

**ВЛИЯНИЕ ЗАМОРАЖИВАНИЯ ПЛАЦЕНТЫ НА АНТИОКСИДАНТНОЕ
ДЕЙСТВИЕ ЕЕ ЭКСТРАКТОВ ПО ОТНОШЕНИЮ К ЭРИТРОЦИТАМ
ПРИ ОКИСЛИТЕЛЬНОМ СТРЕССЕ**

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

stas.narozhnyi@gmail.com

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

Вступление. В ходе физиологических процессов, в биологических системах генерируются активные формы кислорода (АФК) [2]. С одной стороны некоторые из них играют важную роль в биологических процессах, происходящих в клетке [2,4,8]. С другой стороны они являются сильными окислителями, и повышение их концентрации в клетках может привести к развитию ряда патологических процессов, например, таких как окисление белков и перекисное окисление липидов [4].

Дисбаланс между концентрацией АФК и антиоксидантов может привести к патологическим состояниям, и вызвать различные заболевания [5]. Для лечения таких нарушений используются лекарственные препараты в составе которых присутствуют антиоксиданты, природного или синтетического происхождения.

К таким препаратам относятся и экстракты, полученные из ткани плаценты человека (ЭПЧ). Они могут использоваться при лечении болезней связанных с окислительным стрессом [14]. Это обуславливается тем, что в составе ЭПЧ содержится большое количество биологически активных веществ, благодаря чему экстракты обладают широким спектром терапевтической активности [13]. Основным ограничением для более широкого использования таких препаратов в клинической практике является малый срок их хранения в функционально полноценном состоянии. Перспективным методом сохранения биологически активных препаратов является низкотемпературное консервирование. Ранее было показано наличие антиоксидантных свойств ЭПЧ, а также проведены исследования влияния на эти свойства различных протоколов криоконсервирования и хранения. Кроме того, было показано, что экстракты обладают антиоксидантным действием в отношении эритроцитов в состоянии окислительного стресса, вызванного нитритом натрия, которое сохраняется после низкотемпературного воздействия [12]. Поскольку окислительный стресс, вызванный нитритом натрия, не оказывает значительного действия на мембрану клеток, поэтому несомненный интерес представляет выяснить, обладают ли эти

экстракты антиоксидантным действием в отношении окислителей, действующих преимущественно на мембрану и сохраняется ли это действие в экстрактах из замороженных тканей. Одним из таких окислителей является перекись водорода [4].

Цель работы – изучение антиоксидантного действия экстрактов, полученных из свежей и замороженной плаценты человека, по отношению к эритроцитам в состоянии окислительного стресса, вызванного перекисью водорода.

Объект и методы исследования. В работе была использована плацента человека, полученная у здоровых рожениц с их информированного согласия и хранилась не больше 24 часов при 4°C (свежая плацента). Для изучения влияния замораживания – отогревания, свежая плацента делилась на 3 части, одну из которых замораживали в пластиковом пакете до -196°C (в жидком азоте) с высокой скоростью охлаждения порядка 100° в мин., а вторую замораживали до -20°C с низкой скоростью охлаждения порядка 1° – 3° в мин. Отогревание проводили на водной бане при 37°C.

Для приготовления экстрактов свежеполученную часть плаценты или подвергнутую замораживанию с последующим отогреванием, несколько раз тщательно отмывали от слизи и крови в изотоническом растворе NaCl. После чего ножницами отделяли соединительную ткань, измельчали, добавляли 0,01 М фосфатно-солевой буфер (ФСБ) (pH=7,4) в весовом соотношении 1:1 и гомогенизировали на высокоскоростном гомогенизаторе РТ-1 У4.2, после чего выдерживали при 4°C в течение 12 ч. Гомогенат центрифугировали при 1500g в течение 25 мин. Надосадочную жидкость фильтровали через мембранный фильтр 0,45 мкм (Millipore Corp. Carrigtwohill, Co. Cork, Ирландия). Полученные таким образом фильтрат, представляет собой водно-солевой экстракт плаценты человека.

В работе было исследовано антиоксидантное действие следующих экстрактов плаценты человека: экстрактов, полученных из свежей плаценты (ЭПЧ_{св}) экстрактов, полученных из плаценты подвергнутой процессу замораживания – отогревания до -196°C с высокой скоростью охлаждения (ЭПЧ_{196°C}) и экстрактов, полученных из плаценты подвергнутой процессу замораживания – отогревания до -20°C с низкой скоростью охлаждения (ЭПЧ_{20°C}). В работе использовали только те экстракты, которые не обладают фазой окисления при изучении кине-

тики восстановления ими ABTS⁺ радикала [11], и не обладают гемолитической активностью [9].

Кровь доноров мужчин (A(II) Rh⁺) для проведения исследования, была получена от Областного центра службы крови. Для получения эритроцитов препарат цельной крови отмывали от плазмы, путем центрифугирования при 1500g в течение 5 мин., затем надосадочную жидкость и лейкоцитарный слой удаляли. Далее осадок смешивали с изотоническим раствором NaCl в объемном соотношении 1:5, полученную смесь тщательно перемешивали и центрифугировали при 1500g в течение 5 мин., после чего надосадочную жидкость удаляли. Данную процедуру повторяли 3-4 раза. В результате была получена эритроцитарная масса.

Для проведения исследования эритроцитарная масса разводилась 0,01 М ФСБ в объемном соотношении 1:1.

В качестве модели окислительного стресса была принята модель окислительного стресса эритроцитов вызванного перекисью водорода [15]. Согласно выбранной модели, в качестве маркеров окислительного стресса вызванного перекисью водорода использовали степень гемолиза и осмотическую устойчивость неразрушенных эритроцитов. Для изучения протекторного действия ЭПЧ или их отдельных фракций, к разведенной эритроцитарной массе добавляли равное количество ЭПЧ или их фракций. Смесь инкубировалась в течении 1-го часа при комнатной температуре. Эритроцитарную массу омывали от ЭПЧ, путем однократного центрифугирования (1500g 5 мин.) с ФСБ, в объемном соотношении 1:30. Подготовленная таким образом эритроцитарная масса смешивалась с равным количеством ФСБ, после чего в суспензию добавляли 9 мМ раствор перекиси для получения конечной концентрации перекиси водорода равной 6 мМ. Исследуемые образцы экспонировались с перекисью водорода в течение 20 мин. при комнатной температуре. По истечению времени инкубации образцы отмывали от перекиси водорода путем однократного центрифугирования (1500g 5 мин.) с ФСБ в объемном соотношении 1:30, после чего определяли уровень гемолиза по выходу гемоглобина, регистрируя поглощение на длине волны 540 нм. В качестве контроля была использована эритроцитарная масса не обработанная ЭПЧ, у которой вызывали окислительный стресс, согласно выбранной модели [15].

Отдельные фракции экстрактов получали методом гель-хроматографии с использованием сефадекса G-100 (Sigma Chemical Company), на колонке 2x21 см: объем отдельных фракций – составлял 3 мл.

Содержание белка в ЭПЧ и отдельных фракциях, полученных методом гель-хроматографии, измеряли спектрофотометрическим методом по поглощению на длине волны 260 и 280 нм [7]. Спектрофотометрические исследования проводили

на спектрофотометре «Pye Unicam SP 8000», Великобритания.

Для оценки антиоксидантной активности ЭПЧ и их фракций был использован спектрофотометрический метод, заключающийся в обесцвечивании ABTS⁺ катионного радикала, описанный Re et al. [10]. ABTS⁺ катионный радикал получали путем реакции между 7 мМ ABTS (2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (Sigma-Aldrich Chemical, Steinheim, Germany) в H₂O и 2,45 мМ персульфатом аммония (Sigma-Aldrich Chemical, St. Louis, MO, USA), хранившимися 12 ч. в темноте при комнатной температуре. Полученный раствор ABTS⁺-радикала (0,1 мл) разводили 3 мл дистиллированной водой. Исследуемые образцы (0,1 мл) добавляли к полученному раствору и регистрировали кинетику обесцвечивания раствора ABTS⁺-радикала.

Для оценки осмотической устойчивости эритроцитов был применен метод в модификации Горшкова и др. [1], согласно которому осмотическая устойчивость характеризовалась уровнем гемолиза после экспозиции клеток в 0,45% NaCl в течение 30 мин.

Статистическую обработку полученных результатов проводили при помощи статистического пакета программ Statgrap Hics Plus version 2.1 for Windows (Manugistic, Rockville, MD, USA). Данные на рисунках приведены как среднее значение ± стандартная ошибка. Значимость различия результатов в свежесыведенных ЭПЧ и подвергнутых процессу замораживания – отогревания оценивали на основании парного t-теста. Уровень статистической значимости p < 0,05.

Результаты исследования и их обсуждение.

Результаты исследования антиоксидантного действия ЭПЧ по отношению к эритроцитам находящимся в состоянии окислительного стресса показали, что предварительное инкубирование клеток в среде содержащей ЭПЧ_{об} снижает уровень гемоли-

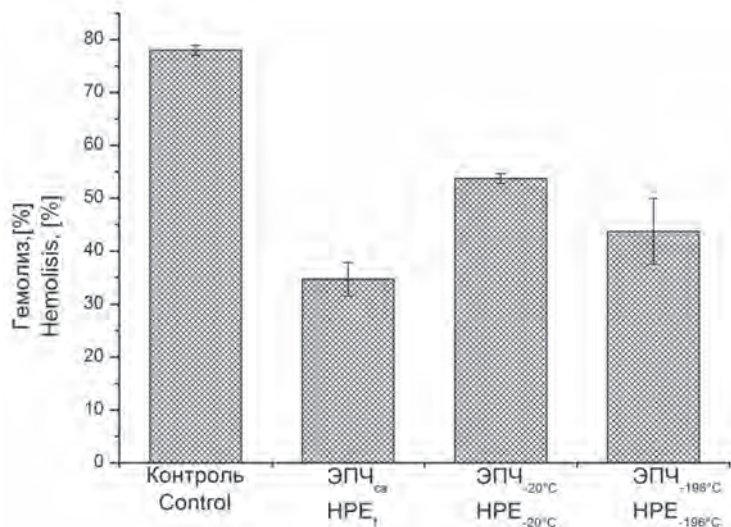


Рис. 1. Антиоксидантное действие ЭПЧ по отношению к эритроцитам находящимся в состоянии окислительного стресса вызванного перекисью водорода.

за, вызванного действием перекиси водорода (рис. 1). В то же время ЭПЧ_{-196°C} и ЭПЧ_{-20°C} также проявляют антиоксидантное действие, но при этом наблюдается снижение эффективности по сравнению с ЭПЧ_{св} более выраженной у ЭПЧ_{20°C}.

Изучение осмотической устойчивости эритроцитов, сохранившихся после воздействия перекиси водорода показало, что она значительно выше у клеток, которые предварительно инкубировали в среде, содержащей экстракты (рис. 2). Причем наибольшей осмотической устойчивостью обладали эритроциты которые предварительно инкубировали в среде содержащей ЭПЧ_{-20°C}, но при этом и количество сохранившихся в этом случае клеток было наименьшим.

Исследования, направленные на изучения антиоксидантного действия фракций полученных из ЭПЧ показали, что протекторным действием обладают фракции которые содержат в своем составе вещества с молекулярной массой порядка 6 – 18 кДа (рис. 3). Максимальный антиоксидантный эффект проявляется после инкубирования с фракциями в которых

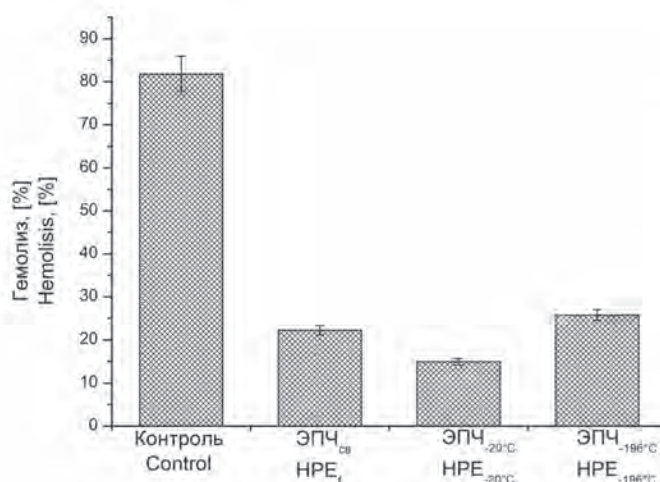


Рис. 2. Осмотическая устойчивость эритроцитов после их экспонирования с экстрактами и воздействия на них перекиси водорода.

данное действие по отношению к эритроцитам находящимся в состоянии окислительного стресса, но при этом наблюдается снижение эффективности по сравнению с фракциями полученными из ЭПЧ_{св}.

Известно, что устойчивость мембран эритроцитов к действию перекиси водорода повышают белки и пептиды в составе которых находится большое количество свободных SH-групп [3]. Оценить содержание свободных SH-групп можно по способности восстанавливать ABTS⁺-радикала за первые 10 с. – антирадикальная активность быстро восстанавливающихся центров (быстрая фаза восстановления ABTS⁺-радикала) [17]. Значения степени восстановления ABTS⁺-радикала за первые 10 с., отнесенные к концентрации белка, показали, что эти значения для фракций с ярко выраженным антиоксидантным действием значительно превышают значения для остальных фракций и цельных экстрактов (табл.). Такой результат получен для всех исследованных экстрактов и их фракций, следует отметить что для ЭПЧ_{-20°C} эти значения несколько ниже, чем для двух других, исследуемых экстрактов, но все равно они достаточно высоки.

Поскольку в эксперименте эритроциты инкубировали с экстрактами до помещения клеток в среду вызывающую окислительный стресс, и экстракты удалялись из суспензии, можно предположить, что либо вещества, входящие в состав экстрактов активируют клеточные механизмы защиты от перекиси водорода, либо присоединяются к мембранам и улучшают их устойчивость к действию окислителя. Существует достаточно много работ, в которых показана способность различных протеинов и пептидов образовывать комплексы на поверхности мембран эритроцитов и в значительной степени изменять их свойства. Поскольку наиболее выраженным протекторным действием обладают фракции с высоким содержанием SH-групп, о

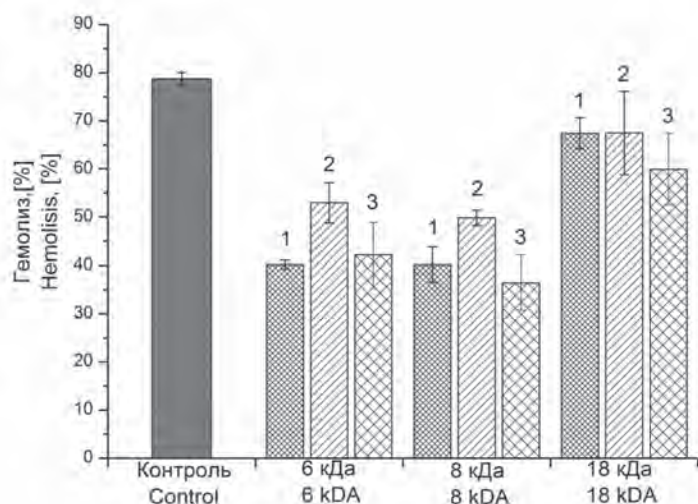


Рис. 3. Антиоксидантное действие фракций ЭПЧ по отношению к эритроцитам находящимся в состоянии окислительного стресса вызванного перекисью водорода: 1 – фракции ЭПЧ_{св}; 2 – фракции ЭПЧ_{-20°C}; 3 – фракции ЭПЧ_{-196°C}.

содержатся вещества с молекулярной массой 6 кДа и 8 кДа. Замораживание до -196°C и последующее отогревание, не отражается на эффективности антиоксидантного действия фракций полученных из ЭПЧ_{-196°C}. Предварительное инкубирование клеток в среде содержащей фракции, в которых содержатся вещества с молекулярными массами порядка 6-18 кДа полученными из ЭПЧ_{-196°C}, оказывает антиоксидантное воздействие сопоставимое с воздействием фракций полученных из ЭПЧ_{св}. В то же время предварительная инкубация клеток в среде содержащей фракции полученные из ЭПЧ_{-20°C} которые в своем составе содержат вещества с таким же значением молекулярной массы, так же оказывает антиокси-

Таблица.

Значения степени восстановления быстрой фазы ABTS⁺-радикала, отнесенные к концентрации белка экстрактов и некоторых фракций

Образец Объекты исследования	ЭПЧ	Фракции				
		150 кДа	60 кДа	15 кДа	8 кДа	4 кДа
ЭПЧ _{св}	0,88±0,07	0,5±0,04	2,4±0,19	24,2±1,94	36,4±2,91	5,3±0,42
ЭПЧ _{-20°C}	0,79±0,06	1,04±0,11	1,6±0,13	20,3±1,62	27,9±2,23	6,2±0,5
ЭПЧ _{-196°C}	0,91±0,07	0,47±0,04	1,7±0,14	28,4±2,27	40,4±3,23	5,3±0,42

чем свидетельствует изучение быстрой фазы восстановления ABTS⁺-радикала и учитывая их значение в защите от окислительного стресса, вызванного перекисью водорода, мы предполагаем наличие в экстрактах белков и пептидов, которые взаимодействуют с мембраной клеток и осуществляют антиоксидантное действие. Причем в экстрактах, полученных из замороженных плацент, они также содержатся. Если в дальнейшем удастся показать, что хранение плаценты при низких температурах не приводит к потере этих соединений, то это может в значительной степени облегчить работу по получению экстрактов и их фракций, обладающих антиоксидантным действием в отношении окислительного стресса.

Выводы. Полученные результаты показали, что водно-солевые экстракты, полученные из плаценты человека, обладают антиоксидантным действием в отношении эритроцитов, находящихся в состоянии окислительного стресса, вызванного перекисью водорода. Предварительное инкубирование клеток с экстрактами и некоторыми из их фракций, полученных методом гель-хроматографии, повышают осмотическую устойчивость клеток и значительно снижают уровень гемолиза, вызванного действием перекиси водорода на мембраны. Экстракты, полученные из плацент, замороженных до -196°C

с высокой скоростью, так же как и экстракты полученные из плацент, замороженных до -20°C с медленной скоростью охлаждения сохраняют свое антиоксидантное действие. Наиболее вероятно, что антиоксидантное действие экстрактов обусловлено взаимодействием белков и пептидов с мембраной эритроцитов [3,16]. Результаты изучения кинетики восстановления ABTS⁺-радикала экстрактами и их отдельными фракциями позволяют предположить, что они в своем составе содержат значительное количество SH-групп, которые, предотвращают окисление липидов в мембране эритроцитов.

Перспективы дальнейших исследований. Дальнейшие исследования предполагают изучение хранения замороженных тканей при низких температурах, и его влияние на антиоксидантное действие экстрактов полученной из этой ткани по отношению к эритроцитам находящимся в состоянии окислительного стресса.

Литература

1. Patent 2328741 RU, MPK G01N 33/49 (2006.01) Sposob opredeleniya osmoticheskoy rezistentnosti eritrotsitov / Gorshkova M.A., Miller D.A., Egorova E.N., Fedotova T.A.; zayavitel Gosudarstvennoe obrazovatelnoe uchrezhdenie vyisshego professionalnogo obrazovaniya «Tverskaya gosudarstvennaya meditsinskaya akademiya Federalnogo agentstva po zdorvoohraneniyu i sotsialnomu razvitiyu». – № 2007116258/15; zayavl. 28.04.2007; opubl. 10.07.2008, Byul. № 19, 2008 g.
2. Brown D.I. Regulation of signal transduction by reactive oxygen species in the cardiovascular system / D.I. Brown, K.K. Griendling // Circulation Research. – 2015. – Vol. 116. – P. 531-549.
3. Cha M. Interaction of human thiol-specific antioxidant protein with erythrocyte plasma membrane / M. Cha, C. Yun, I. Kim // Biochemistry. – 2000. – Vol. 33. – P. 6944-6950.
4. Zimen M.Y.B. Free radical metabolism in human erythrocytes / M.Y.B. Zimen // Clinica Chimica Acta. – 2008. – Vol. 390. – P. 1-11.
5. Fibach E. The role of oxidative stress in hemolytic anemia / E. Fibach, E. Rachmilewitz // Current Molecular Medicine. – 2008. – Vol. 8, № 7. – P. 609-619.
6. Harel S. Iron release from metmyoglobin, methaemoglobin and cytochrom c by a system generating hydrogen peroxide / S. Harel, M.A. Salan, J. Kanner // Free Rad. Res. Commun. – 1988. – Vol. 5. – P. 11-19.
7. Harris D.A. Spectrophotometric assays / D.A. Harris. – Spectrophotometry & spectrofluorimetry. – Washington: IRL Press, 1987. – P. 49-90.
8. Noori S. An overview of oxidative stress and antioxidant defensive system / S. Noori // Open Access Scientific Reports. – 2012. – Vol. 1, № 8. – P. 1-9.
9. Pogozhikh D.N. Change of properties of human placenta aqueous-saline extracts during low temperature storage / D.N. Pogozhikh, E.D. Rozanova, O.A. Nardid // Problems of Cryobiology. – 2008. – Vol. 18, № 1. – P. 22-26.
10. Re R. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation depolarization assay / R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala [et al.] // Free Radical Biology and Medicine. – 1999. – Vol. 26, № 9/10. – P. 1231-1237.
11. Rozanova S. Antioxidant properties of extracts derived from placenta of different gestation terms / S. Rozanova // Oxidants and Antioxidants in Medical Science. – 2014. – Vol. 3, № 3. – P. 181-186.
12. Rozanova S. Protective effect of placenta extracts against nitrite-induced oxidative stress in human erythrocytes / S. Rozanova, Y. Cherkashina, S. Repina, K. Rozanova [et al.] // Cellular & Molecular biology letters. – 2012. – Vol. 17, № 2. – P. 240-248.
13. Shibasaki T. Corticotropin-releasing factor like activity in human placental extracts / T. Shibasaki, E. Odagiri, K. Shizume, N. Ling // J. Clin. Endocrinol. Metab. – 1982. – Vol. 55, № 2. – P. 384-386.

14. Shinde V. Evaluation of in-vitro antioxidant activity of human placental extract / V. Shinde, K. Dhalwal, A.R. Paradkar, K.R. Mahadik [et al.] // Pharmacologyonline. – 2006. – Vol. 3. – P. 172-179.
15. Shiva Shankar Reddy C.S. In vitro models of oxidative stress in rat erythrocytes: Effect of antioxidant supplements/ C.S. Shiva Shankar Reddy, M.V.V. Subramanyam, R. Vani, S. Asha Devi // Toxicology in Vitro. – 2007. – Vol. 21. – P. 1355-1364.
16. Sun S. Specificity and mechanism of action of alpha-helical membrane-active peptides interacting with model and biological membranes by single-molecule force spectroscopy / S. Sun, G. Zhao, Y. Huang, M. Cai [et al.] // Sci Rep. – 2016. – P. 1-10.
17. Walker R.B. Comparative reaction rates of various antioxidants with abts radical cation / R.B. Walker, J.D. Everette // J. Agric. Food Chem. – 2009. – Vol. 57. – P. 1156-1161.

ВПЛИВ ЗАМОРОЖУВАННЯ ПЛАЦЕНТИ НА АНТИОКСИДАНТНУ ДІЮ ЇЇ ЕКСТРАКТІВ ПОВІДНОШЕННЮ ДО ЕРИТРОЦИТІВ ПРИ ОКИСНОМУ СТРЕСІ

Нарожний С. В., Нардід О. А., Розанова К. Д., Покришко С. В.

Резюме. У роботі досліджували антиоксидантну дію екстрактів, отриманих зі свіжої та замороженої плаценти людини, по відношенню до еритроцитів в стані окисного стресу, викликаного перекисом водню. У роботі було показано, що екстракти отримані зі свіжої плаценти мають антиоксидантну дію, яка зберігається після заморожування.

Ключові слова: екстракти плаценти людини, окисний стрес, перекис водню, антиоксиданти.

ВЛИЯНИЕ ЗАМОРАЖИВАНИЯ ПЛАЦЕНТЫ НА АНТИОКСИДАНТНОЕ ДЕЙСТВИЕ ЕЕ ЭКСТРАКТОВ ПО ОТНОШЕНИЮ К ЭРИТРОЦИТАМ ПРИ ОКИСЛИТЕЛЬНОМ СТРЕССЕ

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

Резюме. В работе исследовали антиоксидантное действие экстрактов, полученных из свежей и замороженной плаценты человека по отношению к эритроцитам в состоянии окислительного стресса, вызванного перекисью водорода. В работе было показано, что экстракты полученные из свежей плаценты обладают антиоксидантным действием, которое сохраняется после замораживания.

Ключевые слова: экстракты плаценты человека, окислительный стресс, перекись водорода, антиоксиданты.

EFFECT OF PLACENTA FREEZING ON ANTIOXIDANT ACTIVITY OF ITS EXTRACTS AGAINST ERYTHROCYTES IN OXIDATIVE STRESS

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

Abstract. Antioxidant effect of extracts obtained from fresh and frozen-thawed human placenta against erythrocytes in oxidative stress caused by hydrogen peroxide was investigated in the study. It was determined, that extracts obtained from fresh placenta had antioxidant properties preserved after freezing.

Objects of study. Human placenta obtained from healthy parturients with their informed consent, stored for no more than 24 hours at 4°C, was used in research. Water-salt extracts of human placenta were obtained by tissue homogenization and their further exposing to phosphate-buffered saline (pH 7.4). Gel chromatography was used for fraction obtaining. The erythrocyte mass obtained from the blood of male donors (A (II) Rh +) was used for oxidative stress modelling.

Methods of research. Evaluation of the antioxidant activity of human placenta extracts and fractions was performed applying spectrophotometric method with discoloration of ABTS + cation radical. Protein concentration was recorded spectrophotometrically, by absorption at wavelength of 260 nm and 280 nm.

The antioxidant effect of extracts and their fractions was investigated on the model of erythrocytes oxidative stress caused by hydrogen peroxide. Osmotic stability was evaluated by modified method of Gorshkov et al.

Results and discussion. It has been determined, that preincubation of cells with extracts and some of their fractions increased the osmotic resistance of erythrocytes and reduced the level of hemolysis caused by the action of hydrogen peroxide on their membrane. Moreover, extracts obtained from placenta frozen to -196°C with high speed, as well as extracts obtained from placenta, frozen to -20°C with slow cooling rate retain their antioxidant effect. Most probably, the antioxidant effect of extracts is caused by the interaction of proteins and peptides with erythrocyte membrane. The research data regarding kinetics of ABTS + radical restoration by extracts and their individual fractions suggest, that their composition contains a significant amount of SH-groups, which prevent lipid oxidation in erythrocyte membrane.

Keywords: human placental extracts, oxidative stress, hydrogen peroxide, antioxidants.

Рецензент – проф. Непорада К. С.

Стаття надійшла 15.10.2017 року