК, ДНК, пептидами, аминокислотами, ферментами, микроэлементами и т.д. [2, 14].

В современной литературе по использованию плаценты и ЭПЧ прослеживаются два направления: расширение сферы практического применения их биологического действия как на организм в целом,

Адрес для корреспонденции: Репина С.В., Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 373-31-41, факс: +38 (057) 373-30-84, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Human placenta extracts (HPEs) are widely applied in clinical practice, veterinary, cosmetology, that is stipulated by different biologically active substances, placenta contains. Aqueous-saline HPEs were established to be rich of biologically active substances in particular, proteins, polydeoxyribonucleotides (PDRN), RNA, DNA, peptides, aminoacids, enzymes, microelements [12, 14].

Within current investigations on using placenta and HPE the two directions have been traced: widening of practical application field and therapeutic effect on both whole organism and some organs and tissues; identification of HPEs components, stipulating one or another activity and a direct "target" of their biological

Address for correspondence: Repina S.V., Institute for Problems of Cryobiology&Cryomedicine of the Natl. Acad. Sci. of Ukraine, 23, Pereyaslavska str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 373 3141, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

так и на отдельные органы и ткани; идентификация компонентов ЭПЧ, обуславливающих ту или иную активность, и непосредственной “мишени” их биологического действия. При этом выявлено репаративное, противовоспалительное, антиоксидантное, антитромбозное, иммуномодулирующее их влияние на организм [1, 7, 11, 16].

Для успешного практического применения экстрактов плаценты необходимо исследование их структурно-функциональных характеристик, что важно при использовании криоконсервированных препаратов для выявления и предотвращения повреждающего действия процессов замораживания-отогрева, целенаправленного подбора криопротекторных добавок и температурных режимов, а также для оценки влияния стерилизации на сохранение их биологической активности [3, 4].

Одна из таких характеристик – окислительно-восстановительная активность (редокс-статус) препаратов плаценты. Учитывая сложный полифункциональный состав плаценты, можно утверждать, что реакции окисления-восстановления характерны для этой биосистемы.

Удобным адекватным, неинвазивным для оценки редокс-статуса биологических объектов *in vitro* и *in vivo* является метод ЭПР с использованием стабильных нитроксильных радикалов [5, 10, 12].

Известно, что потеря парамагнетизма стабильными нитроксильными радикалами (нитроксилами) в биообъектах происходит преимущественно в результате реакции восстановления, обусловленной двумя основными причинами: взаимодействием с веществами, содержащими SH-группы (аминокислоты, пептиды, белки); взаимодействием с электрон-переносящими мембранами [5].

При этом нитроксилы восстанавливаются до соответствующих гидроксиламинов с потерей сигнала ЭПР. Впоследствии эти гидроксиламины могут легко окисляться до нитроксидов с восстановлением сигнала ЭПР.

Изучение параметров восстановления нитроксидов в биологических объектах (константы скоростей, локализации участков восстановления) в зависимости от природы биоматериала, температуры определяет возможность использования этого явления и стабильных радикалов как редокс-индикаторов состояния биообъектов [5]. В случае ЭПЧ этот подход можно применять для сравнения биологической активности экстрактов, полученных разными способами, влияния на них замораживания-оттаивания, долгосрочного хранения исходного материала и стерилизации.

Цель работы – изучение влияния температуры хранения ткани плаценты человека и времени экстрагирования на динамику окисления-восста-

effect. At the same time there was revealed reparative, anti-inflammatory, antioxidant, anti-thrombotic, immune modulating effect on organism [1, 7, 11, 16].

For HPEs successful practical application it is indispensable to investigate their structural and functional characteristics, that is important when using cryopreserved preparations to reveal and prevent freeze-thawing damaging effect, motivated selection of cryoprotective additives and temperature regimens, as well as to estimate the sterilisation effect on preserving their biological activity [3, 4].

One of placenta and HPE structural and functional characteristics is redox activity (redox-status) of placenta preparations. Taking into account a complicated polyfunctional placenta composition we can affirm, that redox reactions are typical for this biosystem.

EPR method with using stable nitroxyl radicals is convenient adequate non-invasive method to estimate *in vitro* and *in vivo* the redox-status of biological objects [5, 10, 12].

The loss of paramagnetism by nitroxyls in bioobjects is known to occur mostly as a result of reduction reaction, stipulated by interaction with SH-group-containing substances (aminoacids, peptides, proteins), as well as with electron-transferring membranes [5].

At the same time nitroxyls are reduced up to the corresponding hydroxylamines with EPR signal lost. Further these hydroxylamines can be easily oxidised to nitroxyls with EPR signal recovery.

Studying parameters of nitroxyl reduction in biological objects (rates constant, localisation of reduction sites) depending on biomaterial origin, temperature, determines the possibility to use this phenomenon and stable radicals as redox-indicators for bioobject state [5]. In HPE case this approach can be applied to compare biological activity of extracts, procured by different ways, effect on them of freeze-thawing, long-term storage of initial material and sterilisation.

The work was aimed to study the effect of storage temperature of human placenta tissue and extraction time on redox dynamics of stable nitroxyl radical TEMPON by aqueous-saline HPE for possible evaluation of biological activity of preparations, which may be used in clinical practice.

Materials and methods

Extracts of human placenta, procured from healthy women in labour were studied.

Following aqueous-saline extracts were investigated in the experiment: native placenta (NP); placenta, refrigerated in freezing chamber at -20°C and stored for a month at the same temperature (FP); cryopreserved placenta (CP), placed into liquid nitrogen and stored at -196°C .

новления стабильного нитроксильного радикала ТЕМПОН водно-солевыми ЭПЧ для возможной оценки биологической активности препаратов, которые могут быть использованы в клинической практике.

Материалы и методы

Изучали экстракты плаценты человека, которую получали от здоровых рожениц.

В эксперименте исследовали следующие водно-солевые экстракты из плаценты человека: нативной плаценты (НП); плаценты, замороженной в морозильной камере при -20°C и хранившейся в течение месяца при той же температуре (ЗП); криоконсервированной плаценты (КП), помещенной в жидкий азот и хранившейся сутки при -196°C .

Для получения водно-солевого экстракта из НП ее измельчали ножницами, затем гомогенизировали на высокоскоростном гомогенизаторе MPW-302 (Польша) 5 мин. Добавляли 0,15 M NaCl в соотношении 1:1 и через 2 ч эквilibрации при комнатной температуре центрифугировали при 3000 об/мин 15 мин. После фильтрации отбирали надосадоk для исследований (2-часовая экстракция).

Другую часть гомогенизированной плаценты (после добавления физиологического раствора в том же соотношении) помещали в холодильник при 4°C на 12 ч. Затем центрифугировали, как описано выше, отбирали надосадоk (12-часовая экстракция).

Аналогичную процедуру проводили с ЗП и КП после их отогрева на водяной бане при 20°C .

Окислительно-восстановительную активность ЭПЧ исследовали методом ЭПР спиновых зондов [5] с использованием водорастворимого зонда ТЕМПОН (2,2,6,6-тетраметил-4-оксопиперидин-1-оксил), синтезированного в Институте химической физики РАН. Спектры ЭПР регистрировали на спектрометре "Brucker" ER 100 D (Германия) со стандартной термоприставкой.

Для изучения реакций окисления-восстановления зонда экстрактами плаценты спин-меченые образцы, содержащие разные концентрации зонда, помещали в капилляр и через определенные интервалы времени регистрировали спектры ЭПР. Сравнительный анализ активности ЭПЧ проводили при фиксированной температуре. Для стандартизации условий эксперимента одновременно с ЭПР-сигналом зонда регистрировали сигнал стандарта, представляющего собой кристалл с вкраплением ионов хрома.

В качестве параметра скорости реакции использовали относительные изменения амплитуды центрального компонента спектра ЭПР зонда во времени, контролируемом с момента добавления зонда к экстрактам.

To obtain aqueous-saline extract from NP, it was minced with scissors, then homogenised for 5 min with high-rate MPW-302 homogenizer (Poland). Then we added 0.15 M NaCl in 1:1 ratio and 2 hrs after equilibrating at room temperature and centrifuged at 3000 rot/min for 15 min. After filtration the supernatant was removed for investigation (2-hr extraction).

Other part of homogenised placenta (after adding physiological solution in the same ratio) was placed into refrigerator at 4°C for 12 hrs, then centrifuged (as described above), supernatant was removed (12 hrs extraction).

The same procedure was carried-out with FP and CP after their thawing on water bath at 20°C .

HPE redox reaction was studied with EPR method of spine probes [5] with using water-soluble probe TEMPON (2,2,6,6-tetramethyl-4-oxopiperidine-1-oxyl, synthesised at the Institute of Chemical Physics of Russian Academy of Sciences). EPR spectra were registered with spectrometer "Brucker" ER 100 D (Germany) with standard thermodevice.

For studying redox reactions of placenta extracts the spine-labelled samples, containing different probe concentrations, were placed into a capillary and in the certain time intervals the EPR spectra were recorded. Comparative analysis of HPE activity was performed at a fixed temperature. To standardise the experiment conditions simultaneously with EPR signal of the probe a standard signal was recorded, it represents the crystal with chrome ions' inclusions.

As the parameter of reaction rate we used relative changes if amplitude of key component of EPR probe spectrum in time, being controlled from the moment of probe adding to extracts.

Protein content in placenta extracts were spectrophotometrically found [15], nucleotides were examined with A.S. Spirin's method [6]. Protein distribution on molecular masses in placenta extracts was compared by the method of gel-chromatography in column with sephadex G-200. Turbidity of solutions was estimated on optic density value at 325 nm.

Results and discussion

To use recovery rate parameters for spin probe in placenta extracts and assessment of rate of oxidation-reduction reactions proceeding in this biosystem it is necessary to take into account the following. Reduction reaction is the one of the second order depending on probe concentration, that of redox equivalents of biological object as well as on temperature. Therefore it is very important to standardize experimental conditions. When developing this approach a water soluble TEMPON probe under 10^{-4} M was found as more suitable in reproducing the experimental conditions.

On time dependence of EPR signal intensity of water soluble probe in HPE suspension one can judge

Содержание белка в экстрактах плаценты определяли спектрофотометрически [15], нуклеотидов – методом А.С. Спирина [6]. Сравнение распределения белков по молекулярным массам в экстрактах плаценты проводили методом гель-хроматографии на колонке с сефадексом G-200. Мутность растворов оценивали по величине оптической плотности при 325 нм.

Результаты и обсуждение

При использовании параметров скорости восстановления спинового зонда в экстрактах плаценты, для оценки скорости реакций окисления-восстановления, протекающих в этой биосистеме, необходимо учитывать следующее. Реакция восстановления – реакция второго порядка, зависящая от концентраций зонда и окислительно-восстановительных эквивалентов биообъекта, а также от температуры. Поэтому необходима стандартизация условий эксперимента. При разработке подхода установлено, что наиболее подходящим с точки зрения воспроизведения условий эксперимента можно считать водорастворимый зонд ТЕМПОН в концентрации 10^{-4} М.

По временной зависимости интенсивности сигнала ЭПР водорастворимого зонда в суспензии ЭПЧ можно судить о скорости окислительно-восстановительных процессов, протекающих в ней за время наблюдения при 20°C. Кривые изменения во времени логарифма нормированной интенсивности центрального компонента сигнала ЭПР, представленные для ЭПЧ из НП 2-часовой экстракции (плаценты трех рожениц), имеют сложный характер (рис. 1). На фоне общего спада обнаруживаются немонотонности (изменение хода кривой) в определенных временных точках. Отсутствие линейности наблюдаемой логарифмической зависимости интенсивности от времени свидетельствует о структурно-функциональной неоднородности объекта (водно-солевые ЭПЧ), что может быть следствием: 1) присутствия нескольких активных центров с разными константами скорости реакции восстановления; 2) постепенного проникновения молекул зонда к активным центрам; 3) вовлечения радикалов в реакции рекомбинации; 4) протекания одновременно с восстановлением нитроксидов и их окисления и т.п. Таким образом, кривая изменения интенсивности сигнала ЭПР ТЕМПОНа во времени отображает сложный многофакторный процесс взаимодействия стабильного нитроксильного радикала с активными центрами водно-солевых ЭПЧ, и в целом отображает динамику окислительно-восстановительной активности экстрактов при фиксированной температуре.

on the rate of oxidative reduction processes proceeding in it during the observation time at 20°C. Time changes in curves of normalized intensity logarithm for EPR signal central component represented for HPE from NP of 2hrs' extraction (placentas from 3 women in labour) are of complicated character (Fig. 1). On the background of total fall in certain time points there are observed non-monotonicity (change of curve run). Absence of linearity of observed logarithmic dependence of intensity on time testifies about the structural and functional heterogeneity of an object (aqueous-saline HPE) that may be the consequence of 1) presence of some active centers with various constants of recovery reaction rate; 2) gradual penetration of probe molecules into active centers; 3) involvement of radicals into recombination reaction; 4) proceeding simultaneously with recovery of nitroxyls and their oxidation etc. Thus the curve of change in TEMPON EPR signal intensity in time reflects a complicated multifactor process of interaction of stable nitroxyl radical with active centers of aqueous-saline HPE and in a whole demonstrates the dynamics of redox activity of extracts at a fixed temperature.

NP-derived extracts (2hrs' extraction) manifested at 20°C redox activity for the whole observation term (more than 90 min) with no approaching to plateau (Fig. 1). In this case the divergence of curves of the paramagnetism loss by TEMPON for the second case in comparison with the third one under similar concentrations of total protein (13 mg/ml) probably demonstrates structural and functional peculiarities of initial material.

Comparative studies of the effect of extraction time (2 and 12 hrs) with aqueous saline solutions on redox

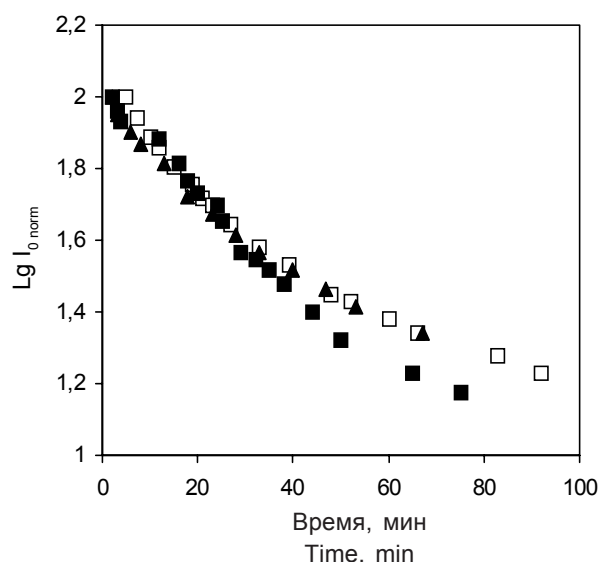


Рис. 1. Восстановление спинового зонда ТЕМПОН в экстрактах НП при 20°C (■, □, △ – плаценты трех рожениц).

Fig. 1. Reduction of TEMPON spine probe with NP extracts at 20°C (■, □, △ – placenta of three women in labour).

Экстракты из НП (время экстракции – 2 ч) обнаруживают при температуре 20°C окислительно-восстановительную активность в течение всего времени наблюдения (более 90 мин) без выхода на плато (рис. 1). При этом расхождение кривых потери парамагнетизма ТЕМПОном для второго случая по сравнению с первым и третьим при одинаковых концентрациях общего белка (13 мг/мл) отображает, очевидно, структурно-функциональные особенности исходного материала.

Сравнительные исследования влияния времени экстракции (2 и 12 ч) водно-солевым раствором на окислительно-восстановительную активность экстрагированных ЭПЧ показали, что увеличение времени экстракции до 12 ч при 4°C приводит к некоторому снижению окислительно-восстановительной активности получаемых экстрактов (рис. 2).

При исследовании влияния хранения ткани плаценты при –20°C в течение месяца на динамику окислительно-восстановительного процесса в водно-солевых экстрактах установлены различия (рис. 3), свидетельствующие о снижении окислительно-восстановительной активности ЭПЧ, притом, что концентрация общего белка в экстрактах из хранившейся плаценты была значительно выше (13,7 и 22,9 мг/мл для НП и ЗП соответственно).

Изучение влияния замораживания ткани плаценты до –196°C (КП) показало отсутствие существенных различий в окислительно-восстановительной активности экстрактов из НП и КП (рис. 4).

activity of HPE extracted showed that the increase of exposure time up to 12 hrs at 4°C resulted in a decrease of redox activity of the extracts being obtained (Fig. 2).

When studying the storage influence for placenta tissue at –20°C for a month on the dynamics of oxidation-reduction process in aqueous saline extracts there were found the differences (Fig. 3) testifying to a diminishing of oxidative-reduction activity of HPE, meanwhile the concentration of total protein in extracts derived from the stored placenta was significantly higher (13.7 and 22.9 mg/ml for NP and FP, correspondingly).

When investigating the effect of placenta tissue freezing down to –196°C (CP) there were not found substantial differences in redox activity of the extracts from NP and CP (Fig. 4).

In the paper there was studied protein-nucleotide composition of obtained aqueous-saline extracts.

Studying the effect of extraction time on the amount of protein in extracts showed that 12 hrs are sufficient for a complete protein extract with physiological solution but depending on initial state of placenta this time varies from 2 up to 12 hrs.

Protein content in extracts from NP varies within the ranges 10÷13 mg/ml, in extracts with FP it was 14÷20 mg/ml whilst freezing temperature did not affect protein content. Results of gel-chromatography of studied placenta extracts (Fig. 5) have shown that amount of protein in extracts at freezing down to –20°C and storage at this temperature for a month increased due to proteins with lower molecular masses, after freezing down to –196°C this is due to higher molecular masses (800 kDa and higher), that is evidently related to a release into the solution of

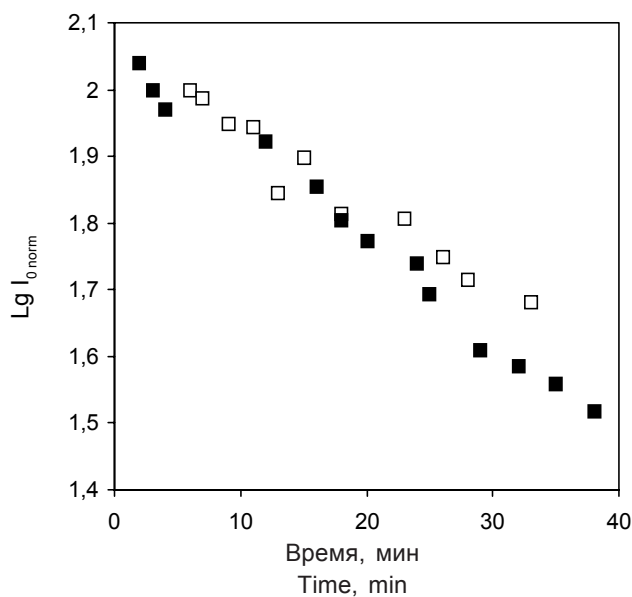


Рис. 2. Восстановление зонда ТЕМПОн в экстрактах НП при 20°C: ■ – 2-часовая, □ – 12-часовая экстракции.
Fig. 2. Reduction of TEMPO spine probe with NP extracts at 20°C (extraction: ■ – 2 hrs, □ – 12 hrs).

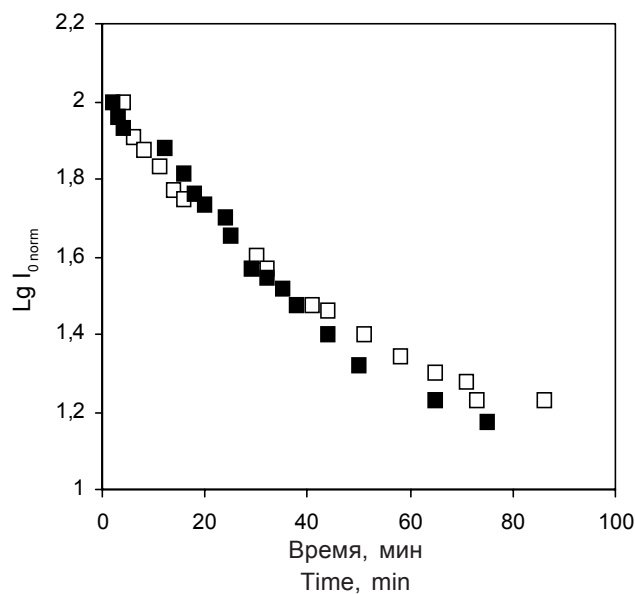


Рис. 3. Восстановление зонда ТЕМПОн экстрактами из: □ – ЗП и ■ – НП (время экстракции – 2 ч).
Fig. 3. Reduction of TEMPO spine probe with placenta extracts: □ – FP, ■ – NP (2 hrs extraction).

В работе было проведено изучение белок-нуклеотидного состава получаемых водно-солевых экстрактов.

Изучение влияния времени экстрагирования на количество белка в экстрактах показало, что 12 ч достаточно для полного экстрагирования белков физиологическим раствором, но в зависимости от исходного состояния плаценты это время колеблется от 2 до 12 ч.

Содержание белка в экстрактах из НП колеблется в пределах 10÷13 мг/мл, в экстрактах из ЗП – 14÷20 мг/мл, причем температура замораживания достоверно не влияла на содержание белка. Результаты гель-хроматографии исследованных экстрактов плаценты (рис. 5) показали, что количество белка в экстрактах при замораживании плаценты до -20°C и хранении при этой температуре в течение месяца увеличивается за счет белков с меньшими молекулярными массами, после замораживания до -196°C – с большими молекулярными массами (800 кД и выше), что, очевидно, связано с выходом в раствор фрагментов разрушенных мембранных структур, о чем свидетельствует большой уровень мутности в первых фракциях гель-хроматографии (рис. 6).

В экстрактах, полученных из плацент, замороженных до -20 и -196°C , увеличение содержания нуклеотидов осуществляется исключительно за счет низкомолекулярных соединений.

Анализ данных по динамике свободнорадикальных реакций свидетельствует о сложной связи между количеством и природой активных центров в экстрактах. Сопоставление этих данных с полученными по белок-нуклеотидному составу позволяет предположить, что окислительно-восстановительная активность водно-солевых экстрактов плаценты человека коррелирует не с количеством общего белка, а со структурно-функциональным состоянием молекулярных компонентов получаемых экстрактов. Причем более высокой восстановительной активностью по отношению к зонду ТЕМПОН обладают высокомолекулярные компоненты ЭПЧ.

Выводы

Полученные данные позволяют заключить, что параметры скорости восстановления стабильных

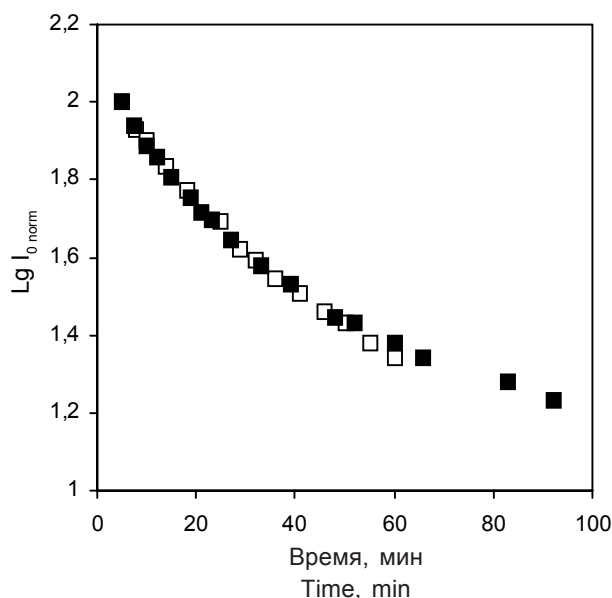


Рис. 4. Восстановление зонда ТЕМПОН экстрактами из: □ – КП и ■ – НП (время экстракции – 2 ч).

Fig. 4. Reduction of TEMPON spine probe with placenta extracts: □ – CP; ■ – NP at 20°C (2 hrs extraction time).

fragments with destroyed membrane structures that is confirmed by high level of turbidity in the first fractions of gel chromatography (Fig. 6).

In the extracts derived from placentas, frozen down to -20° and -196°C the content of nucleotides increases solely due to low molecular compounds.

Analysis of the data on dynamics of free radical reactions testifies to a complex bond between the amount and origin of active centers in the extracts. The collation of these data with those obtained on protein-nucleotide composition enables the supposing that a redox activity of aqueous-saline human placenta

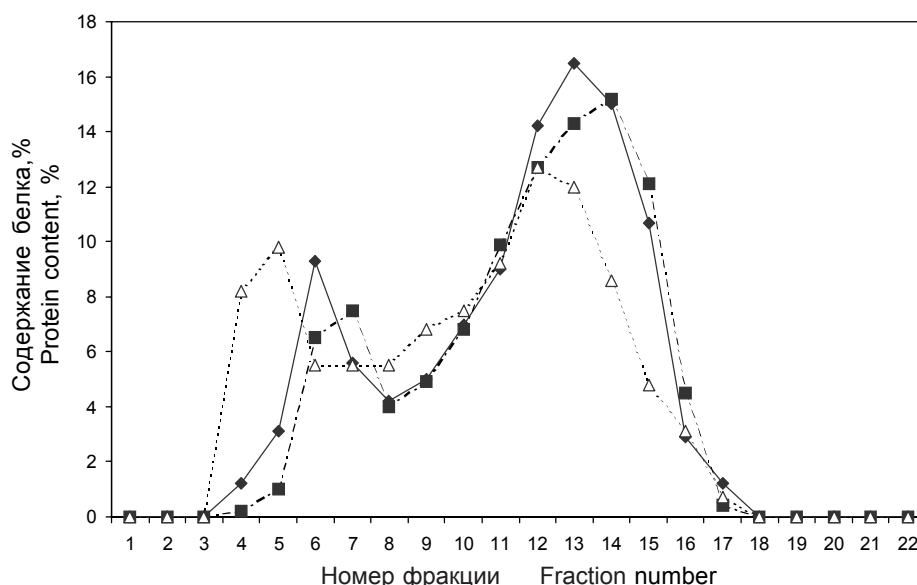


Рис. 5. Распределение белков по фракциям, полученным методом гель-хроматографии: ◆ – НП; ■ – ЗП; △ – КП.

Fig. 5. Protein distribution by fractions, obtained with gel-chromatography method: ◆ – NP extract; ■ – FP extract; △ – CP extract

нитроксильных радикалов могут быть использованы для оценки редокс-потенциала водносолевых ЭПЧ, следовательно, быть тестом на их биологическую активность. Такой тест может применяться для оценки исходного материала (плаценты), т.е. его пригодности для использования экстрактов на практике, что определяется как физиологическими особенностями, возможными патологиями беременной женщины, так и влиянием факторов хранения (срок и температура криоконсервации), стерилизации плаценты (или ее экстрактов), а также других воздействий на исходный материал.

Исследование собственно окислительно-восстановительного потенциала ЭПЧ важно в связи с выраженным антиоксидантным эффектом экстрактов плаценты [17, 18]. На наш взгляд, антиоксидантные свойства делают ЭПЧ особенно перспективными для практической медицины, поскольку известно, что в патогенезе таких распространенных заболеваний, как болезни сердечно-сосудистой системы, астма, диабет, неврологические болезни (Альцгеймера, Паркинсона), почечная недостаточность, алкоголь-индуцированная болезнь печени важную, если не ключевую роль, играет окислительный стресс [8, 9, 13, 19]. Несмотря на широкое применение различных препаратов, обладающих антиоксидантными свойствами, отмечается, что “разработка сильных, безопасных и эффективных антиоксидантов – безусловная потребность современной практической медицины” [13].

Литература

1. Гольцев А.Н., Грищенко В.И., Рассоха И.В., Останков М.В. Возможность использования продуктов эмбрио-фетоплацентарного комплекса как корректора апоптотических процессов при аутоиммунных заболеваниях // Пробл. криобиологии. – 2003. – №4. – С. 41-47.
2. Грищенко В.И., Білоус А.М., Семенченко О.Ю. та ін. Отримання водно-солевого екстракту плацентарної тканини для клінічного та науково-дослідного застосування: Метод. рекомендації. – Харків, 1999. – 12 с.
3. Грищенко В.И., Шепітько В.І., Строна В.І. та ін. Зміна активності дегідрогеназ, вмісту гормонів і стану ліпопероксидації в аlogenній плаценті в залежності від дії низьких температур // Пробл. криобиологии. – 2004. – №1. – С.62-69.

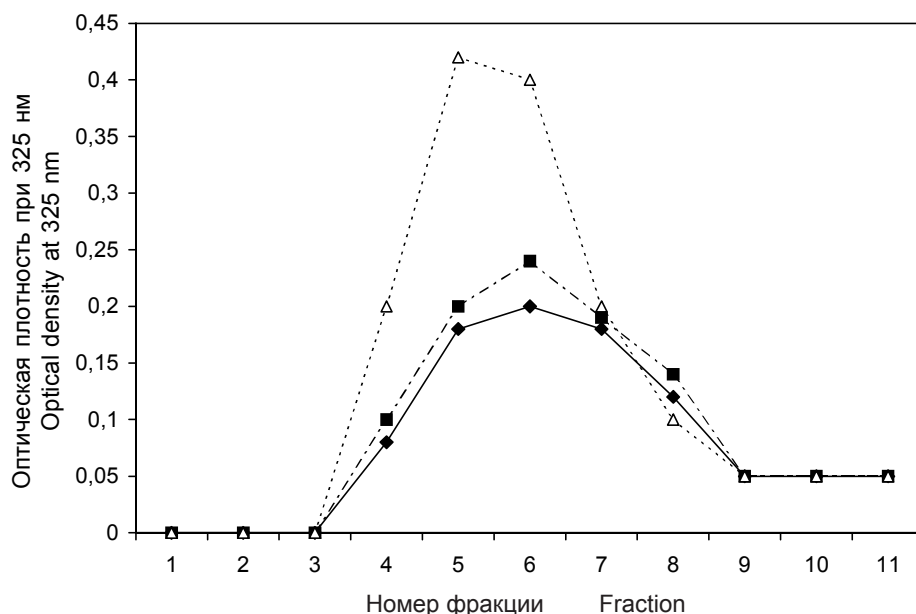


Рис. 6. Оптическая плотность растворов при 325 нм во фракциях после гель-хроматографии: ◆ – НП; ■ – ЗП; △ – КП.

Fig. 6. Optical density of solutions at 325 nm in fractions after gel-chromatography: ◆ – NP extract; ■ – FP extract; △ – CP extract.

extracts correlates not with the amount of total protein but with structural and functional state of molecular components of the extracts obtained. Moreover, high molecular HPE has higher recovering activity in respect of TEMPON probe.

Conclusions

Obtained data permit to conclude about the fact that parameters of recovery rate of stable nitroxyl radicals may be used for estimation of redox-potential of aqueous-saline HPEs and consequently be the test for their biological activity. Such a test may be applied for assessing an initial material (placenta), i.e. the usage validity of its extracts in practice that is determined both by physiological peculiarities, possible pathologies of pregnant woman and the effect of storage factors (cryopreservation term and temperature), placenta sterilization (or its extracts) as well as other effects on initial material.

Investigation of redox potential of HPE itself is important as for their manifested antioxidative effect [17, 18], that is especially perspective for practical medicine. It is known that oxidative stress plays an important role in pathogenesis of diseases of cardiovascular system, asthma, diabetes, neurological diseases (Alzheimer, Parkinson), hepatic insufficiency, alcohol-induced liver disease [8, 9, 13, 19]. In spite of wide application of various preparations with antioxidative properties it is emphasized that “development of strong, safe and effective antioxidants is an absolute demand of current practical medicine” [13].

4. Грищенко В.И., Прокопюк О.С., Волкова Н.А., Перчик О.А. Влияние различных режимов низкотемпературного хранения на содержание гормонов в криоэкстракте плаценты // Пробл. криобиологии.– 2004.– №4.– С. 8-12.
5. Жданов Р.И. Парамагнитные модели биологически активных соединений.– М.: Наука, 1981.– 280 с.
6. Молекулярная биология / Под ред. А.С. Спирина.– М.: Высш. школа, 1990.– 326 с.
7. Шепит'ко К.В. Вплив препаратів кріоконсервованої плаценти на перекисні показники у хворих на стабільну стенокардію // Пробл. криобиологии.– 2004.– №1.– С. 70-74.
8. Arteel G.E. Oxidants and antioxidants in alcohol-induced liver disease // Gastroenterology.– 2003.– Vol. 124, N3.– P. 778-790.
9. Caramori G., Papi A. Oxidants and asthma // Thorax.– 2004.– Vol. 59, N2.– P. 170-173.
10. Fuchs J., Groth N., Herrling T., Zimmer G. Electron paramagnetic resonance studies on nitroxide radical 2,2,5,5-tetramethyl-4-piperidin-1-oxyl (TEMPO) redox reactions in human skin // Free Radic. Biol. Med.– 1997.– Vol. 22, N6.– P. 967-976.
11. Goldfarb G., Doan Ba Tri R., Duran A. Human placental extract for chronic leg ulcer // Lancet.– 1980.– Vol. 2.– P. 40.
12. Nakajima Y., Nakashima T., Inaba K. et al. Effects of nitric oxide on the redox status of liver microsomes-electron spin resonance monitoring using nitroxide probes // Hepatol. Res.– 2002.– Vol. 24, N1. – P. 72.
13. Schoonover L.L. Oxidative stress and the role of antioxidants in cardiovascular risk reduction // Prog. Cardiovasc. Nurs.– 2001.– Vol.16, N1.– P. 30-32.
14. Shibasaki T., Odagiri E., Shizume K., Ling N. Corticotropin-releasing factor like activity in human placental extracts // J. Clin. Endocrinol. Metab.– 1982.– Vol. 55.– P. 384-386.
15. Spectrophotometry and spectrofluorometry / Ed. by Banford C.I., Harris D.A.– Oxford: JRL Press, 1987.– 176 p.
16. Sur T.K., Biswas T.K., Ali L., Mukherjee D. Anti-inflammatory and anti-platelet aggregation activity of human placental extract // Acta Pharmacol. Sin.– 2003.– Vol. 24.– P. 187-192.
17. Togashi S., Takahashi N., Iwana M. et al. Antioxidative collagen-derived peptides in human placenta extract // Placenta.– 2002.– Vol. 23, N6.– P. 497-502.
18. Watanabe S., Togashi S., Takahashi N., Fukui T. L-tryptophan as an antioxidant in human placenta extract // J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo).– 2002.– Vol. 48, N1.– P. 36-39.
19. Zhu X., Raina A.K., Perry G., Smith N. Alzheimer's disease: the two-hit hypothesis // Lancet Neurol.– 2004.– Vol. 3, N4.– P. 219-226.

Поступила 16.04.2005

References

1. Goltsev A.V., Grischenko V.I., Rassokha I.V., Ostankov M.V. Possibility of using the embryo fetoplacental complex products to correct apoptotic processes under autoimmune diseases // Problems of Cryobiology.– 2004.– N4.– P. 41-47.
2. Grischenko V.I., Belous A.M., Semenchenko O.Yu. et al. Obtaining of aqueous saline extract of placenta tissue for clinical and R&D application: Methodical Recommendations.– Kharkiv, 1999.– 12 p.
3. Grischenko V.I., Shepit'ko V.I., Strona V.I. et al. Change in dehydrogenase activity, hormone content and lipoperoxidation state in allogeneic placenta depending upon low temperature effect // Problems of Cryobiology.– 2004.– N1.– P. 62-69
4. Grischenko V.I., Prokopyuk O.S., Volkova N.A., Perchik O.N. Effect of various low temperature storage regimens on placenta cryoextract hormone content // Problems of Cryobiology.– 2004.– N4.–P. 8-12.
5. Zhdanov R.I. Paramagnetic models of biologically active compounds.– Moscow: Nauka, 1981.– 280 p.
6. Molecular biology / Ed. by A.S Spinina.– Moscow. Vysshaya shkola, 1990.– 326 p.
7. Shepit'ko K.V. Effect of cryopreserved placenta preparations on peroxidative indices in patients with stenocardia // Problems of Cryobiology. – 2004.– N1.– P. 70-74.
8. Arteel G.E. Oxidants and antioxidants in alcohol-induced liver disease // Gastroenterology.– 2003.– Vol. 124, N3.– P. 778-790.
9. Caramori G., Papi A. Oxidants and asthma // Thorax.– 2004.– Vol. 59, N2.– P. 170-173.
10. Fuchs J., Groth N., Herrling T., Zimmer G. Electron paramagnetic resonance studies on nitroxide radical 2,2,5,5-tetramethyl-4-piperidin-1-oxyl (TEMPO) redox reactions in human skin // Free Radic. Biol. Med.– 1997.– Vol. 22, N6.– P. 967-976.
11. Goldfarb G., Doan Ba Tri R., Duran A. Human placental extract for chronic leg ulcer // Lancet.– 1980.– Vol. 2.– P. 40.
12. Nakajima Y., Nakashima T., Inaba K. et al. Effects of nitric oxide on the redox status of liver microsomes-electron spin resonance monitoring using nitroxide probes // Hepatol. Res.– 2002.– Vol. 24, N1. – P. 72.
13. Schoonover L.L. Oxidative stress and the role of antioxidants in cardiovascular risk reduction // Prog. Cardiovasc. Nurs.– 2001.– Vol.16, N1.– P. 30-32.
14. Shibasaki T., Odagiri E., Shizume K., Ling N. Corticotropin-releasing factor like activity in human placental extracts // J. Clin. Endocrinol. Metab.– 1982.– Vol. 55.– P. 384-386.
15. Spectrophotometry and spectrofluorometry / Ed. by Banford C.I., Harris D.A.– Oxford: JRL Press, 1987.– 176 p.
16. Sur T.K., Biswas T.K., Ali L., Mukherjee D. Anti-inflammatory and anti-platelet aggregation activity of human placental extract // Acta Pharmacol. Sin.– 2003.– Vol. 24.– P. 187-192.
17. Togashi S., Takahashi N., Iwana M. et al. Antioxidative collagen-derived peptides in human placenta extract // Placenta.– 2002.– Vol. 23, N6.– P. 497-502.
18. Watanabe S., Togashi S., Takahashi N., Fukui T. L-tryptophan as an antioxidant in human placenta extract // J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo).– 2002.– Vol. 48, N1.– P. 36-39.
19. Zhu X., Raina A.K., Perry G., Smith N. Alzheimer's disease: the two-hit hypothesis // Lancet Neurol.– 2004.– Vol. 3, N4.– P. 219-226.

Accepted in 16.04.2005