

Антиоксидантная активность экстрактов плаценты после низкотемпературного и гипотермического хранения

UDC 57.043:577.121.7:611.013.85.085.23

S.L. ROZANOVA^{1*}, E.D. ROZANOVA¹, O.A. NARDID¹, V.G. KARPENKO²

Antioxidant Activity of Placenta Extracts After Low Temperature and Hypothermic Storage

Представлены экспериментальные данные, полученные при сравнительной оценке влияния гипотермического и низкотемпературного хранения на антиоксидантную активность экстрактов плаценты человека (ЭПЧ). Антиоксидантную активность определяли по способности восстанавливать трехвалентное железо и ABTS⁺-радикал, хелатировать ионы железа, а также по содержанию фенольных соединений. Показано, что при хранении ЭПЧ как в жидком азоте (–196°C), так и в морозильной камере (–20°C) в течение 12 месяцев антиоксидантная активность образцов остается на высоком уровне, а в условиях гипотермии (4°C) она сохраняется не более 7 дней.

Ключевые слова: гипотермическое хранение, низкотемпературное хранение, экстракт плаценты человека, антиоксидантная активность.

Представлено експериментальні дані, отримані при порівняльній оцінці впливу гіпотермічного та низькотемпературного зберігання на антиоксидантну активність екстрактів плаценти людини (ЕПЛ). Антиоксидантну активність визначали за здатністю відновлювати тривалентне залізо та ABTS⁺-радикал, хелатувати іони заліза та за вмістом фенольних сполук. Показано, що за умов зберігання ЕПЛ як у рідкому азоті (–196°C), так і у морозильній камері (–20°C) впродовж 12 місяців антиоксидантна активність зразків залишається на високому рівні, у той час як в умовах гіпотермії (4°C) вона зберігається не більше 7 днів.

Ключові слова: гіпотермічне зберігання, низькотемпературне зберігання, екстракт плаценти людини, антиоксидантна активність.

The experimental data, obtained under comparative evaluation of hypothermic and low temperature storage influence on human placenta extract (HPE) antioxidant activity have been presented. Antioxidant activity was assessed by capacity to reduce the ferric iron and ABTS⁺ radical, to chelate ferrous ions and by phenolic compound content. Twelve-month low temperature storage both in liquid nitrogen (–196°C) as well as in freezing chamber (–20°C) has been shown to preserve HPE antioxidant activity at a high level while during hypothermic storage (4°C) such an activity keeps up to 7 days.

Key words: hypothermic storage, low temperature storage, human placenta extract, antioxidant activity.

Экстракты плаценты человека (ЭПЧ), благодаря наличию в них большого количества таких биологически активных веществ, как белки, пептиды, РНК, ДНК, аминокислоты, микроэлементы, обладают терапевтической активностью [12]. Широкий спектр клинического действия плацентарных препаратов объясняется их антиоксидантными свойствами. Было показано *in vitro*, что ЭПЧ способны ингибировать гидроксильный, супероксидный радикалы, а также окись азота; восстанавливать трехвалентное железо и ABTS⁺-радикал; хелатировать ионы металлов переменной валентности; предотвращать перекисное окисление липидов [1, 13]. Такая активность экстрактов может быть связана с наличием в них веществ, способных быть донорами электронов: аскорбиновой и мочевой кислот, фенольных соединений, SH-содержащих

Human placenta extracts (HPE), due to the comprising of a large number of such biologically active substances as proteins, peptides, RNA, DNA, amino acids, microelements have a therapeutic activity [12]. A wide range of clinical effect of placental preparations is explained by their antioxidant properties. HPE were shown *in vitro* as capable to inhibit hydroxyl, superoxide radicals, as well as nitric oxide, to reduce the ferric iron and ABTS⁺-radical; to chelate transition metal ions and prevent lipid peroxidation [1, 13]. Such an extract activity may be associated with the presence of the substances, capable for being electron donors: ascorbic and uric acids, phenolic compounds, SH-containing substances. However, the HPE antioxidant activity is greatly stipulated by comprised proteins.

Cryopreservation is widely used to prolong the storage term for different preparations. However, after

¹Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

²Харьковская медицинская академия последипломного образования МЗ Украины

* 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

¹Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

²Kharkov Medical Academy of Post-Diploma Education, 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

соединений. Однако в значительной степени антиоксидантная активность ЭПЧ обусловлена белками, входящими в их состав.

Для продления срока хранения различных препаратов широко применяется криоконсервирование. Однако после хранения экстрактов в замороженном состоянии их свойства могут изменяться. Процесс замораживания-оттаивания способен инициировать изменение конформации и агрегацию биологических макромолекул [2, 7, 11], в том числе и обладающих антиоксидантными свойствами. Показано, что быстрое замораживание ЭПЧ повышает антиоксидантную активность: увеличивается их способность ингибировать свободные радикалы и хелатировать ионы железа, медленное замораживание ЭПЧ снижает их антиоксидантную активность [1]. Ведущую роль в изменении антиоксидантной активности ЭПЧ, по-видимому, играют конформационные изменения белков. Характер влияния низкотемпературного хранения на антиоксидантные свойства сложных композиций макромолекул, а в частности на ЭПЧ, практически не изучен.

Цель работы – изучить влияние низкотемпературного хранения ЭПЧ на их антиоксидантные свойства.

Материалы и методы

В работе использовали 8 плацент, полученных от рожениц с их информированного согласия (срок беременности 38 недель). Свежую плаценту отмывали от крови изотоническим раствором NaCl. Удаляли амниотические оболочки и соединительнотканьные участки котиледонов. Ткань плаценты измельчали в гомогенизаторе. К гомогенату свежей плаценты добавляли равный объем изотонического раствора NaCl, перемешивали и оставляли для экстрагирования на 12 ч. После этого гомогенат центрифугировали 15 мин при 3000 g. Полученный фильтрат являлся водно-солевым экстрактом плаценты.

Для исследования влияния гипотермического хранения на антиоксидантную активность ЭПЧ, их хранили в холодильнике при 4°C 7 суток.

Для изучения влияния низкотемпературного хранения ЭПЧ помещали в пластиковые пробирки и замораживали до температур –20 и –196°C в морозильной камере и жидком азоте со скоростями 1–2 и 100 град/мин соответственно. Затем часть образцов отогревали для исследования влияния процесса замораживания-оттаивания, оставшиеся – хранили в течение одного года. Отогрев осуществляли на водяной бане при 20°C.

Отдельные фракции экстрактов получали методом гель-хроматографии на колонке 27×1 см с сефадексом G-200. На колонку наносили 0,5 мл экс-

tracting the extracts in a frozen state their properties may change. Freeze-thawing process is capable to initiate a change in conformation and aggregation of biological macromolecules [2, 7, 11], including those with antioxidant properties. Rapid freezing of HPE results in a rise of antioxidant activity: their capability to inhibit free radicals and chelate ferrous ions increases, and *vice versa* slow freezing leads to the reducing of their antioxidant activity [1]. A key role in changed HPE antioxidant activity is apparently played by conformational changes in proteins. The nature of low temperature storage effect on antioxidant properties of complex compositions of macromolecules, HPE in particular, has still remained poorly studied.

The research was aimed to study the effect of low temperature storage of HPE on their antioxidant properties.

Materials and methods

The research was performed using 8 placentas, derived from the parturients with their informed consent (38 weeks of gestation). Fresh placenta was washed free of blood with NaCl isotonic solution. Amniotic covers and connective-tissue sites of cotyledons were removed. Placenta tissue was minced in homogenizer. To fresh placenta homogenate we added an equal volume of NaCl isotonic solution, mixed and left for extracting for 12 hours. Afterwards the homogenate was centrifuged within 15 min at 3000 g. The obtained filtrate was an aqueous-saline placenta extract.

For studying hypothermic storage effect on HPE antioxidant activity they were stored in refrigerator at 4°C during 7 days.

In order to investigate the low temperature effect the HPE were placed into plastic vials and cooled down to –20 and –196°C in freezing chamber and liquid nitrogen with 1–2 and 100 deg/min rates, correspondingly. Then some samples were thawed for studying the influence of freeze-thawing process itself, the rest were stored within one year. The thawing was done in a water bath at 20°C.

Individual fractions of extract were derived using gel chromatography in 27×1 cm column with Sephadex G-200. We applied 0.5 ml extract onto the column. The resulted volume of fractions was 1 ml. Protein concentration was examined spectrophotometrically [5].

Reducing activity of both extracts and their fractions was assessed by the method of Oyaizu (FRAP method) [8]. The ability of placenta extracts to reduce ferric-ferricyanide complex of Prussian blue was determined by recording the absorbance at 700 nm. With this aim, 0.2 ml of the sample were mixed with phosphate buffer (0.5 ml; 0.2 M; pH 6.6) and potassium ferricyanide [$K_3Fe(CN)_6$] (0.5 ml; 1%). The resulted mixture was incubated at 50°C for 20 min, then 0.5 ml of trichloroacetic acid (30%) were added and the mix-

тракта. Элюировали фракции по 1 мл. Концентрацию белка определяли спектрофотометрически [5].

Восстанавливающую активность экстрактов, а также их фракций оценивали по методу Ouyazi (метод FRAP) [8]. 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, Англия. Увеличение поглощения реакционной смеси свидетельствовало о повышении способности образцов восстанавливать трехвалентное железо ($Fe^{3+} \rightarrow Fe^{2+}$). Для контроля использовали аскорбиновую кислоту [8].

Спектрофотометрические исследования антирадикальной активности образцов проводили по методу Re *et al.* [10]. $ABTS^+$ -катионный радикал получали путем реакции ABTS (2,2'-азинобис-(3-этилбензотиазолин-6-сульфонической кислоты), 7 мМ, Sigma) в H_2O с аммоний персульфатом (2,45 мМ, Sigma), хранившихся 12 ч в темноте при комнатной температуре. Раствор $ABTS^+$ (0,1 мл) разводили дистиллированной водой до величины оптической плотности, равной $0,7 \pm 0,02$. Исходные и подверженные хранению экстракты (0,1 мл) добавляли к полученному веществу и регистрировали кинетику обесцвечивания раствора $ABTS^+$ -радикала. Результаты представляли в процентах изменения поглощения исходного раствора $ABTS^+$.

Хелатирующую активность исследуемых образцов оценивали по методу Dinis *et al.* [3]. К 0,2 мл исследуемого образца добавляли 2 мМ раствора $FeCl_2$ (0,05 мл). Реакцию инициировали добавлением 5 мМ феррозина (Sigma). Смесь встряхивали и оставляли при комнатной температуре на 10–15 мин. Затем спектрофотометрически измеряли поглощение образцов на длине волны 562 нм. Хелатирующую активность определяли по способности исследуемых веществ связывать ионы Fe^{2+} , в результате чего уменьшалось количество окрашенного феррозин- Fe^{2+} комплекса.

Общее содержание фенолов в образцах измеряли с использованием реагента фолина (Folin-Ciocalteu (FC)) по методу Singleton и Rossi [14] с незначительными изменениями. Исследуемый образец (0,1 мл) смешивали с 1,5 мл FC-реагента, предварительно разведенного дистиллированной водой 1:9. Полученную смесь выдерживали 5 мин при температуре 22°C, затем к ней добавляли раствор

was filtrated. The obtained filtrate (0.5 ml) 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 [8].

Spectrophotometrical studies of anti-radical activity in samples were carried-out according to the method of Re *et al.* [10]. $ABTS^+$ cation radical was obtained by means of ABTS reaction (2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), 7 mM, Sigma) in H_2O with potassium persulfate (2.45 mM, Sigma), stored for 12 hrs in the darkness at room temperature. The $ABTS^+$ solution (0.1 ml) was diluted with distilled water up to the value of optical density equal to 0.7 ± 0.02 . Initial extracts and those after storage (0.1 ml) were added to the obtained substance and the kinetics of $ABTS^+$ radical solution decolorization was recorded. Results were presented as percentages of absorption changes in $ABTS^+$ initial solution.

Chelating activity in the experimental samples was assessed by the method of Dinis *et al.* [3]. 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 (Sigma). The mixture was shaken and left at room temperature for 10–15 min. Then the samples' absorbance was measured spectrophotometrically at 526 nm. Chelating activity was determined by the capability of the studied substances to bind Fe^{2+} ions, resulting in a decreased number of stained ferrozine- Fe^{2+} complex.

Total phenol content in samples was measured using the Folin reagent (Folin-Ciocalteu, FC) according to the method of Singleton and Rossi [14] with slight modifications. The studied sample (0.1 ml) was mixed with 1.5 ml of FC-reagent, preliminary diluted 1:9 with distilled water. The resulted mixture was incubated for 5 min at 22°C, then Na_2CO_3 (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. Data in Figures are presented as the mean \pm standard error. 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 most common ways for storing biological objects in clinical practice is a hypothermic storage (at 0...6°C). In order to determine the storage terms of HPE under hypothermia, during which their antioxidant activity remains preserved, as well as to reveal the nature of changes in this activity, the extracts were stored in domestic refrigerator at 4°C.

Na₂CO₃ (0,06%). После 30-минутной инкубации при 22°C измеряли поглощение на длине волны 725 нм.

При статистической обработке полученных результатов использовали программное обеспечение Origin 6.1. Данные на рисунках приведены как среднее значение ± стандартная ошибка. Значимость различий результатов в свежевыделенных ЭПЧ и после замораживания оценивали на основании парного t-теста. Уровень статистической значимости $P < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Один из самых распространенных способов хранения биологических препаратов в клинической практике – гипотермический (при 0...6°C). Для определения сроков хранения ЭПЧ в условиях гипотермии, при которых сохраняется их антиоксидантная активность, а также выяснения характера изменения данной активности экстракты хранили в бытовом холодильнике при 4°C.

Исследования влияния гипотермического хранения на железозаменяющую активность показали, что на 2-е сутки она повышается, однако на 4-е наблюдается ее снижение (рис. 1). Антиоксиданты, активность которых может быть оценена этим методом, – вещества с низкими молекулярными массами, обладающие высоким окислительно-восстановительным потенциалом ($\leq 0,7$ V) (α -токоферол, аскорбиновая и мочевая кислоты, фенолы, полифенолы) [9].

Метод определения антиоксидантной активности, основанный на способности восстанавливать ABTS⁺-радикал, позволяет оценить более широкий спектр антиоксидантов, включая и антиоксиданты с низким окислительно-восстановительным потенциалом. Кинетика ингибирования ABTS⁺-катион-радикала имеет быструю и медленную фазы, что позволило определить активность быстро и медленно восстанавливающих антиоксидантов. Активность быстро восстанавливающих антиоксидантов (к ним относятся аскорбиновая и мочевая кислоты, фенольные соединения, α -токоферол, аминокислоты, содержащие SH-группы, восстановленный глутатион, убихиноны) можно определить по уровню ингибирования окраски в течение первых 10 с, активность медленно восстанавливающих антиоксидантов (преимущественно белков и аминокислот) по снижению интенсивности окраски, которая наблюдалась следующие 390 с [6, 9].

Способность ЭПЧ восстанавливать ABTS⁺-радикал в процессе гипотермического хранения как и антиоксидантная активность, определенная по методу FRAP, как для быстро, так и для медленно восстанавливающих центров повышается в первые сутки хранения. При дальнейшем хранении она снижается (рис. 2).

Studies of hypothermic storage effect on ferric-reducing activity demonstrated its increasing to the 2nd day, but to the 4th day we observed its decrease (Fig. 1). The antioxidants, which activity may be assessed with this method are the substances of low molecular masses, possessing a high redox potential (≤ 0.7 V) (α -tocopherol, ascorbic and uric acids, phenol, polyphenols) [9].

The method of antioxidant activity assessment, based on the ability to reduce ABTS⁺ radical, enables to investigate a wider range of antioxidants, including those with low redox potential. The kinetics of ABTS⁺ cation-radical inhibition has rapid and slow phases, which enable to determine the activity of rapidly and slowly reducing antioxidants. The activity of rapidly reducing antioxidants (among these are ascorbic and uric acids, phenol compounds, α -tocopherol, amino acids with SH-groups, reduced glutathione, ubiquinones) may be determined according to the level of decolorization within first 10 sec, the activity of slowly reducing antioxidants (mostly proteins and amino acids) may be assessed by a decrease in color intensity, observed within following 390 sec [6, 9].

The HPE ability to reduce ABTS⁺-radical during hypothermic storage, as well as an antioxidant activity, determined by the FRAP method, both for rapidly and slowly reducing centers increase within first storage day. During following storage these indices reduce (Fig. 2).

One of the main mechanisms for antioxidant protection of biological macromolecules in extracellular environment is the action of chelating substances, bind-

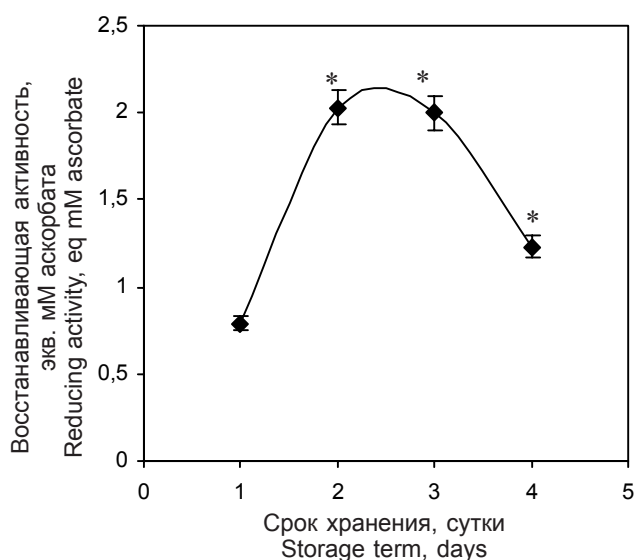


Рис. 1. Влияние гипотермического хранения на железозаменяющую активность ЭПЧ; * – достоверность отличий по сравнению с ЭПЧ на первые сутки, $P < 0,05$.

Fig. 1. Effect of hypothermic storage on HPE ferric-reducing activity; * – statistical significance of differences as compared to the data of the first day, $P < 0.05$.

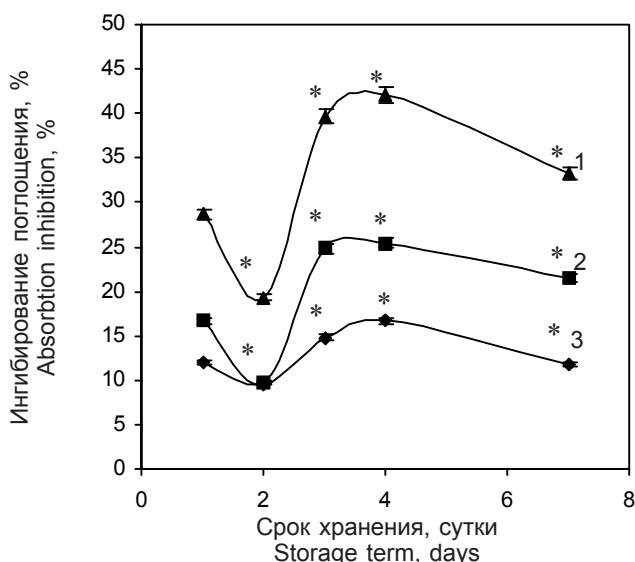


Рис. 2. Влияние гипотермического хранения на способность ЭПЧ восстанавливать $ABTS^+$ -радикал: 1 – быстрое восстановление; 2 – медленное восстановление; 3 – общее восстановление; * – достоверность отличий по сравнению с ЭПЧ на первые сутки, $P < 0,05$.

Fig. 2. Effect of hypothermic storage on HPE capability to reduce $ABTS^+$ -radical: 1 – rapid reduction; 2 – slow one; 3 – total reduction, * – statistical significance of differences as compared to the data of the first day, $P < 0.05$.

Одним из основных механизмов антиоксидантной защиты биологических макромолекул во внеклеточной среде являются хелатные соединения, связывающие ионы металлов переменной валентности и препятствующие их вовлечению в реакции разложения перекисей с образованием гидроксильного радикала. Было показано, что данная активность полностью исчезает на 4-е сутки гипотермического хранения (рис. 3).

Повышение антиоксидантной активности быстро восстанавливающих центров, железовосстанавливающей и хелатирующей способностей на 2-е сутки гипотермического хранения, возможно, связано с накоплением мочевой кислоты, образующейся в результате распада АТФ и подобных структур [15]. Это предположение подтверждается значительным снижением оптической плотности при 260 нм в процессе хранения во фракциях с молекулярной массой ниже 5 кДа (рис. 4).

Наблюдаемое в тот же период повышение антиоксидантной активности медленно восстанавливающих центров, по-видимому, связано с диссоциацией белковых молекул или их разрушением под действием протеолитических ферментов и с увеличением доступности антиоксидантных групп белков. Это предположение основывается на результатах гель-хроматографии: в процессе хранения увеличивается относительное содержание белка в низкомолекулярных фракциях (рис. 5).

ing transition metal ions and preventing thereby their involvement into the reactions of peroxide decomposition with the formation of hydroxyl radical. This activity was shown as completely disappearing to the 4th day of hypothermic storage (Fig. 3).

An increased antioxidant activity of rapidly reducing centers, ferric-reducing and chelating capabilities to the 2nd day of hypothermic storage is probably associated with the accumulation of uric acid, resulted from decomposition of ATP and similar structures [15]. This assumption is confirmed by a significant decrease of optical density at 260 nm during storage of fractions with molecular mass lower than 5 kDa (Fig. 4).

The observed within the same period an increased antioxidant activity of slowly reducing centers is apparently related with the dissociation of protein molecules or their decomposition under the effect of proteolytic enzymes as well as the augmentation of protein antioxidant group availability. This assumption is based on the results of gel chromatography: during storage there is an increase in a relative protein content in low molecular fractions (Fig. 5).

Phenolic compounds are the most effective free radical scavengers. Hypothermic storage was noted as resulting in a decrease of total phenol content in HPE (Fig. 6).

Thus, the results obtained testify to the fact, that during HPE hypothermic storage a significant reduction of antioxidant activity within one week is observed. This is apparently stipulated by structural changes in antioxidants or their utilization for inhibiting the oxidants, formed during storage.

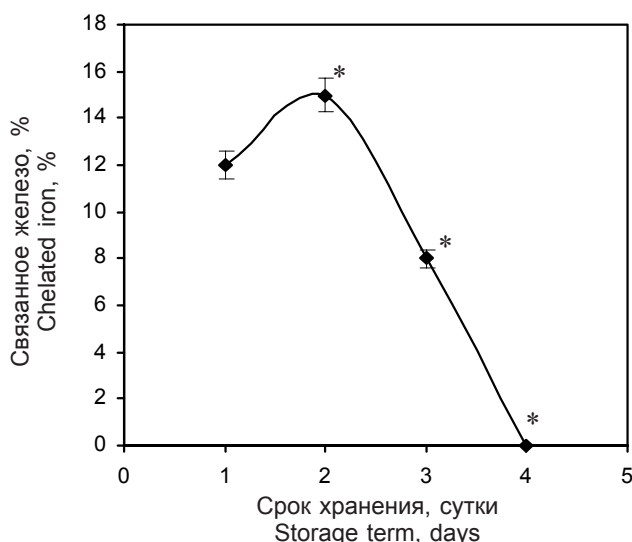


Рис. 3. Влияние гипотермического хранения на хелатирующую активность ЭПЧ; * – достоверность отличий по сравнению с ЭПЧ на первые сутки, $P < 0,05$.

Fig. 3. Effect of hypothermic storage on HPE chelating activity; * – statistical significance of differences as compared to data of the first day, $P < 0.05$.

Фенольные соединения являются наиболее эффективными “перехватчиками” свободных радикалов. Отмечено, что гипотермическое хранение приводит к снижению общего содержания фенолов в ЭПЧ (рис. 6).

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что в процессе гипотермического хранения ЭПЧ наблюдается значительное снижение антиоксидантной активности в течение одной недели. Это, по-видимому, обусловлено структурными изменениями антиоксидантов или их расходом на ингибирование образующихся в процессе хранения окислителей.

Хранение ЭПЧ при отрицательных температурах 12 месяцев позволяет значительно сохранить антиоксидантную активность экстрактов.

Железовосстанавливающая активность ЭПЧ после быстрого замораживания до -196°C с последующим отогревом и после хранения в течение года при той же температуре не изменяется, а хранение при -20°C приводит к дополнительному снижению железовосстанавливающей активности по сравнению с замораживанием-оттаиванием (рис. 7). Уменьшение железовосстанавливающей активности в процессе хранения может быть связано со снижением содержания в ЭПЧ низкомолекулярных антиоксидантов, в частности мочевой кислоты [4].

Анализ кинетики восстановления ABTS^+ -радикала показал, что данная активность полностью сохраняется после низкотемпературного хранения. Хранение экстрактов при -196°C не вносило дополнительных изменений в активность быстро и мед-

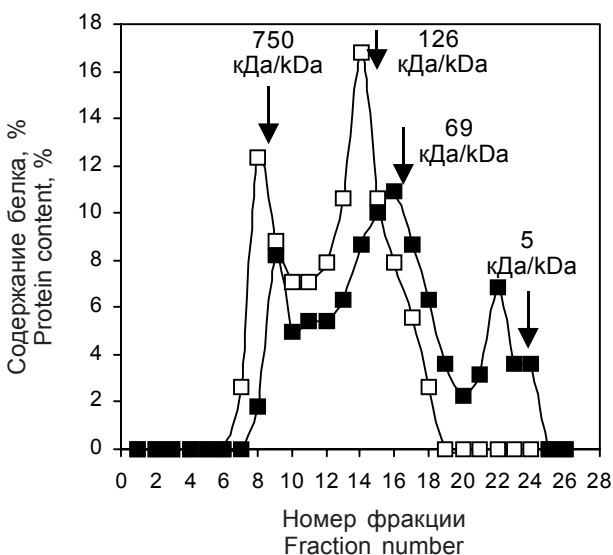


Рис. 5. Гель-хроматограммы ЭПЧ после хранения при 4°C : \square – исходный ЭПЧ; \blacksquare – ЭПЧ, хранившийся 3 суток при -20°C .

Fig. 5. HPE gel chromatography after storage at 4°C : \square – initial HPE; \blacksquare – HPE, stored for 3 days at -20°C .

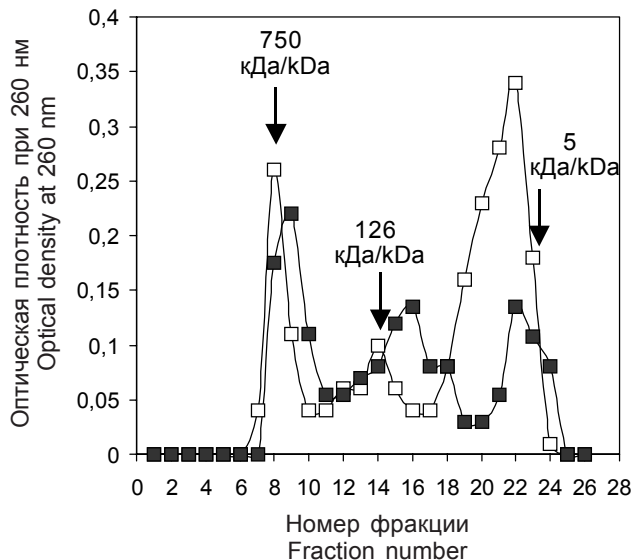


Рис. 4. Изменение оптической плотности при 260 нм в различных фракциях, полученных методом гель-хроматографии в процессе хранения при 4°C : \square – исходный ЭПЧ; \blacksquare – ЭПЧ, хранившийся 3 суток при -20°C .

Fig. 4. Changes in optical density at 260 nm in different fractions, isolated with gel chromatography method after storage at 4°C : \square – initial HPE; \blacksquare – HPE, stored for 3 days at -20°C .

HPE storage under negative temperatures within 12 months enables a high retaining of antioxidant activity of the extracts.

The HPE ferric-reducing activity after a rapid freezing down to -196°C with following thawing and after one-year-storage at the same temperature remains

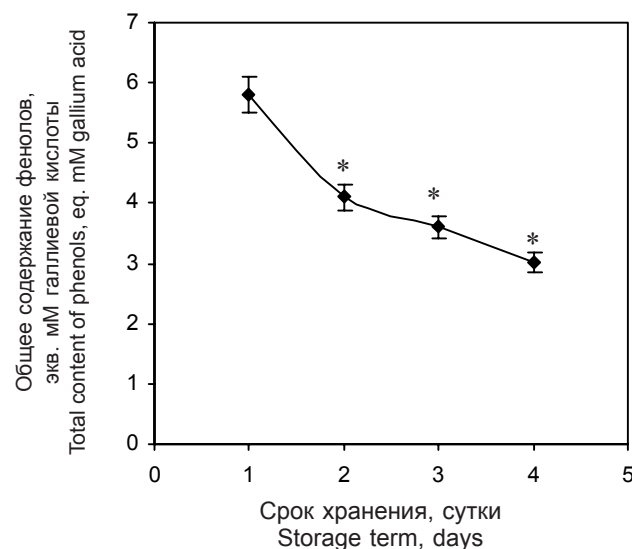


Рис. 6. Содержание фенолов в ЭПЧ после хранения при 4°C ; * – достоверность отличий по сравнению с ЭПЧ на первые сутки, $P < 0,05$.

Fig. 6. Phenol content in HPE after storage at 4°C ; * – statistical significance of differences as compared to data of the first day, $P < 0.05$.

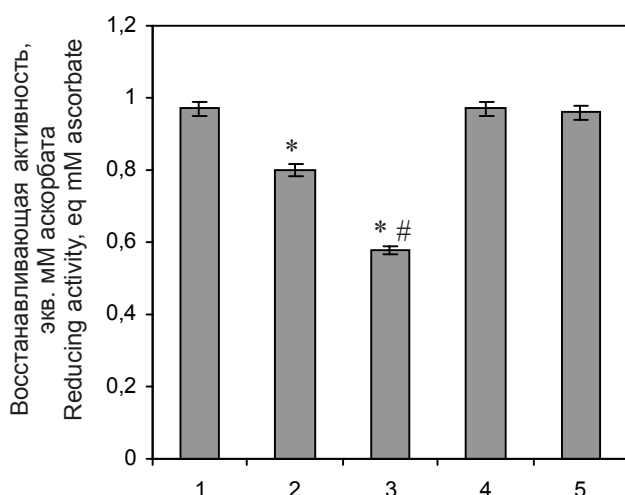
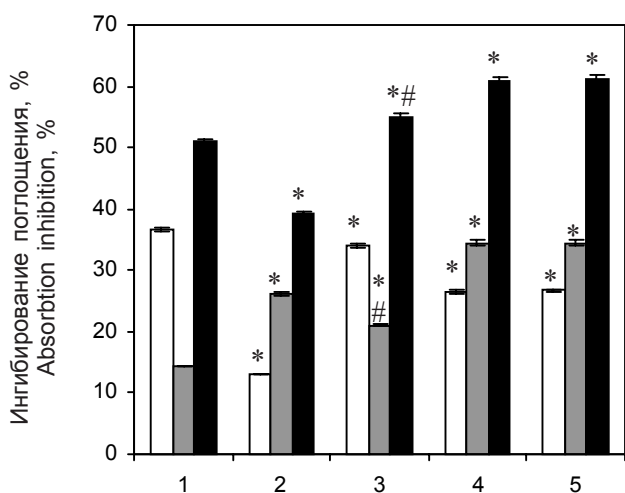


Рис. 7. Железовосстанавливающая способность ЭПЧ: 1 – свежесделанных; 2 – замороженных до -20°C ; 3 – хранившихся при -20°C ; 4 – замороженных до -196°C ; 5 – хранившихся при -196°C ; * – достоверность отличий по сравнению со свежесделанными ЭПЧ, $P < 0,05$; # – достоверность отличий по сравнению с ЭПЧ после замораживания-оттаивания; $P < 0,05$.

Fig. 7. HPE ferric-reducing capability: 1 – fresh extract; 2 – frozen down to -20°C ; 3 – stored at -20°C ; 4 – frozen down to -196°C ; 5 – stored at -196°C ; * – statistical significance of differences as compared to fresh HPE, $P < 0,05$; # – statistical significance of differences as compared to HPE after freeze-thawing *per se*, $P < 0,05$.

ленно восстанавливающих центров аналогично показателям экстрактов собственно после замораживания-оттаивания (рис. 8). Активность быстро восстанавливающих антиоксидантов в ЭПЧ после хранения при -20°C была выше по сравнению со значениями, полученными после замораживания-оттаивания, активность медленно восстанавливающих ABTS^+ снижалась (рис. 8).

Хелатирующая активность ЭПЧ после хранения при -20°C значительно повышалась по сравне-



unchanged, but the storage at -20°C results in an additional reduction of ferric-reducing activity if compared to freeze-thawing *per se* (Fig. 7). Decrease in ferric-reducing activity during storage may be associated to the reduction in HPE of low molecular antioxidant content, uric acid, in particular [14].

The analysis of ABTS^+ radical kinetics reduction demonstrated this activity as completely preserved after low temperature storage. The extract storage at -196°C did not contribute in any additional changes in the activity of rapidly and slowly reducing centers similarly to the extract indices after freeze-thawing (Fig. 8). The activity of rapidly reducing antioxidants in HPE after storage at -20°C was higher, than the values, obtained after freeze-thawing, the activity of slowly reducing ABTS^+ decreased (Fig. 8).

The HPE chelating activity after storage at -20°C significantly increased as compared to their activity, measured right after freeze-thawing. The HPE storage at -196°C made no additional changes in the value of their chelating activity (Fig. 9).

The investigation of phenolic compound content in HPE revealed no statistically significant changes in their content after low temperature storage both at -20 and -196°C if compared to the HPE after freeze-thawing *per se* (Fig. 10).

The results obtained have shown that low temperature storage of HPE at -196°C caused no additional changes of antioxidant activity as compared to freeze-thawing *per se*.

During storage of HPE at -20°C we observed a change in their capability to reduce ABTS^+ radical and to chelate ferric ions. These changes likely occur as a result of proteolytic enzymes functioning at this temperature, that is confirmed by gel chromatography data about the rise in a relative content of low molecular protein substances after long-term storage or macromolecule dissociation (Fig. 11).

Рис. 8. Влияние различных сроков и температур хранения на активность быстро и медленно восстанавливающих ABTS^+ -радикал центров ЭПЧ: 1 – свежесделанных; 2 – замороженных до -20°C ; 3 – хранившихся при -20°C ; 4 – замороженных до -196°C ; 5 – хранившихся при -196°C ; □ – быстрое восстановление; ■ – медленное восстановление, ■ – общее восстановление; * – достоверность отличий по сравнению со свежесделанными ЭПЧ $P < 0,05$; # – достоверность отличий по сравнению с ЭПЧ после замораживания-оттаивания, $P < 0,05$.

Fig. 8. Effect of different terms and storage temperatures on the activity of rapidly and slowly reducing ABTS^+ radical HPE centers: 1 – fresh extract; 2 – frozen down to -20°C ; 3 – stored at -20°C ; 4 – frozen down to -196°C ; 5 – stored at -196°C ; □ – rapid reduction, ■ – slow reduction, ■ – total reduction; * – statistical significance of differences as compared to fresh HPE, $P < 0,05$; # – statistical significance of differences as compared to HPE after freeze-thawing *per se*, $P < 0,05$.

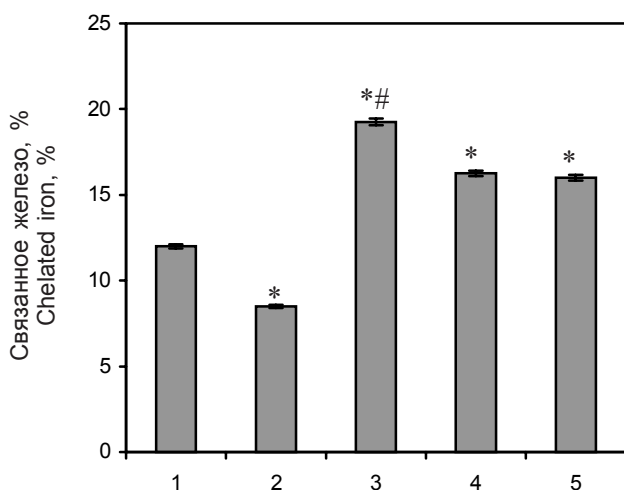


Рис. 9. Хелатирующая активность ЭПЧ: 1 – свежесыводенных; 2 – замороженных до -20°C ; 3 – хранившихся при -20°C ; 4 – замороженных до -196°C ; 5 – хранившихся при -196°C ; * – достоверность отличий по сравнению со свежесыводенными ЭПЧ, $P < 0,05$; # – достоверность отличий по сравнению с ЭПЧ после замораживания-оттаивания, $P < 0,05$.

Fig. 9. HPE chelating activity: 1 – fresh extract; 2 – frozen down to -20°C ; 3 – stored at -20°C ; 4 – frozen down to -196°C ; 5 – stored at -196°C ; * – statistical significance of differences as compared to fresh HPE, $P < 0.05$; # – statistical significance of differences as compared to HPE after freeze-thawing *per se*, $P < 0.05$.

нию с их активностью, измеренной непосредственно после замораживания-оттаивания. Хранение ЭПЧ при -196°C дополнительно не вносило изменений в значение их хелатирующей активности (рис. 9).

Исследование содержания в ЭПЧ фенольных соединений показало, что низкотемпературное хранение как при -20°C , так и при -196°C не приводит к достоверному изменению их содержания по сравнению с ЭПЧ, которые были подвергнуты замораживанию-оттаиванию (рис. 10).

Полученные результаты показали, что низкотемпературное хранение ЭПЧ при -196°C не приводит к дополнительному изменению антиоксидантной активности по сравнению с процессом замораживания-оттаивания.

В процессе хранения ЭПЧ при -20°C наблюдается изменение их способности восстанавливать ABTS^+ -радикал и хелатировать ионы железа. Наиболее вероятно, эти изменения происходят в результате функционирования протеолитических ферментов при этой температуре, что подтверждается данными гель-хроматографии об увеличении относительного содержания низкомолекулярных белков после длительного хранения или диссоциации макромолекул (рис. 11).

Не наблюдалось изменения оптической плотности при 260 нм в низкомолекулярных фракциях,

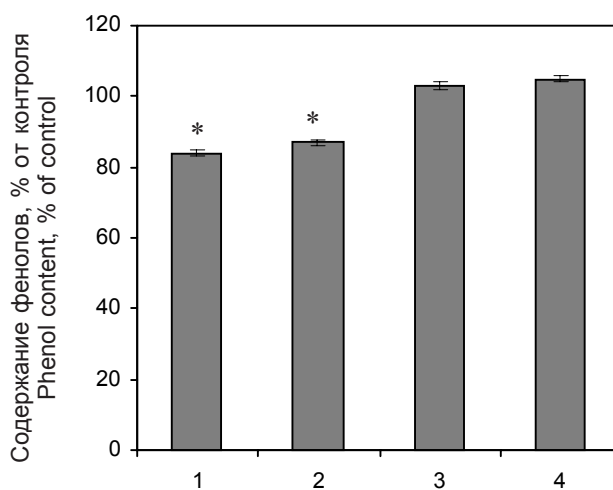


Рис. 10. Содержание фенолов в ЭПЧ: 1 – замороженных до -20°C ; 2 – хранившихся при -20°C ; 3 – замороженных до -196°C ; 4 – хранившихся при -196°C ; контроль – свежесыводенный ЭПЧ; * – достоверность отличий по сравнению со свежесыводенными ЭПЧ, $P < 0,05$.

Fig. 10. Phenol content in HPE: 1 – frozen down to -20°C ; 2 – stored at -20°C ; 3 – frozen down to -196°C ; 4 – stored at -196°C ; control is fresh HPE; * – statistical significance of differences as compared to fresh HPE, $P < 0.05$.

No changes were observed in optical density at 260 nm in low molecular fractions, isolated by gel chromatography method in HPE, stored at -20°C , enabling to suggest that no decay process of low molecular nucleotides occurred at -20°C .

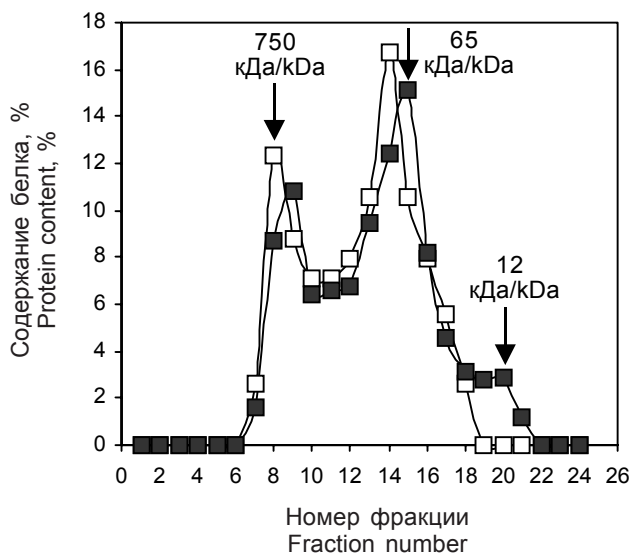


Рис. 11. Гель-хроматограмма ЭПЧ, хранившегося 12 месяцев при -20°C : □ – исходный ЭПЧ; ■ – ЭПЧ, хранившийся 3 суток при -20°C .

Fig. 11. Gel chromatography of HPE, stored for 12 months at -20°C : □ – initial HPE; ■ – HPE, stored for 3 days at -20°C .

полученных методом гель-хроматографии в ЭПЧ, хранившихся при -20°C , что позволяет высказать предположение: при -20°C процесс распада низкомолекулярных нуклеотидов не происходит.

Выводы

Таким образом, изменения антиоксидантной активности ЭПЧ после хранения при -196°C обусловлены только процессами, происходящими при замораживании-оттаивании образцов. В процессе хранения при -20°C наблюдаются дополнительные изменения антиоксидантной активности по сравнению с результатами после замораживания-оттаивания, связанные с протеканием окислительных реакций, приводящих к потере низкомолекулярных антиоксидантов, определяемых методом FRAP. Кроме того, наблюдаются изменения, предположительно являющиеся результатом протекания протеолитических реакций. Тем не менее хранение ЭПЧ как при -196°C , так и при -20°C позволяет сохранить высокую антиоксидантную активность образцов в течение 12 месяцев, в то время как при гипотермическом хранении ее значительное снижение наблюдается после первой недели хранения.

Литература

1. Розанова С.Л., Науменко Е.И., Розанова Е.Д., Нардид О.А. Изменение антиоксидантных свойств экстрактов плаценты человека после замораживания // Проблемы криобиологии. – 2010. – Т. 20, №3. – С. 288–296.
2. 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.
3. 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.
4. Gislefoss R.E., Grimsrud T.K., Morkrid L. Long-term stability of serum components in the Janus Serum Bank // Scand. J. Clin. Lab. Invest. – 2008. – Vol. 68, N3. – P. 402–409.
5. Harris D.A. Spectrophotometric assays // Spectrophotometry & spectrofluorimetry. – Washington: IRL Press, 1987. – P. 49–90.
6. 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.
7. Jordan G.M., Yoshikava 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.
8. Oyaizu M. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine // Jpn. J. Nutr. – 1986. – Vol. 44. – P. 307–315.
9. Phipps S.M., Sharaf M.H.M., Butterweck V. Assessing antioxidant activity in botanicals and other dietary supplements // Pharmacopeial Forum. – 2007. – Vol. 33, N4. – P. 810–814.
10. Re R., Pellegrini N., Proteggente A. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation depolarization assay // Free Radical Biology and Medicine. – 1999. – Vol. 26, N9/10. – P. 1231–1237.

Conclusions

Thus, the changes in HPE antioxidant activity after storage at -196°C are stipulated only by the processes, occurring under samples' freeze-thawing. During storage at -20°C there are observed the additional changes in antioxidant activity as compared to the results after freeze-thawing *per se*, associated with proceeding of oxidative reactions, resulting in a loss of low molecular antioxidants, determined by the FRAP method. In addition, there are noted the changes, presumably resulting from proteolytic reactions proceeding. However, the HPE storage both at -196 and -20°C enabled to preserve a high antioxidant activity in samples after 12 months, meanwhile under hypothermic storage its significant decrease was observed during the 1st week of storage.

References

1. Rozanova S.L., Naumenko E.I., Rozanova E.D., Nardid O.A. Change in antioxidant properties of human placenta extracts after freezing // Problems of Cryobiology. – 2010. – Vol. 20, N3. – P. 289–296.
2. 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.
3. 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.
4. Gislefoss R.E., Grimsrud T.K., Morkrid L. Long-term stability of serum components in the Janus Serum Bank // Scand. J. Clin. Lab. Invest. – 2008. – Vol. 68, N3. – P. 402–409.
5. Harris D.A. Spectrophotometric assays // Spectrophotometry & spectrofluorimetry. – Washington: IRL Press, 1987. – P. 49–90.
6. 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.
7. Jordan G.M., Yoshikava 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.
8. Oyaizu M. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine // Jpn. J. Nutr. – 1986. – Vol. 44. – P. 307–315.
9. Phipps S.M., Sharaf M.H.M., Butterweck V. Assessing antioxidant activity in botanicals and other dietary supplements // Pharmacopeial Forum. – 2007. – Vol. 33, N4. – P. 810–814.
10. Re R., Pellegrini N., Proteggente A. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation depolarization assay // Free Radical Biology and Medicine. – 1999. – Vol. 26, N9/10. – P. 1231–1237.
11. 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.
12. Shibasaki T., Odagiri E., Shizume K., Ling N. Corticotropin-releasing factor like activity in human placental extracts // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 1982, Vol. 55, N2. – P. 384–386.
13. Shinde V., Dhalwal K., Paradkar A.R. et al. Evaluation of in vitro antioxidant activity of human placental extract // Pharmacology online. – 2006. – Vol. 3. – P. 172–179.

11. *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.
12. *Shibasaki T., Odagiri E., Shizume K., Ling N.* Corticotropin-releasing factor like activity in human placental extracts // *J. Clin. Endocrinol. Metab.*— 1982, Vol. 55, N2.— P. 384–386.
13. *Shinde V., Dhalwal K., Paradkar A.R. et al.* Evaluation of in-vitro antioxidant activity of human placental extract // *Pharmacology online.*— 2006.— Vol. 3.— P. 172–179.
14. *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.
15. *Tuckey N.P.L., Forster M.E., Gieseg S.P.* Effects of rested harvesting on muscle metabolite concentrations and K-values in Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) fillets during storage at 15°C // *Journal of Food Science.*— 2010.— Vol. 75, N5.— P. C459–C464.

Accepted 05.07.2011

*Поступила 05.07.2011
Рецензент Н.Г. Землянских*