

Влияние замораживания-оттаивания тканей плаценты на восстановительную активность их экстрактов

С.А. РОЗАНОВА

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Influence of Freeze-Thawing of Placenta Tissues on Reducing Activity of Their Extracts

S.L. ROZANOVA

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

Плацента человека благодаря наличию в ней большого количества биологически активных веществ обладает антиоксидантной активностью, что позволяет применять ее в клинической практике для лечения различных заболеваний. Показано, что экстракты плаценты человека (ЭПЧ) способны подавлять гидроксильные и супероксидные радикалы, снижать концентрацию NO, обладают восстанавливающими свойствами. Существенным ограничением для использования в клинической практике плацентарного материала является короткий срок хранения из-за развивающегося, даже в условиях гипотермии, аутолиза и изменения в связи с этим состава и свойств экстрактов. Для увеличения срока хранения тканей используют низкие температуры. Однако хранение тканей в замороженном состоянии также может приводить к изменению свойств получаемых из них экстрактов: агрегации некоторых белков, изменению их биологической активности.

ЭПЧ получали из тканей плаценты, предварительно помещенных в физиологический раствор или растворы криопротекторов (диметилсульфоксида, глицерина, 1,2-пропандиола), а затем замороженных до -196°C . Отогрев тканей проводили на водяной бане при 20°C . Криопротекторы отмывали физиологическим раствором. Восстановительные свойства ЭПЧ характеризовали по способности ингибировать окраску раствора катион-радикала ABTS (2,2'-азино-бис(3-этилбензтиазолин-6-сульфоновая кислота)) и восстанавливать Fe^{3+} (с использованием метода FRAP).

Изучение ингибирования окраски раствора катион-радикала ABTS позволило охарактеризовать содержание быстро и медленно восстанавливающих антиоксидантов. Восстановительная активность ЭПЧ, измеренная методами ABTS и FRAP, коррелирует с концентрацией белка в экстрактах (коэффициенты корреляции 0,937 и 0,984 соответственно). Коэффициент корреляции между концентрацией белка и активностью медленно восстанавливающих ABTS-радикал антиоксидантов еще выше – 0,986. Исследование отдельных фракций ЭПЧ, полученных методом гель-хроматографии на колонке с сефадексом G 200 показало, что практически все фракции в разной степени обладают восстанавливающей активностью по отношению к ABTS-радикалу. Относительная восстанавливающая активность ЭПЧ из замороженных тканей выше, чем из свежих, что, по-видимому, связано с влиянием на конформацию белков. Наиболее близкие результаты получены для ЭПЧ из свежих и замороженных с глицерином тканей.

Human placenta is known to possess antioxidant activity due to high concentration of bioactive substances. Such property allows its application in order to cure different diseases. It has been shown that human placenta extracts (HPEs) possess reducing power, scavenges hydroxyl and superoxide radicals and lowers NO (nitric oxide) concentration. The main problem for placenta material application in clinical practice is its short shelf life due to autolysis, occurring even under hypothermia and leading to extracts' properties and composition changes. Low temperatures are widely used for tissue preserving. However storage of tissues in frozen state can lead to changes in properties of their extracts such as their biological activity and aggregation of some proteins.

HPEs were obtained from placenta tissues preliminarily plunged into either physiological or cryoprotective solution (DMSO, glycerol, 1,2-propane diol) and frozen down to -196°C . Thawing of tissues was carried out on water bath at 20°C . Cryoprotective agents were washed out with physiological solution. Reducing properties of HPEs were evaluated by ability to inhibit ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)) cation radical solution absorbance and ability to reduce Fe^{+3} (FRAP).

ABTS cation radical solution absorbance inhibition assay permitted to characterize the content of antioxidants responsible for slow and fast reduction. Reducing activity of HPEs evaluated by ABTS depolarization assay and FRAP correlates with protein concentration in extracts (correlation coefficient 0.937 and 0.984, correspondingly). Correlation coefficient between protein concentration and antioxidants responsible for slow reduction is 0.986.

Investigation of separate HPEs fractions obtained using gel-chromatography method has revealed that all the fractions possess ABTS reducing activity in different extent. Relative reducing activity of HPEs obtained from frozen-thawed tissues was higher than from native one. This fact is obviously associated with protein conformational changes. The most close data are obtained for HPEs from native tissues and tissues frozen-thawed with glycerol.