

# Влияние быстрого и медленного замораживания на антиоксидантные свойства экстрактов плаценты

С.Л. РОЗАНОВА, О.А. НАРДИД

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

## Influence of Rapid and Slow Freezing on Antioxidant Properties of Human Placenta Extract

S.L. ROZANOVA, O.A. NARDID

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

Известно, что экстракты плаценты человека (ЭПЧ) благодаря наличию в них биологически активных веществ обладают различной терапевтической активностью. Считается, что данная активность связана с их антиоксидантными свойствами.

Для увеличения срока хранения препаратов в клинической практике используют низкие температуры. Однако влияние криоконсервирования на гетерогенные макромолекулярные соединения, обладающие антиоксидантной активностью, в частности ЭПЧ, изучено недостаточно.

Таким образом, целью данной работы было изучить влияние замораживания-оттаивания на антиоксидантные свойства экстрактов плаценты человека.

Водно-солевые экстракты плаценты получали из гомогената ткани, освобожденной от соединительной ткани. Экстракты замораживали до  $-20$  и  $-196^{\circ}\text{C}$  со скоростями 1–2 и 300 град./мин соответственно. Отогрев осуществляли на водяной бане при  $20^{\circ}\text{C}$ . Свежевыделенные и подвергнутые замораживанию-оттаиванию экстракты разделяли методом гель-хроматографии на колонке с сефадексом G-200. Антиоксидантную активность (АОА) ЭПЧ оценивали по способности восстанавливать  $\text{ABTS}^{\cdot-}$ -радикал, а также хелатировать ионы железа.

Кинетика восстановления  $\text{ABTS}^{\cdot+}$  имеет две фазы: быструю (за 10 с) и медленную (за следующие 390 с). Первая обусловлена низкомолекулярными антиоксидантами, вторая – молекулами различных молекулярных масс. Медленное замораживание до  $-20^{\circ}\text{C}$  приводит к снижению АОА ЭПЧ, что обусловлено снижением активности антиоксидантов, ответственных за быструю фазу, в то время как увеличение активности после быстрого замораживания до  $-196^{\circ}\text{C}$  – увеличением активности медленно восстанавливающих антиоксидантов. Исследование отдельных фракций ЭПЧ показало, что практически все фракции обладают АОА и имеют как быстро, так и медленно восстанавливающие центры. Показано, что замораживание-оттаивание ЭПЧ приводит к увеличению АОА полученных из них фракций с различными молекулярными массами, начиная с 700 кДа. Снижение активности ЭПЧ главным образом происходит из-за ее уменьшения в низкомолекулярных фракциях (менее 5 кДа).

Показано, что хелатирующая активность ЭПЧ снижается после медленного замораживания и увеличивается после быстрого. Полученные результаты позволяют предположить, что быстрое замораживание ЭПЧ приводит к увеличению их АОА за счет конформационных изменений белковых молекул с различными молекулярными массами.

Human placenta extract (HPE) appears to possess different therapeutical activity due to high concentration of bioactive substances. Such an activity of HPE is believed to be related to its antioxidant properties.

Low temperatures are widely used in clinical practice in order to increase preparation shelf life. However, influence of cryopreservation on heterogeneous macromolecule composition which is known to possess antioxidant activity, in particular, on human placenta extract, has been investigated insufficiently.

Thus the aim of the present study was to investigate the influence of freeze-thawing on human placenta extract antioxidant properties.

Aqueous-saline HPEs were obtained from homogenate of placenta tissues separated from conjunctive tissue. The extracts were frozen down to  $-20$  and to  $-196^{\circ}\text{C}$  with 1–2 and 300 deg/min rates, correspondingly. Extracts were thawed on the water bath at  $20^{\circ}\text{C}$ . Fresh and frozen-thawed extracts were separated by the gel-chromatography method using the column with Sephadex G-200. Antioxidant activity of HPEs was estimated by ability to reduce  $\text{ABTS}^{\cdot+}$  cation radical and by ferrous ions ( $\text{Fe}^{2+}$ ) chelating ability.

$\text{ABTS}^{\cdot+}$  radical reduction kinetics has two phases: fast (up to 10 sec) and slow (up to 390 sec). First phase is provided by low molecular weight antioxidants, the second one is due to molecules of different molecular weight. Slow freezing down to  $-20^{\circ}\text{C}$  leads to lowering of extract anti-radical activity and it is due to decreasing of antioxidants activity responsible for the rapid phase, whereas increasing of this activity due to antioxidants responsible for slow phase has been revealed after rapid freezing down to  $-196^{\circ}\text{C}$ . Decolorization assay of separate HPE fractions has shown that almost all the fractions possess antioxidant activity and contain both rapid and slow-reducing centers. Freeze-thawing of HPEs has been shown to lead to increasing the antiradical activity in several fractions with different molecular weights starting with 700 kDa. Lowering of HPE antiradical activity occurs mainly due to its decreasing in low-molecular fractions (less than 5 kDa).

It has been demonstrated that chelating ability of HPE reduces after freezing down to  $-20^{\circ}\text{C}$  while it increases after rapid freezing down to  $-196^{\circ}\text{C}$ . Obtained results allow to assume that rapid freezing of HPE leads to the increasing of antioxidant activity due to conformational changes of protein molecules with different molecular weights.