

Изменение антиоксидантных свойств экстрактов плаценты человека после замораживания

UDC 611.013.85:612.015.21].086.13

S.L. ROZANOVA*, E.I. NAUMENKO, E.D. ROZANOVA, O.A. NARDID

Change of Antioxidative Properties of Human Placental Extracts after Freezing

Представлены экспериментальные данные, полученные при сравнительной оценке влияния различных режимов замораживания-оттаивания на антиоксидантную активность экстрактов плаценты человека, определяемую по способности восстанавливать трехвалентное железо и ABTS⁺-радикал, хелатировать ионы железа, удалять перекись водорода, а также по содержанию фенольных соединений. Показано, что медленное замораживание экстрактов до -20°C приводит к снижению их антиоксидантной активности, в то время как быстрое замораживание до -196°C – к увеличению этой активности за счет конформационных изменений белковых антиоксидантов.

Ключевые слова: замораживание-оттаивание, экстракт плаценты человека, антиоксидантная активность.

Представлено експериментальні дані, отримані при порівняльній оцінці впливу різних режимів заморожування-відігріву на антиоксидантну активність екстрактів плаценти людини, яку визначали за здатністю відновлювати тривалентне залізо та ABTS⁺-радикал, хелатувати іони заліза, видаляти перекис водню та за вмістом фенольних сполук. Показано, що повільне заморожування екстрактів до -20°C призводить до зниження їх антиоксидантної активності, у той час як швидке заморожування до -196°C – до збільшення цієї активності за рахунок конформаційних змін білкових антиоксидантів.

Ключові слова: заморожування-відтавання, екстракт плаценти людини, антиоксидантна активність.

The experimental data, obtained under comparative evaluation of different freeze-thawing protocols' influence on human placenta extract antioxidant activity, estimated by capacity to reduce the ferric iron and ABTS⁺ radical, to chelate ferrous ions, to scavenge hydrogen peroxide and also by phenolic compound content, have been presented. Slow freezing of the extracts down to -20°C has been shown to cause the lowering of its activity, while rapid freezing down to -196°C increases the activity due to protein antioxidants' conformational changes.

Key words: freeze-thawing, human placenta extract, antioxidant activity.

Известно, что обязательным условием нормальной жизнедеятельности биологических систем является генерация активизированных кислородных метаболитов – прооксидантов, к которым относятся супероксидный анион-радикал (O₂⁻), гидроксильный (·OH), алкоксильный (RO·) и пероксильный (ROO·) радикалы, перекись водорода (H₂O₂), синглетный кислород (¹O₂), гипохлорная кислота (HOCl), окись азота (·NO), пероксинитрит (ONOO·). Эти соединения, получившие название "активные формы кислорода" (АФК), обладают широким спектром действия. С одной стороны, некоторые из них принимают участие в процессах сигнальной трансдукции и регуляции ряда важных функций организма. С другой стороны, в силу своей высокой химической активности АФК обладают ярко выраженным гено- и цитотоксическим действием и поэтому представляют серьезную опасность для организма [1, 3, 5].

Постоянное образование прооксидантов в живых организмах уравнивается за счет их дез-

Mandatory condition for normal vital activity of biological systems is known to be the generating the activated oxygen metabolites, the prooxidants, which comprise anion-radical (O₂⁻), hydroxyl (·OH), alcoxyl (RO·) and peroxy (ROO·) radicals, hydrogen peroxide (H₂O₂), singlet oxygen (¹O₂), hypochlorous acid (HOCl), nitrogen oxide (·NO), peroxy nitrite (ONOO·). These compounds defined as "reactive oxygen species" (ROS) are pluripotential ones. On the one hand, some of them participate in the processes of signal transduction and regulation of some important functions of an organism. On the other hand, due to their high chemical activity the ROS have manifested gene- and cytotoxic effect and therefore they are of serious danger for an organism [1, 3, 5].

The constant formation of pro-oxidants in living organisms is balanced due to their deactivation with antioxidants (AO), which can interfere with oxidative processes by means of removing free radicals, chelating of transition metal ions, scavenging the reactive oxygen species. Under the effect of different endo- and exo-

Институт проблем криобиологии и криомедицины
НАН Украины, г. Харьков

* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:
ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.:+38
(057) 373-31-41, факс: +38 (057) 373-30-84, электронная почта:
sv.rosanova@gmail.com

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

* To whom correspondence should be addressed: 23,
Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.:+380 57 373
3141, fax: +380 57 373 3084, e-mail: sv.rosanova@gmail.com

активации антиоксидантами (АО), которые могут препятствовать окислительным процессам посредством удаления свободных радикалов, хелатирования ионов металлов переменной валентности, инактивации активных форм кислорода. Под действием различных эндо- и экзогенных факторов баланс между антиоксидантной системой и АФК в клетках может нарушаться вследствие снижения уровня АО либо гиперпродукции АФК. Состояние резко нарушенного окислительно-восстановительного статуса клеток, когда АФК не могут адекватно блокироваться АО, называют окислительным стрессом. Обладая исключительно высокой химической активностью, прооксиданты могут неспецифически взаимодействовать с любыми молекулами, находящимися в радиусе их чрезвычайно короткого диффузионного пробега, и вызывать окислительную модификацию нуклеиновых кислот, белков, углеводов, индуцировать перекисное окисление липидов (ПОЛ) в мембранах, увеличивать внутриклеточный уровень кальция, активировать протеазы, нуклеазы, фосфолипазы. В итоге эти нарушения приводят к гибели клеток либо к их трансформации, включая злокачественную, а также развитию патологических процессов. Таким образом, в результате нарушения равновесия между прооксидантной и антиоксидантной системами развивается окислительный стресс и, как следствие, возникают и накапливаются окислительные повреждения, что инициирует воспалительные процессы, старение, а также такие заболевания, как рак, атеросклероз, бронхо-легочные заболевания и расстройства нервной системы (например, болезнь Альцгеймера) [1, 3, 5, 22, 25]. Поэтому одной из основных характеристик многих фармацевтических средств является их антиоксидантная активность.

Экстракты плаценты человека (ЭПЧ), благодаря наличию в них большого количества биологически активных веществ, обладают таким важным свойством, как антиоксидантная активность. Этот факт подтверждается экспериментальными данными, полученными различными методами оценки антиоксидантной активности. Показано, что ЭПЧ способны ингибировать гидроксильный и супероксидный радикалы, окись азота, а также восстанавливать трехвалентное железо, предотвращать ПОЛ. Такие свойства экстрактов позволяют применять их для лечения заболеваний, характеризующихся окислительным стрессом [19, 20, 24].

Для увеличения срока хранения препаратов в клинической практике широко применяют низкие температуры. Однако влияние процессов замораживания-оттаивания на свойства гетерогенных композиций макромолекул, обладающих антиоксидантными свойствами, в частности ЭПЧ, в настоящее время еще недостаточно изучено. Известно,

генные факторы баланс между анти-оксидативной системой и ROS в клетках может быть нарушен либо из-за сниженного уровня АО либо из-за гиперпродукции ROS. Состояние резко нарушенного редокс-статуса клеток, когда ROS не могут быть адекватно инактивированы АО, называется окислительным стрессом. Обладая высокой химической активностью, про-оксиданты могут неспецифически атаковать любые молекулы, находящиеся в радиусе их короткого диффузионного пробега, и вызывать окислительную модификацию нуклеиновых кислот, белков, углеводов, индуцировать липидную перекисную окисление (LPO) в мембранах, увеличивать внутриклеточный уровень кальция, активировать протеазы, нуклеазы, фосфолипазы. Наконец, эти нарушения приводят к гибели клеток либо к их трансформации, включая злокачественную, а также развитию патологических процессов. Таким образом, нарушенный баланс между про-оксидантной и анти-оксидантной системами вызывает окислительный стресс, а в результате — появление и накопление окислительных повреждений, приводящих к воспалительным процессам, старению, а также к раку, атеросклерозу, бронхо-легочным заболеваниям и расстройствам нервной системы (например, болезнь Альцгеймера) [1, 3, 5, 22, 25]. Поэтому одной из основных характеристик многих фармацевтических средств является их антиоксидантная активность.

Человеческие плацентарные экстракты (HPE) благодаря высокой концентрации биологически активных веществ, обладают таким важным свойством, как антиоксидантная активность. Этот факт подтверждается экспериментальными данными, полученными различными методами оценки антиоксидантной активности. HPE были продемонстрированы способными ингибировать гидроксильный и супероксидный радикалы, окись азота, а также восстанавливать трехвалентное железо, предотвращать LPO. Эти свойства экстрактов позволяют применять их для лечения заболеваний, характеризующихся окислительным стрессом [19, 20, 24].

Низкие температуры широко применяются в клинической практике для увеличения срока хранения лекарственных средств. Однако влияние процессов замораживания-оттаивания на свойства гетерогенных композиций макромолекул, обладающих антиоксидантными свойствами, в частности HPE, в настоящее время еще недостаточно изучено. Известно, что замораживание может способствовать образованию и накоплению свободных радикалов, а также приводить к конформационным изменениям и агрегации биологических макромолекул, обладающих антиоксидантными свойствами [2, 4, 6, 7, 9, 10, 13, 18]. Таким образом, мы предполагаем, что замораживание может изменить антиоксидантную активность HPE.

Целью исследования было изучение влияния различных протоколов замораживания на антиоксидантные свойства человеческих плацентарных экстрактов.

Materials and methods

В исследовании были использованы 8 плацент, полученных от рожениц с их информированного согласия (38 недель беременности). Аqueous-saline плацентарные экстракты были получены из гомогената плаценты

что замораживание-оттаивание может способствовать образованию и накоплению свободных радикалов с их последующей инактивацией антиоксидантами, а также приводить к изменению конформации и агрегации биологических макромолекул, обладающих антиоксидантными свойствами [2, 4, 6, 7, 9, 10, 13, 18]. Таким образом, мы предполагаем, что в процессе замораживания-оттаивания может изменяться антиоксидантная активность ЭПЧ.

Цель работы – изучение влияния различных режимов замораживания на антиоксидантные свойства водно-солевых экстрактов плаценты человека.

Материалы и методы

В работе использовали 8 плацент, полученных от рожениц с их информированного согласия (срок беременности 38 недель). Водно-солевые экстракты плаценты получали из гомогената ткани, освобожденной от соединительной ткани, путем 12-часовой экспозиции с физиологическим раствором при 4°C. Экстракты замораживали до –20 и –196°C со скоростями 1–2 и 300 градусов/мин соответственно. Отогрев осуществляли на водяной бане при 20°C. Свежевыделенные и подвергнутые замораживанию-оттаиванию экстракты разделяли методом гель-хроматографии на колонке с сефадексом G-200.

Восстанавливающую активность свежевыделенных и подвергнутых замораживанию-оттаиванию экстрактов, а также их фракций оценивали по методу Oyaizu [15]. Способность экстрактов плаценты восстанавливать железо-феррицианидовый комплекс Берлинской лазури определяли по поглощению на длине волны 700 нм. Для этого 0,2 мл образца смешивали с фосфатным буфером (0,5 мл; 0,2 М; pH 6,6) и феррицианидом калия ($K_3Fe(CN)_6$; 0,5 мл; 1%). Полученную смесь выдерживали при 50°C в течение 20 мин, затем к смеси добавляли 0,5 мл трихлоруксусной кислоты (30%) и фильтровали. К 0,5 мл полученного фильтрата добавляли $FeCl_3$ (0,1 мл; 0,1%). Спектры поглощения записывали на длине волны 700 нм на спектрофотометре Pye Unicam SP8000 (Великобритания). Увеличение поглощения реакционной смеси свидетельствовало об увеличении способности образцов восстанавливать трехвалентное железо ($Fe^{3+} \rightarrow Fe^{2+}$). В качестве контроля использовали аскорбиновую кислоту [15].

Спектрофотометрические исследования антирадикальной активности экстрактов и фракций проводили по методу Re *et al.* [17]. Катионный радикал ABTS⁺ получали путем реакции между 7 мМ ABTS в H₂O и 2,45 мМ персульфатом калия, хранивши-

tissues separated from connective tissue by 12 hrs exposure in physiological solution at 4°C. The extracts were frozen down to –20 and –196°C with the rates of 1–2 and 300 grad/min, correspondingly. Thawing was performed in a water bath at 20°C. Freshly isolated and frozen-thawed extracts were separated by the method of gel chromatography using the column with sephadex G-200.

Reducing activity of freshly isolated and frozen-thawed extracts as well as their fractions were assessed by the method of Oyaizu [15]. The ability of placental extracts to reduce ferric-ferricyanide complex of Prussian blue was determined by recording the absorbance at 700 nm. To do this, 0.2 ml of the samples were mixed with phosphate buffer (0.5 ml; 0.2 M; pH 6.6) and potassium ferricyanide [$K_3Fe(CN)_6$] (0.5 M; 1%). The resulted mixture was incubated at 50°C for 20 min, then 0.5 ml of trichloroacetic acid (30%) were added and the mixture was filtrated. 0.5 ml of the obtained filtrate was mixed with $FeCl_3$ (0.1 ml; 0.1%). The absorbance spectra were recorded at 700 nm using spectrophotometer Pye Unicam SP8000 (UK). The rise in absorption of reaction mixture testified to the increased ability of the samples to reduce ferric iron ($Fe^{3+} \rightarrow Fe^{2+}$). Ascorbate was used as the control [15].

Spectrophotometrical studies of anti-radical activity of the extracts and fractions were carried-out according to the method of Re *et al.* [17]. ABTS⁺ cation radical was obtained by means of the reaction between 7 mM ABTS in H₂O and 2.45 mM potassium persulfate, stored for 12 hrs in the darkness at room temperature. Initial substance (0.1 ml) was diluted with 3 ml of distilled water. ABTS⁺ (0.1 ml) was added to the experimental samples and the kinetics of ABTS⁺ radical solution decolorization was recorded. Results were presented as a percentage changes in optical density of initial ABTS⁺ solution.

Chelating activity of the experimental samples was assessed on the method of Dinis *et al.* [8]. 2 mM $FeCl_2$ solution (0.05 ml) was added to 0.2 ml of the experimental sample. The reaction was initiated by the addition of 5 mM ferrozine. The mixture was shaken vigorously and left at room temperature for 10–15 min. After the mixture had reached equilibrium the absorbance of the samples was measured spectrophotometrically at 526 nm. The results were represented as the percentage of inhibition of ferrozine- Fe^{2+} complex formation :

$$Bound Fe^{2+}(\%) = [(A_{control} - A_{sample})/A_{control}] \times 100,$$

where $A_{control}$ – absorbance of ferrozine- Fe^{2+} complex; A_{sample} – absorbance of ferrozine- Fe^{2+} complex in the presence of the studied sample.

The ability of HPE to neutralize H₂O₂ was determined by hydrogen peroxide capacity to form the sta-

мися 12 ч в темноте при комнатной температуре. Исходное вещество (0,1 мл) разводили 3 мл дистиллированной воды. ABTS⁺ (0,1 мл) добавляли к исследуемым образцам и регистрировали кинетику обесцвечивания раствора ABTS⁺-радикала. Результаты представляли в процентах изменения оптической плотности исходного раствора ABTS⁺.

Хелатирующую активность исследуемых образцов оценивали по методу Dinis *et al.* [8]. К 0,2 мл исследуемого образца добавляли раствор 2 мМ FeCl₂ (0,05 мл). Реакцию инициировали добавлением 5 мМ феррозина. Смесь хорошо встряхивали и оставляли при комнатной температуре на 10–15 мин. После достижения в смеси равновесия спектрофотометрически измеряли поглощение образцов на длине волны 562 нм. Результаты представляли как процент ингибирования формирования феррозин-Fe²⁺ – комплекса:

$$\text{Связанный Fe}^{2+}(\%) = [(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}})/A_{\text{control}}] \times 100,$$

где A_{control} – поглощение феррозин-Fe²⁺ – комплекса; A_{sample} – поглощение феррозин-Fe²⁺ – комплекса в присутствии исследуемого образца.

Способность ЭПЧ удалять H₂O₂ определяли по способности перекиси водорода образовывать с молибдатом аммония стойкий окрашенный комплекс. Реакцию запускали добавлением 0,1 мл образца к 2 мл раствора перекиси водорода (0,03%) и останавливали через 10 мин добавлением 1 мл молибдата аммония (4%). Интенсивность окраски измеряли на спектрофотометре на длине волны 410 нм против контрольной пробы, в которой вместо исследуемого образца была вода [11]. Поскольку перекись водорода удаляется преимущественно с помощью ферментов, полученные результаты относили к концентрации белка в образцах, которую определяли спектрофотометрически.

Общее содержание фенолов в образцах оценивали с использованием реагента Фолина (Folin-Ciocalteu, FC) по методу Singleton и Rossi [21] с незначительными изменениями. Исследуемый образец (0,1 мл) смешивали с 1,5 мл FC-реагента, предварительно разведенного 1:10 дистиллированной водой. Полученную смесь выдерживали 5 мин при температуре 22°C, затем добавляли раствор Na₂CO₃ (0,06%). После 30-минутной инкубации при 22°C измеряли поглощение на длине волны 725 нм.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием программного обеспечения “Origin 6.1”. Значимость различий результатов в свежевыделенных ЭПЧ и после замораживания-оттаивания оценивали на основании парного t-теста. Уровень статистической значимости принят как $P < 0,05$.

ble stained complex with ammonium molybdate. The reaction was initiated by adding 0.1 ml of the sample to 2 ml of the hydrogen peroxide solution (0.03%) and stopped in 10 min with adding 1 ml ammonium molybdate (4%). The intensity of staining was measured with spectrophotometer at 410 nm vs. the control sample, comprising water instead of the experimental sample [11]. Since the hydrogen peroxide is mainly scavenged by means of enzymes, the obtained results were referred to the concentration of protein in the samples, which was examined spectrophotometrically.

Total content of phenols in the samples was estimated using the Folin reagent (Folin-Ciocalteu, FC) according to the method of Singleton and Rossi [21] with insignificant modification. The studied sample (0.1 ml) was mixed with 1.5 ml of FC-reagent, preliminary diluted 1:10 with distilled water. The resulted mixture was incubated for 5 min at 22°C, then Na₂CO₃ (0.06%) solution was added. After 30 min incubation at 22°C the absorbance at 725 nm was measured.

The findings were statistically processed using the software Origin 6.1. The value of the differences of the results for fresh and frozen-thawed HPE were assessed using the paired t-test. P values < 0.05 were considered as statistically significant.

Results and discussion

One of the antioxidant characteristics of bioactive substances appears to be their reducing activity, stipulated by the presence of antioxidants able to be donors of electrons.

The method based on the ability of the experimental substances to reduce the Fe³⁺-ferricyanide complex to the Fe²⁺-ferricyanide (FRAP method) is used in order to estimate the reducing activity of different substances. Antioxidants which may be assessed by this method are the substances of low molecular masses, possessing a high redox potential (ascorbic acid, uric acid, phenol compounds).

The experimental results have shown that ferric-reducing activity of extracts from different placentas varies within the limits equivalent to 30–120 μM ascorbate. In fresh extracts the reducing activity is registered in different fractions, obtained using the gel chromatography method. The main part of the activity (from 60 to 80%) is taken by low molecular fractions with molecular mass less than 5 kDa. Slow freezing of HPE down to –20°C leads to the decreasing of this activity. Apparently it can be associated with the partial utilization of antioxidant for scavenging free radicals, generated during freeze-thawing [4]. Ferric-reducing activity is preserved after rapid freezing down to –196°C (Fig. 1).

Kinetics of ABTS⁺ radical reducing has two phases, due to the presence of rapidly and slowly reducing antioxidants [12, 17]. Activity of antioxidants respon-

Результаты и обсуждение

Одной из антиоксидантных характеристик биологически активных веществ является их восстанавливающая активность, обусловленная наличием антиоксидантов, способных быть донорами электронов.

Для оценки восстановительной активности различных веществ использовали метод, основанный на способности исследуемых веществ восстанавливать комплекс Fe^{3+} -феррицианид до Fe^{2+} -феррицианид (метод FRAP). Антиоксиданты, которые могут быть оценены этим методом, – вещества с низкими молекулярными массами, обладающие высоким окислительно-восстановительным потенциалом (аскорбиновая кислота, мочевая кислота, фенольные соединения).

Результаты исследований показали, что железовосстанавливающая активность экстрактов из разных плацент колеблется в пределах, соответствующих 30–120 мкМ аскорбата. В свежих экстрактах восстанавливающая активность отмечается в различных фракциях, полученных методом гель-хроматографии. Основной частью активности (от 60 до 80%) обладают низкомолекулярные фракции с молекулярной массой менее 5 кДа. Медленное замораживание ЭПЧ до $-20^{\circ}C$ приводит к снижению этой активности. Возможно, это связано с частичным расходом антиоксидантов на ингибирование свободных радикалов, образующихся в процессе замораживания-оттаивания [4]. Железовосстанавливающая активность сохраняется после быстрого замораживания до $-196^{\circ}C$ (рис. 1).

Кинетика восстановления $ABTS^+$ -радикала имеет две фазы, которые обусловлены наличием быстро и медленно восстанавливающих антиоксидантов [12, 17]. Активность антиоксидантов, ответственных за быстрое восстановление (аскорбиновая и мочевая кислоты; α -токоферол; аминокислоты, содержащие SH-группы; восстановленный глутатион; фенольные соединения и убихиноны), оценивали по снижению поглощения за первые 10 с, активность медленно восстанавливающих центров определяли по ингибированию окраски за следующие 390 с (рис. 2).

Полученные результаты показали, что медленное замораживание ЭПЧ до $-20^{\circ}C$ приводит к снижению их антирадикальной активности за счет уменьшения активности антиоксидантов, ответственных за быструю фазу. В результате быстрого замораживания до $-196^{\circ}C$ увеличивается антирадикальная активность вследствие повышения активности медленно восстанавливающих центров (рис. 3). Известно, что медленное восстановление $ABTS^+$ -радикала в основном обусловлено действием белков [17]. Поэтому можно предположить,

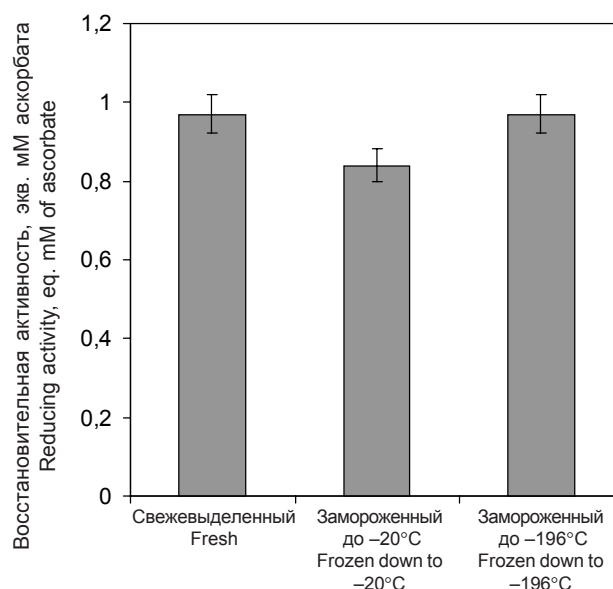


Рис. 1. Железовосстанавливающая способность ЭПЧ свежевыделенного и после замораживания-оттаивания.

Fig. 1. Iron-reducing ability of fresh HPE and the one after freeze-thawing.

sible for rapid reduction (ascorbic acid; uric acid; α -tocopherol; amino acids, containing SH-groups; reduced glutathione; phenol compounds and ubiquinones) was evaluated by decolorization during the first 10 seconds, the activity of slowly reducing centers was estimated by decay during following 390 seconds (Fig. 2).

The obtained results have shown that slow freezing of HPE down to $-20^{\circ}C$ results in a decrease of their antiradical activity due to the lessening of the activity of antioxidants, responsible for a rapid phase.

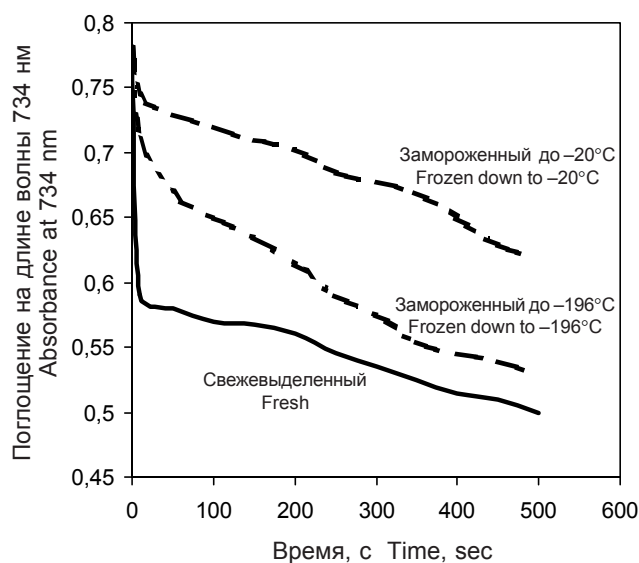


Рис. 2. Кинетика восстановления экстрактами $ABTS^+$ -радикала.

Fig. 2. Kinetics of reduction of $ABTS^+$ radical with the extracts.

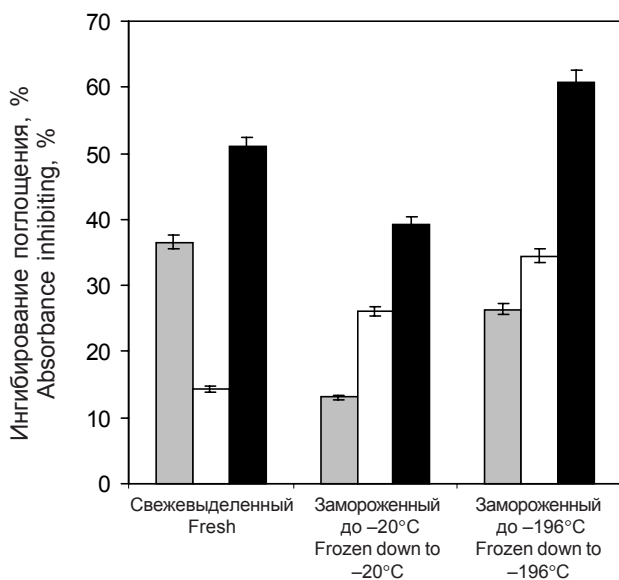


Рис. 3. Влияние различных режимов замораживания на активность быстро и медленно восстанавливающих ABTS⁺-радикал центров ЭПЧ.

Fig. 3. Effect of different freezing regimens on activity of rapidly and slowly reducing the ABTS⁺ radical HPE centers

что полученные результаты вызваны конформационными изменениями белковых молекул, приводящих к увеличению доступности белковых сайтов, ответственных за их антиоксидантные свойства. Это согласуется с данными других авторов, которые показали, что замораживание изолированных белковых молекул приводит к разрыхлению их структуры [2, 16, 23].

Предположение об участии белков в антиоксидантной активности экстрактов подтверждается результатами исследований антирадикальной активности отдельных фракций ЭПЧ. В частности показано, что почти все фракции обладают такой активностью и содержат быстро и медленно восстанавливающие центры. Установлено, что процесс замораживания-оттаивания приводит к увеличению антирадикальной активности в некоторых фракциях с молекулярными массами от 700 кДа за счет как быстрой, так и медленной фаз. Антирадикальная активность уменьшается главным образом за счет снижения в низкомолекулярных фракциях (менее 5кДа).

При анализе содержания в ЭПЧ фенольных соединений, являющихся наиболее эффективными "перехватчиками" свободных радикалов, установлено, что после медленного замораживания (до -20°C) их содержание в ЭПЧ снижается, а после быстрого (до -196°C) достоверно не изменяется (рис. 4).

Исследования способности свежих экстрактов удалять H₂O₂ показали, что данная активность для

Rapid freezing down to -196°C leads to the antiradical activity increasing due to the rise in the activity of slowly reducing centers (Fig. 3). Slow reduction of ABTS⁺ radical is known to be is mainly stipulated with protein molecules' conformational changes [17], which lead to increasing of the accessibility of protein sites, responsible for their antioxidant properties. This is in concordance with the reported observations, that freeze-thawing of isolated protein molecules leads to loosening of their structure [2, 16, 23].

The assumption of protein participation in antioxidant activity of extracts is confirmed by the decolorization assay of separated HPE fractions. In particular, it has been shown that almost all the fractions possess such an activity and contain rapidly and slowly reducing centers. Freeze-thawing has been established to result in the rise if antiradical activity in some fractions with molecular masses from 700 kDa due to both rapid and slow phases. Antiradical activity decreases mainly due to the reduction in low molecular fractions (less than 5 kDa).

When analyzing the content of phenol compounds, being the most effective free radical scavengers, in HPE it has been found that after slow freezing (down to -20°C) their content in HPE decreases, and after rapid one (down to -196°C) does not change statistically and significantly (Fig. 4).

Investigations of the ability of fresh extracts to neutralize H₂O₂ have demonstrated that this activity for samples obtained from different placentas varied from 0.9 to 5 mM/mg of protein and was observed predomi-

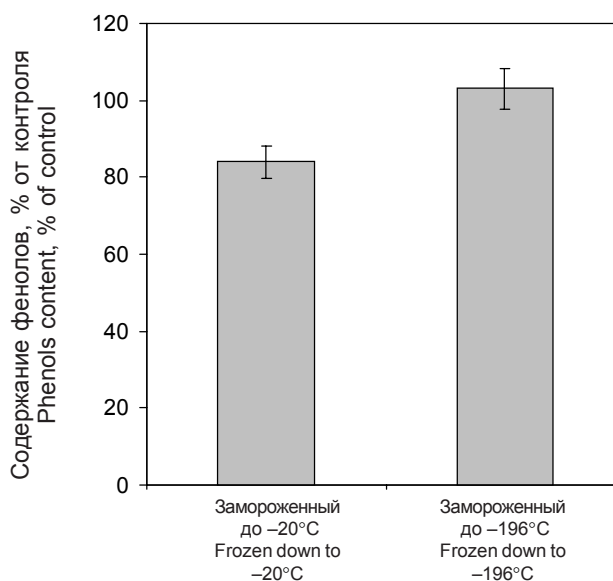


Рис. 4. Содержание фенолов в ЭПЧ после замораживания-оттаивания. Контроль – свежевыделенный ЭПЧ.

Fig. 4. Content of phenols in HPE after freeze-thawing. Fresh HPE is the control.

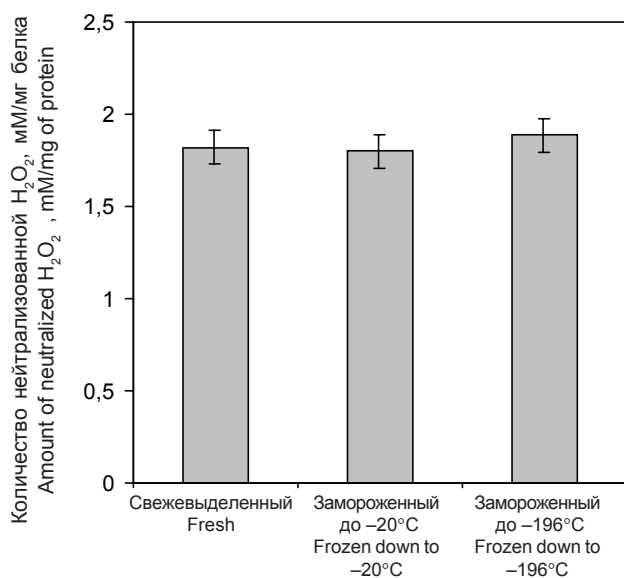


Рис. 5. Влияние различных режимов замораживания на способность ЭПЧ разлагать перекись водорода.

Fig. 5. Effect of different freezing regimens on ability of HPE to break-down the hydrogen peroxide.

образцов из разных плацент была от 0,9 до 5 мМ/мг белка и наблюдалась преимущественно во фракциях с молекулярной массой порядка 200 кДа. Известно, что основным механизмом антиоксидантной защиты во внутриклеточной среде являются ферментативные антиоксиданты, характеризующиеся высокой специфичностью действия, в частности каталаза (молекулярная масса ~250 кДа), обеспечивающая разложение перекиси водорода и препятствующая тем самым ее вовлечению в реакцию Фентона с образованием гидроксильного радикала [1, 3]. Сопоставление литературных данных и полученных нами результатов позволяет предположить, что снижение содержания перекиси водорода в образцах, содержащих ЭПЧ, обусловлено действием каталазы. Исследуемая активность достоверно не изменялась как после медленного, так и после быстрого замораживания (рис. 5).

Одним из основных механизмов антиоксидантной защиты биологических макромолекул во внеклеточной среде являются хелатные соединения, связывающие ионы металлов переменной валентности и препятствующие тем самым их вовлечению в реакции разложения перекисей с образованием гидроксильного радикала. Экспериментально установлено, что хелатирующая способность экстрактов плаценты уменьшается после медленного и увеличивается после быстрого замораживания (рис. 6).

Показано, что частичное разворачивание белков, происходящее под действием нагрева или других стрессорных факторов, увеличивает их антиоксидантную активность [10, 14]. Известен тот

nantly in all the fractions with molecular mass of approximately 200 kDa. The main mechanisms of antioxidant protection in intracellular medium is known to be highly specific enzyme antioxidants, in particular catalase (molecular mass ~250 kDa), providing the decomposition of hydrogen peroxide and preventing thereby its involvement to Fenton's reaction with the formation of hydroxyl radical [1, 3]. The comparing of the literature data and our findings allows to assume that the reduced content of hydrogen peroxide in the samples comprising HPE is stipulated with the effect of catalase. The studied activity did not statistically and significantly differ both after slow and rapid freezing (Fig. 5).

One of the main mechanisms of biological macromolecules' antioxidant protection in extracellular medium are chelating compounds, binding transition metal ions and preventing thereby their involvement into the reactions of peroxide decomposition reaction with the formation of hydroxyl radical. It was experimentally found that chelating ability of placental extracts decreased after slow and increased after rapid freezing (Fig. 6).

It has been shown that partial unfolding of proteins occurring under the effect of heating or other stressor factors increases antioxidant activity [10, 14]. The fact that freezing also leads to the conformational changes of protein molecules is known [6, 7, 10, 13, 18]. Therefore the obtained results enable to speculate that freezing leads to a rise in antioxidant activity due to conformational changes of antioxidant molecules. Decrease in the activity after rapid freezing may be related both to the utilization of antioxidants for scavenging free radicals or to their destruction during the solution concentrating at freezing.

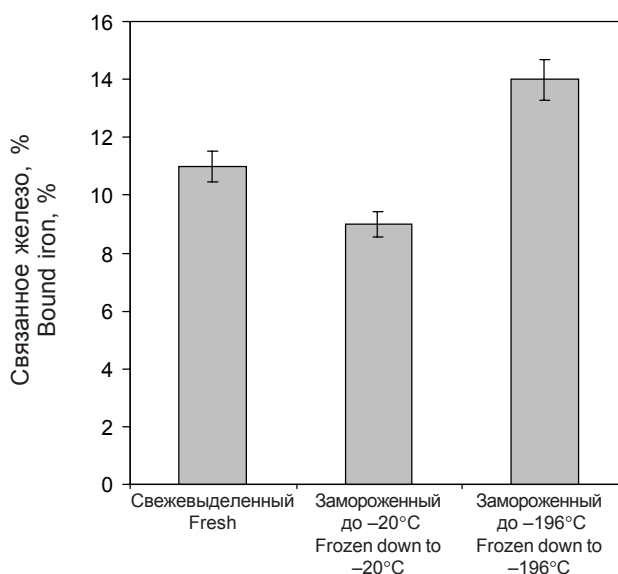


Рис. 6. Хелатирующая активность ЭПЧ.

Fig. 6. Chelating activity of HPE.

факт, что замораживание также приводит к конформационным изменениям белковых молекул [6, 7, 10, 13, 18]. Поэтому полученные результаты позволяют предположить, что замораживание приводит к увеличению антиоксидантной активности вследствие конформационных изменений антиоксидантных молекул. Снижение активности после быстрого замораживания может быть связано как с расходом антиоксидантов на ингибирование свободных радикалов, так и с их разрушением в процессе концентрирования раствора при замораживании.

Выводы

При быстром замораживании повышается антиоксидантная активность ЭПЧ, которая проявляется в увеличении способности ингибировать свободные радикалы и хелатировать ионы железа. В ЭПЧ после быстрого замораживания практически не изменяются железовосстанавливающая активность и способность разлагать перекись водорода. При медленном замораживании ЭПЧ снижается их антиоксидантная активность (кроме способности разлагать перекись водорода), определяемая различными методами. Полученные результаты показали, что для выяснения механизмов влияния замораживания-оттаивания на антиоксидантную активность биологических объектов необходимы дальнейшие исследования. Несомненный интерес представляет также определение роли антиоксидантной активности белков, которая увеличивается после низкотемпературного воздействия, при лечении различных заболеваний.

Литература

1. *Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К.* Антиоксиданты и ингибиторы радикальных окислительных процессов // Успехи современной биологии.– 1993.– Т. 113, N4.– С. 442–453.
2. *Нардид О.А.* Влияние замораживания на структурно-функциональные свойства некоторых гемопротеинов // Проблемы криобиологии.– 1999.– №3.– С.31–34.
3. *Саприн А.Н., Калинин Е.В.* Окислительный стресс и его роль в механизмах апоптоза и развития патологических процессов // Успехи биологической химии.– 1999.– Т. 39.– С. 289–326.
4. *Andrabi S.M.H., Ansari M.S., Ullah N., Afzal M.* Effect of non-enzymatic antioxidants in extender on post-thaw quality of buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa // Pakistan Vet. J.– 2008.– Vol. 28, N4.– P. 159–162.
5. *Berlett B.S., Stadtman E.R.* Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress // J. Biol. Chem.– 1997.– Vol. 272, N33.– P. 20313–20316.
6. *Cao E., Chen Y., Cui Z., Forster P.R.* Effect of freezing and thawing rates on denaturation of proteins in aqueous solutions // Biotechnol. Bioenerg.– 2003.– Vol. 82, N6.– P. 684–690.
7. *Cofrades S., Careche M., Carballo J., Colmenero F.J.* Freezing and frozen storage of actomyosin from different

Conclusions

After rapid freezing the HPE antioxidant activity manifested in the ability to scavenge free radicals and chelate ferrous ions increases. In HPE after rapid freezing the ferric reducing activity and ability to decompose hydrogen peroxide do not change. After slow freezing of HPE their antioxidant activity (except the ability to decompose hydrogen peroxide), examined by different methods, decreases. The findings have shown that to elucidate the mechanisms of the effect of freeze-thawing on antioxidant activity of biological objects the further investigations are needed. Of doubtless interest is also the evaluation of the role of protein antioxidant activity, increasing after low temperature effect, in the treatment of different diseases.

Литература

1. *Menschikova E.B., Zenkov N.K.* Antioxidants and inhibitors of radical oxidative processes // Uspekhi Sovremennoy Biologii.– 1999.– Vol. 113, N4.– P. 442–453.
2. *Nardid O.A.* Effect of freezing on structural and functional properties of some hemoproteins // Problems of Cryobiology - 1999.– N3.– P. 31–34.
3. *Saprin A.N., Kalinina E.V.* Oxidative stress and its role in mechanisms of apoptosis and development of pathological processes // Uspekhi Biologicheskoy Khimii.– 1999.– Vol. 39.– P. 289–326.
4. *Andrabi S.M.H., Ansari M.S., Ullah N., Afzal M.* Effect of non-enzymatic antioxidants in extender on post-thaw quality of buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa // Pakistan Vet. J.– 2008.– Vol. 28, N4.– P. 159–162.
5. *Berlett B.S., Stadtman E.R.* Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress // J. Biol. Chem.– 1997.– Vol. 272, N33.– P. 20313–20316.
6. *Cao E., Chen Y., Cui Z., Forster P.R.* Effect of freezing and thawing rates on denaturation of proteins in aqueous solutions // Biotechnol. Bioenerg.– 2003.– Vol. 82, N6.– P. 684–690.
7. *Cofrades S., Careche M., Carballo J., Colmenero F.J.* Freezing and frozen storage of actomyosin from different species // Z. Lebensm. Unters. Forsch. A.– 1996.– Vol. 203, N4.– P. 316–319.
8. *Dinis T.C.P., Madeira V.M.C., Almeida L.M.* Action of phenolic derivatives (acetoaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxyl radical scavengers // Arch. Biochem. Biophys.– 1994.– Vol. 315, N1.– P. 161–169.
9. *Eckhardt B.M., Oeswein J.Q., Bewley T.A.* Effect of freezing on aggregation of human growth hormone // Pharmaceutical Research.– 1991.– Vol. 8, N11.– P. 1360–1364.
10. *Elias R.J., Kellerby S.S., Decker E.A.* Antioxidant activity of proteins and peptides // Critical Reviews in Food Science and Nutrition.– 2008.– Vol. 48, N5.– P. 430–441.
11. *Goth L.* A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range // Clin. Chim. Acta.– 1991.– Vol. 196, N2/3.– P. 143–151.
12. *Henriquez C., Aliaga C., Lissi E.* Kinetics profiles in the reaction of ABTS derived radicals with simple phenols and polyphenols // J. Chil. Chem. Soc.– 2004.– Vol. 49, N1.– P. 74–76.
13. *Jordan G.M., Yoshioka S., Terao T.* The aggregation of bovine serum albumin in solution and in the solid state // J. Pharm. Pharmacol.– 1994.– Vol. 46, N3.– P. 182–185.
14. *Medina-Navarro R., Duran-Reyes G., Diaz-Flores M., Vilar-Rojas C.* Protein antioxidant response to the stress and the

- species // *Z. Lebensm. Unters. Forsch. A.*– 1996.– Vol. 203, N4.– P. 316–319.
8. *Dinis T.C.P., Madeira V.M.C., Almeida L.M.* Action of phenolic derivates (acetoaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers // *Arch. Biochem. Biophys.*– 1994.– Vol. 315, N1.– P. 161–169.
 9. *Eckhardt B.M., Oeswein J.Q., Bewley T.A.* Effect of freezing on aggregation of human growth hormone // *Pharmaceutical Research.*– 1991.– Vol. 8, N11.– P. 1360–1364.
 10. *Elias R.J., Kellerby S.S., Decker E.A.* Antioxidant activity of proteins and peptides // *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.*– 2008.– Vol. 48, N5.– P. 430–441.
 11. *Goth L.* A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range // *Clin. Chim. Acta.*– 1991.– Vol. 196, N2/3.– P. 143–151.
 12. *Henriquez C., Aliaga C., Lissi E.* Kinetics profiles in the reaction of ABTS derived radicals with simple phenols and polyphenols // *J. Chil. Chem. Soc.*–2004.– Vol. 49, N1.– P. 74–76.
 13. *Jordan G.M., Yoshioka S., Terao T.* The aggregation of bovine serum albumin in solution and in the solid state // *J. Pharm. Pharmacol.*– 1994.– Vol. 46, N3.– P. 182–185.
 14. *Medina-Navarro R., Duran-Reyes G., Diaz-Flores M., Vilar-Rojas C.* Protein antioxidant response to the stress and the relationship between molecular structure and antioxidant function // *PLoS ONE.*– 2010.– Vol. 5, N1.– e8971.
 15. *Oyaizu M.* Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine // *Jpn. J. Nutr.*– 1986.– Vol. 44.– P. 307–315.
 16. *Pawelek P.D., Cheah J., Coulombe R. et al.* The structure of L-amino acid oxidase reveals the substrate trajectory into an enantiometrically conserved active site // *EMBO J.*– 2000.– Vol. 19, N16.– P. 4204–4215.
 17. *Re R., Pellegrini N., Proteggente A. et al.* Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay // *Free Radical Biology and Medicine.*– 1999.– Vol. 26, N9/10.– P. 1231–1237.
 18. *Sarciaux J.M., Mansour S., Hageman M.J., Nail S.L.* Effect of buffer composition and processing conditions on aggregation of bovine IgG during freeze-drying // *J. Pharm. Sci.*– 1999.– Vol. 88, N12.– P. 1354–1361.
 19. *Shinde V., Dhalwal K., Paradkar A.R., Mahadik K.R.* Effects of human placental extract on age related antioxidant enzyme status in D-galactose treated mice // *Pharmacologyonline.*– 2007.– Vol. 1.– P. 252–261.
 20. *Shinde V., Dhalwal K., Paradkar A.R. et al.* Evaluation of *in vitro* antioxidant activity of human placental extract // *Pharmacologyonline.*– 2006.– Vol. 3.– P. 172–179.
 21. *Singleton V.L., Orthofer R., Lamuela-Raventos R.M.* Analysis of total phenols and oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent // *Methods Enzymol.*– 1999.– Vol. 299.– P. 152–177.
 22. *Storz G., Christman M.F., Sies H., Ames B.N.* Spontaneous mutagenesis and oxidative damage to DNA in *Salmonella typhimurium* // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*– 1987.– Vol. 84, N24.– P. 8917–8921.
 23. *Thirion C., Larcher D., Chaillot B. et al.* Circular dichroism studies of freeze-drying-induced conformational changes in human hemoglobin // *Biopolymers.*– 1983.– Vol. 22, N11.– P. 2367–2381.
 24. *Togashi S.I., Takanashi N., Iwama M. et al.* Antioxidative Collagen-Derived Peptides In Human-Placenta Extract // *Placenta.*– 2002. – Vol. 23, N6.– P. 497–502.
 25. *Wolff S.P., Garner A., Dean R.T.* Free radicals, lipids and protein degradation // *Trends Biochem. Sci.*– 1986.– Vol. 11, N1.– P. 27–31.

Accepted in 13.07.2010

*Поступила 13.07.2010
Рецензент О.В. Литина*