

УДК 57.043:577.1:615.36.014.41:618.46.

С.В. Нарожний*, К.Д. Розанова, О.М. Боброва, О.А. Нардід

Антиоксидантна та антирадикальна дія екстрактів із кріоконсервованої плаценти людини

UDC 57.043:577.1:615.36.014.41:618.46.

S.V. Narozhnyi*, K.D. Rozanova, O.M. Bobrova, O.A. Nardid Antioxidant and Antiradical Effects of Extracts Derived From Cryopreserved Human Placenta

Реферат: У роботі представлено дані вивчення впливу низькотемпературного зберігання плаценти людини на антиоксидантну дію її водно-солевих екстрактів по відношенню до еритроцитів у стані окисного стресу, викликаного нітритом натрію. Захисну дію екстрактів визначали у двох серіях експериментів: в умовах одночасної експозиції еритроцитів із екстрактами і нітритом та експозиції еритроцитів із нітритом натрію, які були попередньо експоновані з екстрактами. Рівень окисного стресу оцінювали за концентрацією метгемоглобіну у еритроцитах, антирадикальну активність – за здатністю екстрактів відновлювати ABTS⁺-радикал. Виявлено, що захисну дію по відношенню до еритроцитів у стані окисного стресу екстракти плаценти проявляють тільки після попередньої експозиції з ними. Показано, що водно-солеві екстракти зберігають захисну дію по відношенню до еритроцитів у стані окисного стресу за умов зберігання плаценти впродовж 3-х місяців (–20°C) і 6 місяців (–80°C). Встановлено, що екстракти, отримані з плаценти, яка зберігалася впродовж 6 місяців за температури –20°C, втрачають антиоксидантну дію, при цьому їх антирадикальна активність знижується на 50% по відношенню до свіжотриманих екстрактів. Найбільш активна фракція водно-солевих екстрактів з м. м. 10–12 кДа зберігає свою антиоксидантну дію після зберігання плаценти впродовж 3 (–20°C) і 6 (–80°C) місяців.

Ключові слова: кріоконсервування, екстракт плаценти людини, антиоксидантна дія, антирадикальна активність, окисний стрес, нітрит натрію.

Реферат: В работе представлены данные изучения влияния низкотемпературного хранения плаценты человека на антиоксидантное действие ее водно-солевых экстрактов по отношению к эритроцитам в состоянии окислительного стресса, вызванного нитритом натрия. Защитное действие экстрактов определяли в двух сериях экспериментов: в условиях одновременной экспозиции эритроцитов с экстрактами и нитритом, а также экспозиции эритроцитов с нитритом натрия, которые были предварительно экспонированы с экстрактами. Уровень окислительного стресса оценивали по концентрации метгемоглобина в эритроцитах, антирадикальную активность – по способности экстрактов восстанавливать ABTS⁺-радикал. Выявлено, что защитное действие по отношению к эритроцитам в состоянии окислительного стресса экстракты плаценты проявляют только после предварительной экспозиции с ними. Показано, что водно-солевые экстракты сохраняют защитное действие по отношению к эритроцитам в состоянии окислительного стресса при условии хранения плаценты в течение 3 (–20°C) и 6 месяцев (–80°C). Установлено, что экстракты, полученные из плаценты, которая сохранялась в течение 6 месяцев при температуре –20°C, утрачивают антиоксидантное действие, при этом их антирадикальная активность снижается на 50% по отношению к свежеполученным экстрактам. Наиболее активная фракция водно-солевых экстрактов с м. м. 10–12 кДа сохраняет свое антиоксидантное действие после хранения плаценты в течение 3 (–20°C) и 6 (–80°C) месяцев.

Ключевые слова: кріоконсервирование, экстракт плаценты человека, антиоксидантное действие, антирадикальная активность, окислительный стресс, нитрит натрия.

Abstract: This study represents the data concerning placenta low temperature storage impact on antioxidant action of its aqueous-saline extracts towards erythrocytes under sodium nitrite-induced oxidative stress. The research protocol included two parts. The first one comprised a simultaneous exposure of erythrocytes to the extracts and nitrite, the second one referred to the nitrite addition to the erythrocytes, pre-treated with the extracts. Oxidative stress level was assessed by erythrocytes methemoglobin content, an antiradical activity was evaluated by the extracts ability to reduce ABTS⁺ radical. It has been noted that protective effect toward erythrocytes in oxidative stress state the placental extracts reveal only after pre-exposure to them. Aqueous-saline extracts keep their protective ability toward erythrocytes under oxidative stress up to three and up to six months for the placenta stored at –20°C and –80°C, correspondingly. Placenta storage at –20°C for 6 months led to the lowering of protective effect, as well as antiradical activity down to 50% comparing to fresh extracts. The 10–12 kDa fraction of aqueous-saline extracts showed the highest protective effect, not changing up to three and up to six months for the placenta, stored –20°C and –80°C, respectively.

Key words: cryopreservation, human placenta extract, antioxidant action, antiradical activity, oxidative stress, sodium nitrite.

Відділ кріобіофізики, Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

Department of Cryobiophysics, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:

вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61016;
тел.: (+38 057) 373-74-35, факс: (+38 057) 373-59-52
електронна пошта: stas.narozhnyi@gmail.com

*To whom correspondence should be addressed:

23, Pereyaslavka str., Kharkiv, Ukraine 61016;
tel.: +380 57 373 7435, fax: +380 57 373 5952
e-mail: stas.narozhnyi@gmail.com

Надійшла 03.04.2018

Прийнята до друку 13.11.2018

Received April, 03, 2018

Accepted November, 13, 2018

© 2018 S.V. Narozhnyi et al. Published by the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

В останні роки вчені відмічають провідну роль окисного стресу у виникненні різних патологій. Висловлено припущення, що одна з основних причин розвитку патологічних процесів – дисбаланс між прооксидантною та антиоксидантною системами організму [10, 17, 22]. У цьому зв'язку актуальними задачами медицини є пошук нових джерел антиоксидантів природного походження, а також розробка ефективних методів їх зберігання з метою створення ефективних препаратів для використання у клінічній практиці.

Екстракти з плаценти людини (ЕПЛ) вважаються антиоксидантним препаратом природного походження, активність якого обумовлена комплексом біологічно активних речовин, що входять до його складу [12, 28, 29]. Істотна перешкода для застосування у клінічній практиці фетоплацентарного матеріалу – необхідність його швидкого використання після одержання для збереження функціонально повноцінного стану [1]. У цьому аспекті перспективним методом зберігання плаценти з метою отримання біологічно активних речовин є низькотемпературне консервування [2, 4]. Встановлено, що процеси, які відбуваються під час заморожування-відігріву та зберігання за умов низьких температур, призводять до конформаційних змін макромолекул [27] і накопичення вільних радикалів [31]. Вивченню впливу низькотемпературного зберігання ЕПЛ на їх біологічну активність присвячена значна кількість досліджень [1–5, 21]. Встановлено, що біологічна активність ЕПЛ вища за умов низькотемпературного зберігання плаценти порівняно зі зберіганням безпосередньо екстрактів, особливо при помірно низьких температурах. Зокрема було показано, що зберігання екстрактів при -20°C значно підвищує в них концентрацію продуктів перекисного окиснення ліпідів та рівень гемолітичної активності [21]. При цьому в екстрактах, отриманих із плацент, які зберігалися за -20°C , такі зміни не відбувалися. На сьогодні вкрай мало відомостей щодо впливу низькотемпературного зберігання плаценти на антиоксидантні властивості отриманих із неї екстрактів, але такі дані необхідні для визначення максимальних термінів зберігання плаценти у різних температурних умовах, за яких можливо одержати ЕПЛ із властивостями, максимально наближеними до свіжоотриманих екстрактів.

Еритроцити є відомою моделлю для оцінки інтенсивності окисних процесів. G. Lucantoni та співавт. [18] вказують на оксидативну модифікацію еритроцита як на «цінний біоіндикатор», за яким можливо оцінити ефективність терапії хронічних захворювань. Крім того, автори під-

Nowadays scientists highlight the crucial role of oxidative stress in the emerging of various pathologies. It is suggested that one of the main causes of the development of pathological processes is the imbalance between the prooxidant and antioxidant systems of the body [5, 12, 20]. In this regard, the actual tasks of medicine are the search for new sources of antioxidants of natural origin, as well as the development of effective methods of their storage to create the drugs to be used in clinical practice.

Human placenta derived extract (HPE) is considered as an antioxidant product of natural origin, whose activity is stipulated by a combination of biologically active substances in its composition [7, 28, 29]. A serious shortcoming for the application of this feto-placental material in clinical practice is the need of its rapid using after obtaining to maintain a fully functional state [14]. To solve the problem a low-temperature preservation can be used as a promising method of the placenta storage to obtain biologically active substances [17, 22]. It has been established that the processes occurring during freezing, warming and storage at low temperatures result in conformational changes of macromolecules [27] and the accumulation of free radicals [31]. Numerous studies [14, 17–19, 22, 26] are devoted to the investigation of the effect of low-temperature storage of HPE on its biological activity. It has been found that biological activity of HPE is higher if the placenta tissue was stored at low temperatures unlike the case of storage of ready extracts, the differences are even more significant if moderately low temperatures were used. In particular, the storage of the extract at -20°C was shown to result in a significant increase in the concentration of lipid peroxidation products and hemolytic activity [18]. At the same time, such changes did not occur in the extracts obtained from the placenta stored at -20°C . Now there is only scarce information about the effect of low temperature storage of placenta on the antioxidant properties of the extracts derived from it, but these data are required to determine a maximal storage time of placenta under various temperature conditions, which can be used to obtain HPE with the properties close to the freshly derived extracts.

Erythrocytes are a well-known model system for assessing the intensity of oxidative processes. G. Lucantoni et al. [13] indicated the oxidative modification of erythrocyte as a 'valuable bioindicator' due to which it is possible to estimate the efficiency of therapy for chronic diseases. As well the authors emphasized an importance of the modeling of erythrocytes oxidative stress for experimental *in vitro*



креслюють важливість моделі окисного стресу еритроцитів для експериментальних досліджень *in vitro*, які спрямовані на визначення патогенних механізмів захворювань, пов'язаних із порушеннями окисно-відновного статусу.

На теперішній час активність різних антиоксидантів оцінюють за допомогою різноманітних біологічних моделей, зокрема еритроцитів в умовах окисного стресу, викликаного нітритом натрію. Відомо, що ця сполука здатна швидко проникати через мембрану еритроцитів та окиснювати оксигемоглобін, перетворюючи його на мет-форму. При цьому нітрит не чинить значного окисного впливу на саму мембрану клітини [7].

Антиоксидантна активність забезпечується наявністю амінокислот, вітамінів, сечової кислоти, ферментів і білків, які можуть відновлювати і активувати антиоксидантні властивості біологічних об'єктів, а також підвищувати активність антиоксидантних ферментів. Основну роль в окисному пошкодженні біологічних структур відіграють вільні радикали. Антиоксидантні ферменти захищають від одного певного радикала, неферментативні антиоксиданти – від декількох різних радикалів. Наявність антиоксидантів визначають за антирадикальною активністю, а механізм і ефективність їх дії – за допомогою моделі окисного стресу, зокрема на еритроцитах.

Слід зазначити, що антирадикальна активність не завжди корелює з антиоксидантною дією в умовах окисного стресу [10], тому ці показники доцільно вивчати у поєднанні.

Мета роботи – дослідження впливу низькотемпературного зберігання плаценти на антирадикальну активність та антиоксидантну дію її екстрактів по відношенню до еритроцитів у стані окисного стресу, викликаного нітритом натрію.

Матеріали і методи

У роботі досліджували плаценти ($n = 5$), отримані після фізіологічних пологів за інформованою згодою породіль. Враховуючи той факт, що властивості ЕПЛ залежать від стану плаценти і строків гестації, використовували плаценти 40 тижнів гестації [25, 26].

Плаценту розділяли на фрагменти розміром 5×5 см (маса 60 г). Фрагменти свіжоотриманих плацент заморожували у пластикових пакетах до -20 або -80°C зі швидкістю $1-2$ град/хв. Фрагменти плацент зберігали у морозильних камерах 3 або 6 місяців, відігрівали 30 хв на водяній бані за температури 37°C .

Екстракти плаценти людини одержували методом, описаним С. Л. Розановою та співавт. [5]. Для цього фрагменти плаценти відмивали від

studies aimed at identifying the pathogenic mechanisms of diseases associated with disorders in oxidative-reducing status.

At present, the activity of various antioxidants is evaluated using a variety of biological models, in particular erythrocytes with the sodium nitrite-caused oxidative stress. This compound is known as capable of rapidly penetrating through the erythrocyte membrane and oxidizing oxyhemoglobin, transforming it into a met-form. In this case, nitrite does not strongly affect the cell membrane [2].

Antioxidant activity is ensured by the presence of amino acids, vitamins, uric acid, enzymes and proteins that can restore and activate the antioxidant properties of biological objects, as well as increase an activity of antioxidant enzymes. Free radicals play a major role in oxidative damage to biological structures. Antioxidant enzymes protect against specific radicals, and non-enzymatic antioxidants do against several different radicals. The presence of antioxidants is determined by antiradical activity, and their mechanism and effectiveness of action may be studied in a model of oxidative stress, in particular in erythrocytes.

It should be noted that antiradical activity does not always correlate with antioxidant activity under conditions of oxidative stress [5], therefore these indices should be studied in a combination.

The purpose of the work was to investigate the effect of low-temperature storage of placenta on antiradical activity and antioxidant effect of its extracts on erythrocytes in an oxidative stress caused by sodium nitrite.

Materials and methods

This research was performed with the placentas ($n = 5$), obtained after physiological labors with an informed consent of puerperants. Taking into account the fact that the properties of HPE depend on the condition of placenta and the gestation terms, the 40 weeks gestational placenta [24, 25] was used.

The placenta was cut into the 5×5 cm fragments (weighing 60 g). Fragments of the fresh placenta were frozen in plastic bags either down to -20 or -80°C at a rate of $1-2$ deg/min. The placenta fragments were stored in freezers for 3 or 6 months, warmed for 30 min in a water bath at 37°C .

Human placenta extracts were obtained as described by S. L. Rozanova et al. [26]. With this aim the placental fragments were washed free of blood with an isotonic solution of NaCl (150 mM). The placenta was separated from amniotic membranes and connective tissues of cotyledons. The tissue was disintegrated with RT-1 U4.2 homogenizer (Odessa Experimental Plant of Laboratory Medical Techno-



крові ізотонічним розчином NaCl (150 мМ). Від плаценти відокремлювали амніотичні оболонки й сполучнотканинні ділянки котиледонів. Тканину подрібнювали в гомогенізаторі РТ-1 У4.2 («Одеський експериментальний завод лабораторної медичної техніки», Україна). До гомогенату плаценти додавали рівний об'єм фосфатно-сольового буфера (ФСБ) («Medicago Uppsala», Швеція), перемішували і залишали для екстрагування на 12 годин при 4°C. Після цього гомогенат центрифугували 15 хв при 3 000g. Надосадову рідину збирали і фільтрували. Отриманий фільтрат – водно-сольовий екстракт плаценти людини. У роботі не використовували ЕПЛ, в яких виявляли значну дію окисників, накопичених у тканині плаценти [20]. Ознакою цього була наявність «фази окиснення» під час вивчення кінетики відновлення АВТС⁺-радикала [26]. З роботи також виключали ЕПЛ, які проявляли гемолітичну активність [3].

У роботі досліджували фракцію ЕПЛ з м. м. 10–12 кДа, яку отримували методом гелю хроматографії з використанням сефадекса G-100 («Pharmacia Fine Chemicals Uppsala», Швеція) на колонці 27×2 см. На колонку наносили 3 мл ЕПЛ, об'єм окремих фракцій – 3 мл.

Еритроцити отримували з цільної донорської крові чоловіків (II⁺), заготовленої на консерванті «CPDA-1» («Maco Productions Pologne SP. Z.o.o.», Польща) у Харківському обласному центрі служби крові. Для видалення плазми і формених елементів кров центрифугували 5 хв при 1500g. Осад еритроцитів тричі відмивали ФСБ. Потім щільний осад еритроцитів ресуспендували ФСБ (1:1) і змішували з рівним об'ємом ЕПЛ або окремою фракцією ЕПЛ.

Вміст білка в ЕПЛ та фракції ЕПЛ, отриманих методом гелю-хроматографії, вимірювали спектрофотометрично [15].

Окисний стрес моделювали на еритроцитах з використанням нітриту натрію («Sigma-Aldrich», США). Еритроцити інкубували 20 хв у розчині нітриту натрію, який не викликав гемолізу, але частково окиснював гемоглобін (кінцева концентрація нітриту натрію складала 10–12 мМ). Внаслідок дії нітриту натрію відбувається гіперполяризація мембрани, змінюється вміст глутатіону (загального і відновленого) і змішаних білок-глутатіон дисульфідів, що приводить до формування метгемоглобіну [6]. Концентрація метгемоглобіну є основним маркером окисного стресу еритроцитів, викликаного дією нітриту натрію [19]. Відносний вміст метгемоглобіну у зразках визначали спектрофотометричним методом, встановлюючи величину оптичної густини при 500, 569 та 577 нм [32]. Проводили дві серії

logy, Ukraine). Placenta homogenate were mixed with an equal volume of phosphate-buffered saline (PBS) (Medicago Uppsala, Sweden), stirred and left for extraction for 12 hrs at 4°C. Afterwards the homogenate was centrifuged for 15 min at 3000 g. The supernatant was collected and filtered. The resulting filtrate is a water-saline extract of human placenta. In the research we did not use HPE, which showed a significant effect of the oxidants accumulated in the placental tissue [16], that was manifested as the presence of an 'oxidation phase' during investigation of the kinetics of the АВТС⁺ radical reduction [25]. In addition, the HPE, which demonstrated a hemolytic activity, were excluded from the study [19].

We studied the 10–12 kDa m. w. HPE fraction, which was obtained by chromatography using a Sephadex G-100 (Pharmacia Fine Chemicals Uppsala, Sweden) and a column of 27×2 cm. The HPE of 3 ml was applied to a column, volume of separate fractions made 3 ml.

Erythrocytes were obtained from the whole male donor blood (II⁺) procured with the CPDA-1 preservative (Maco Productions Pologne SP. Z.o.o., Poland) at the Kharkiv Regional Blood Services Center. To remove plasma and blood cells, blood was centrifuged for 5 min at 1500g. The erythrocyte sediment was three times washed with PBS. Then, a dense red blood cell suspension was re-suspended with PBS (1:1) and mixed with equal HPE volume or its individual fraction.

The protein content in HPE and its individual fraction obtained by gel chromatography was measured spectrophotometrically [10].

Oxidative stress was modeled in erythrocytes using sodium nitrite (Sigma-Aldrich, USA). Erythrocytes were incubated for 20 min in a sodium nitrite solution, which did not lead to hemolysis, but partially oxidized hemoglobin (the final concentration of sodium nitrite was 10–12 мМ). Due to the action of sodium nitrite a hyperpolarization of the membrane occurred, as well as changes in the content of glutathione (total and reduced) and mixed protein-glutathione disulfides appeared, that led to the formation of methemoglobin [1]. Concentration of methemoglobin is the main marker of oxidative stress caused by sodium nitrite in erythrocytes [15]. The relative content of methemoglobin in the samples was spectrophotometrically determined with assessing the optical density at 500, 569 and 577 nm [32].

There were performed two series of experiments. In the first series, the erythrocytes were incubated for 20 min jointly with sodium nitrite and HPE or its fraction, then they were washed, hemolyzed



експериментів. У першій серії еритроцити інкубували протягом 20 хв одночасно з нітритом натрію та ЕПЛ або фракцією ЕПЛ, після відмивали, гемолізували і визначали вміст метгемоглобіну. У другій серії клітини попередньо витримували годину з ЕПЛ або фракцією ЕПЛ, потім відмивали в ФСБ і піддавали 20-хвилинній експозиції з нітритом натрію в ФСБ. Далі клітини відмивали, гемолізували і визначали вміст метгемоглобіну. Контролем були еритроцити в ФСБ із нітритом натрію. Вміст метгемоглобіну в контрольних еритроцитах складав $(45 \pm 8)\%$.

Антирадикальну активність ЕПЛ та його фракції оцінювали спектрофотометрично за знебарвленням $ABTS^+$ -радикала методом, описаним R. Re та співавт. [24]. $ABTS^+$ -радикал отримували шляхом реакції між 7 мМ водним розчином $ABTS$ (2,2'-азинобіс-(3-етилбензотіазолін-6-сульфонової кислоти) діамонієва сіль) («Sigma», США) та 2,45 мМ персульфатом амонію («Sigma Aldrich») після їх 12-годинної витримки у темряві за кімнатної температури. Перед застосуванням концентрований розчин $ABTS^+$ -радикала розводили дистильованою водою до отримання поглинання $0,700 \pm 0,025$ при 734 нм. Досліджувані зразки (0,1 мл) додавали до отриманого розчину (3 мл) і при довжині хвилі 734 нм реєстрували кінетику знебарвлення розчину $ABTS^+$ -радикала, яка має швидку і повільну фази [16, 24]. Антирадикальну активність ЕПЛ та його фракції обчислювали як зменшення поглинання за 400 с у процентах і відносили до концентрації білка у міліграмах на мілілітр.

Усі спектрофотометричні дослідження здійснювали на спектрофотометрі «Pye Unicam SP 8000» (Велика Британія).

Дані наведено як середнє значення \pm стандартна помилка. Для статистичної обробки експериментальних результатів використовували однофакторний дисперсійний аналіз ($\alpha = 0,05$; $n = 5$), апостеріорні порівняння проводили за критерієм Стьюдента з поправкою Бонферроні.

Результати та обговорення

Результати досліджень показали, що вміст білка в екстрактах, отриманих із плацент, які зберігалися за низьких температур, значуще не змінився (таблиця).

Антиоксидантну дію ЕПЛ по відношенню до еритроцитів вивчали двома способами: одночасна експозиція клітин із екстрактами і нітритом натрію, передекспозиція еритроцитів із ЕПЛ та наступною інкубацією з нітритом натрію. Зниження концент-

and the content of methemoglobin was determined. In the second series, the cells were pretreated for an hour with HPE or its fraction, then washed in PBS and subjected to a 20-min exposure to sodium nitrite in PBS. The cells were then washed, hemolyzed and the content of methemoglobin was examined. The control samples were the red blood cells in the PBS with sodium nitrite. The content of methemoglobin in control erythrocytes was $(45 \pm 8)\%$.

The antiradical activity of HPE and its fraction was evaluated spectrophotometrically by the $ABTS^+$ radical discoloration using the method described by R. Re et al. [23]. The $ABTS^+$ radical was obtained by means of the reaction between 7 mM aqueous solution of $ABTS$ (2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonic acid) diammonium salt (Sigma, USA) and 2.45 mM ammonium persulphate (Sigma Aldrich) after their 12-hour exposure in the dark at room temperature. Prior to application, the concentrated solution of $ABTS^+$ radical was diluted with a distilled water to obtain an absorption of 0.700 ± 0.025 at 734 nm. The test specimens (0.1 ml) were added to the resulting solution (3 ml) and at a wavelength of 734 nm the discoloration kinetics of the $ABTS^+$ radical solution having the fast and slow phase [11, 23] was recorded. The anti-radical activity of HPE and its fraction was calculated from a decrease in absorption for 400 s in percentages and was normalized by the protein concentration in milligrams per milliliter.

All spectrophotometric studies were performed with a Pye Unicam SP 8000 spectrometer (United Kingdom).

Вплив низькотемпературного зберігання на вміст білка в ЕПЛ
Effect of low-temperature storage on protein content in HPE

Зразок Sample	Концентрація білка, мг/мл Protein concentration, mg/ml
ЕПЛ зі свіжоотриманої плаценти HPE from fresh placenta	$32,2 \pm 3,1$
ЕПЛ із плаценти, яка зберігалася протягом 3-х місяців при -20°C HPE from placenta stored for 3 months at -20°C	$36,5 \pm 4,1$
ЕПЛ із плаценти, яка зберігалася протягом 6-ти місяців при -20°C HPE from placenta stored for 6 months at -20°C	$39,6 \pm 5,2$
ЕПЛ із плаценти, які зберігалася протягом 3-х місяців при -80°C HPE from placenta stored for 3 months at -80°C	$33,4 \pm 4,5$
ЕПЛ із плаценти, яка зберігалася протягом 6-ти місяців при -80°C HPE from placenta stored for 6 months at -80°C	$32,8 \pm 3,8$



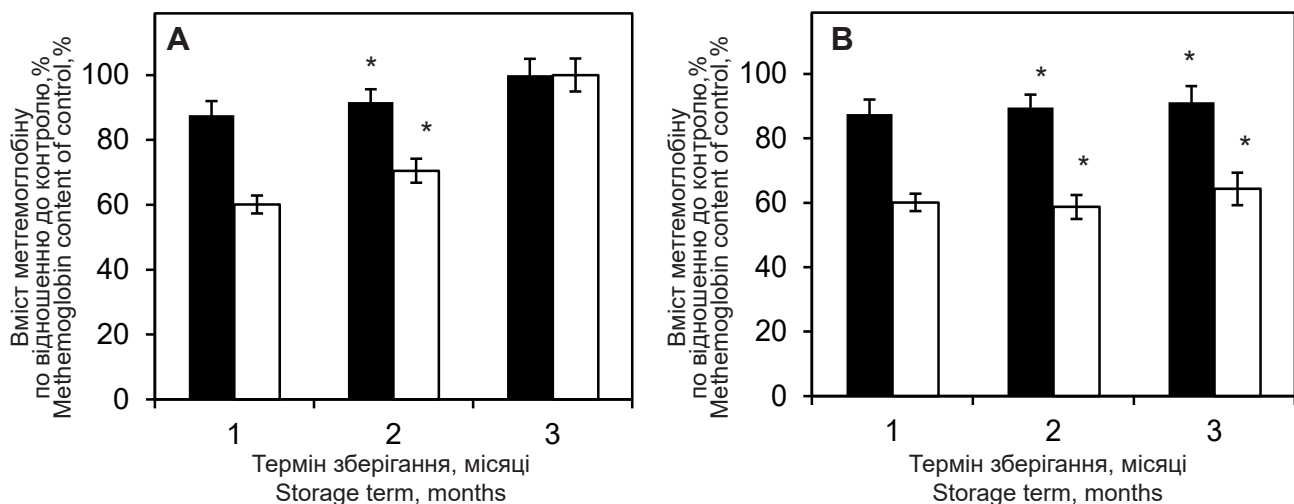


Рис. 1. Вплив ЕПЛ із плацент, які зберігалися при -20°C (А) та -80°C (В), на вміст метгемоглобіну в еритроцитах із нітритом натрію: 1 – свіжоотриманий ЕПЛ ($n = 5$); 2 – ЕПЛ із плаценти, яка зберігалася протягом 3-х місяців ($n = 5$); 3 – ЕПЛ із плаценти, яка зберігалася протягом 6-ти місяців ($n = 5$). ■ – одночасна експозиція з ЕПЛ і нітритом; □ – попередня експозиція з ЕПЛ і нітритом.* – відмінності статистично значущі відносно свіжоотриманих ЕПЛ ($\alpha = 0,05$).

Fig. 1. Influence of HPE derived from placenta stored at -20°C (A) and -80°C (B), on the content of methemoglobin in erythrocytes with sodium nitrite: 1 – HPE from fresh placenta ($n = 5$); 2 – HPE derived from placenta stored for 3 months ($n = 5$); 3 – HPE from the placenta stored for 6 months ($n = 5$). ■ – simultaneous exposure with HPE and nitrite; □ – pre-exposure with HPE and nitrite. * – differences are statistically significant for HPE from fresh placenta ($\alpha = 0.05$).

рації нітриту в середовищі інкубації можливо в результаті взаємодії з антиоксидантами [14], з сульфгідрильними групами білків і відновленого глутатіону [6], чим може бути обумовлена антиоксидантна дія ЕПЛ. При цьому відновлення SH-груп може здійснюватися як за допомогою ферментів, так і антиоксидантних протеїнів [8, 25, 30], які можуть входити до складу ЕПЛ. Слід зазначити, що всі антиоксиданти розділяють на препарати прямої та непрямої дії [23]. Антиоксиданти непрямої дії стимулюють антиоксидантну систему і здатні гальмувати вільнорадикальні процеси, а антиоксиданти прямої дії мають виражені антирадикальні властивості. Тому одночасна експозиція еритроцитів із нітритом та ЕПЛ може виявити наявність антиоксидантів прямої дії, а попередня експозиція еритроцитів із ЕПЛ та подальше відмивання перед додаванням нітриту – присутність антиоксидантів непрямої дії.

Результати дослідження впливу ЕПЛ на вміст метгемоглобіну подано на рис. 1. Встановлено, що ЕПЛ здатне зменшувати вміст метгемоглобіну, тобто впливати на окисний стрес, викликаний нітритом натрію, у процесі попередньої експозиції з еритроцитами. Антиоксидантна дія ЕПЛ знижується після зберігання плаценти впродовж 3-х місяців за температури -20°C . У ЕПЛ, отриманому із плаценти після 6-місячного зберігання за температури -20°C , антиоксидантна дія відсутня (рис. 1, А). За умов зберігання плаценти впродовж

The data are shown as the mean \pm SE. For statistical processing of experimental results, a one-factor dispersion analysis ($\alpha = 0.05$; $n = 5$) was used, and a posteriori comparisons were performed according to Bonferroni's Student Criterion.

Results and discussion

The findings have shown that the protein content in the placenta derived extracts, kept at low temperatures, did not change significantly (Table).

The antioxidant action of HPE in relation to erythrocytes was studied in two ways: simultaneous exposure of the cells with extracts and sodium nitrite, and pre-exposure of the erythrocytes with HPE and subsequent incubation with sodium nitrite. Reducing the concentration of nitrite in incubation medium is possible as a result of interaction with antioxidants [9], with sulfhydryl groups of proteins and reduced glutathione [1], which may provide the antioxidant effect of HPE. At the same time, the SH-groups can be reduced both by means of enzymes and antioxidant proteins [3, 24, 30], which can be the HPE components. It should be noted that all antioxidants are divided into substances of either direct or indirect action [21]. Indirect antioxidants stimulate the antioxidant system and can inhibit free radical processes, and direct antioxidants have pronounced antiradical properties. Therefore, the simultaneous exposure of erythrocytes with nitrite and HPE can reveal the presence of antioxidants

3-х і 6-ти місяців при -80°C антиоксидантна дія ЕПЛ практично не відрізняється від отриманого зі свіжої плаценти (рис. 1, А). На нашу думку, антиоксидантну дію ЕПЛ, яка проявляється після відмивання еритроцитів, можна пояснити присутністю в ЕПЛ подібних до тіоредоксину протеїнів, що відновлюють SH-групи, їх окиснення є основним результатом дії нітриту натрію [13]. Слід зазначити, що підтримка SH-груп у відновленому стані запобігає зшиванню білків, викликаному впливом активних форм кисню [9].

Показано, що фракція ЕПЛ із м. м. близько 12 кДа проявляє антиоксидантну дію по відношенню до еритроцитів у стані окисного стресу, викликаному нітритом натрію [25]. Ми дослідили вплив кріоконсервування плаценти на антиоксидантну дію фракції її екстрактів, у якій містяться макромолекули з м. м. 10–12 кДа. Антиоксидантну дію фракції виявлено тільки після попередньої експозиції з еритроцитами (рис. 2, 3). Після 3-місячного зберігання плацент за температури -20 і -80°C значущих відмінностей порівняно з свіжоотриманими зразками зареєстровано не було. Антиоксидантна дія фракції після 6-місячного зберігання плаценти за температури -80°C

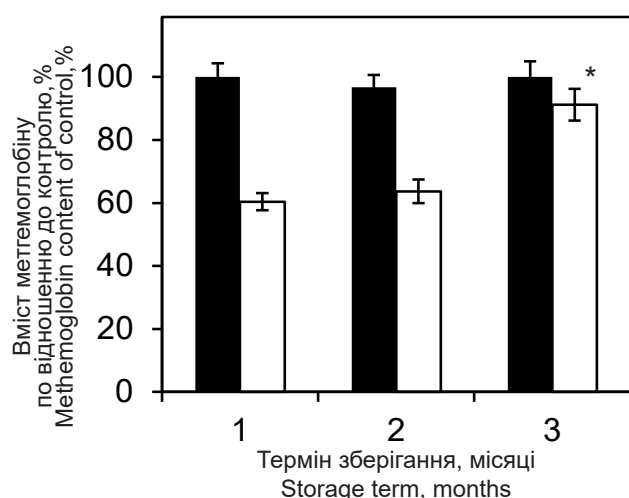


Рис. 2. Вплив фракції з м. м. 10–12 кДа на вміст метгемоглобіну в еритроцитах із нітритом натрію: 1 – свіжоотриманий ЕПЛ; 2 – ЕПЛ із плаценти, яка зберігалася протягом 3-х місяців при -20°C ; 3 – ЕПЛ із плаценти, яка зберігалася протягом 6-ти місяців при -20°C . ■ – одночасна експозиція з фракціями і нітритом; □ – попередня експозиція з фракціями. * – відмінності статистично значущі відносно свіжоотриманих ЕПЛ ($\alpha = 0,05$, $n = 5$).

Fig. 2. Influence of 10–12 kDa m.w. fraction on the content of methemoglobin in erythrocytes with sodium nitrite: 1 – fraction from HPE of fresh placenta; 2 – HPE derived from placenta stored for 3 months at -20°C ; 3 – HPE from the placenta stored for 6 months at -20°C . ■ – simultaneous exposure with fraction and nitrite; □ – pre-exposure with fraction * – differences are statistically significant versus HPE from fresh placenta ($\alpha = 0.05$, $n = 5$).

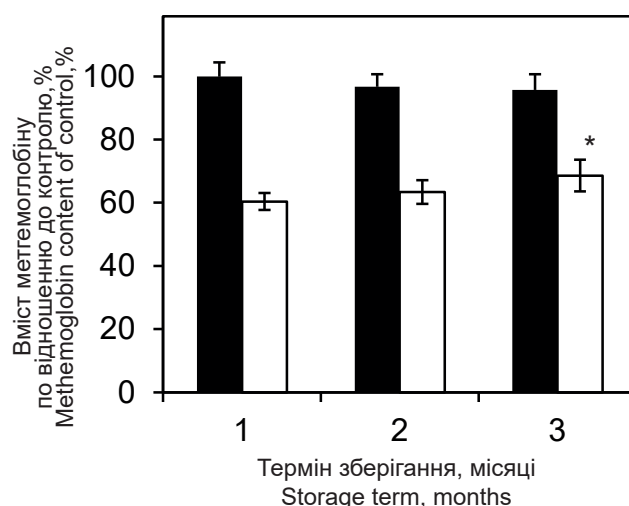


Рис. 3. Вплив фракції з м. м. 10–12 кДа на вміст метгемоглобіну в еритроцитах із нітритом натрію: 1 – свіжоотриманий ЕПЛ; 2 – ЕПЛ із плаценти, яка зберігалася протягом 3-х місяців при -80°C ; 3 – ЕПЛ із плаценти, яка зберігалася протягом 6-ти місяців при -80°C . ■ – одночасна експозиція з фракцією і нітритом; □ – попередня експозиція з фракцією. * – відмінності статистично значущі відносно свіжоотриманого ЕПЛ ($\alpha = 0,05$, $n = 5$).

Fig. 3. Influence of 10–12 kDa m. w. fraction on the content of methemoglobin in erythrocytes with sodium nitrite: 1 – fraction from HPE of fresh placenta; 2 – HPE derived from placenta stored for 3 months at -80°C ; 3 – HPE from the placenta stored for 6 months at -80°C . ■ – simultaneous exposure with fraction and nitrite; □ – pre-exposure with fraction * – differences are statistically significant versus HPE from fresh placenta ($\alpha = 0.05$, $n = 5$).

of direct action, and a pre-exposure of erythrocytes with HPE and further washing before adding nitrite can disclose the indirect antioxidants.

The results of studying the effect of HPE on the content of methemoglobin is shown in Fig. 1. It has been established that HPE is able to reduce the content of methemoglobin, that is, to affect the oxidative stress caused by sodium nitrite in case of pre-exposure to red blood cells. Antioxidant action of HPE decreases after storage of the placenta for 3 months at -20°C . In the HPE, obtained from the placenta after 6 months of storage at -20°C , there was no antioxidant effect found (Fig. 1A). After placenta storage for 3 and 6 months at -80°C , the antioxidant effect of HPE did not virtually differ from that obtained from the fresh placenta (Fig. 1A). We believe that the antioxidant effect of HPE, manifested after washing of erythrocytes, can be explained by the presence in the HPE of thioredoxin-like proteins that reduce the SH-groups whose oxidation is the main result of sodium nitrite [8]. It should be noted that maintaining the SH-groups in a reduced state prevents the association of proteins caused by the action of reactive oxygen species [4].



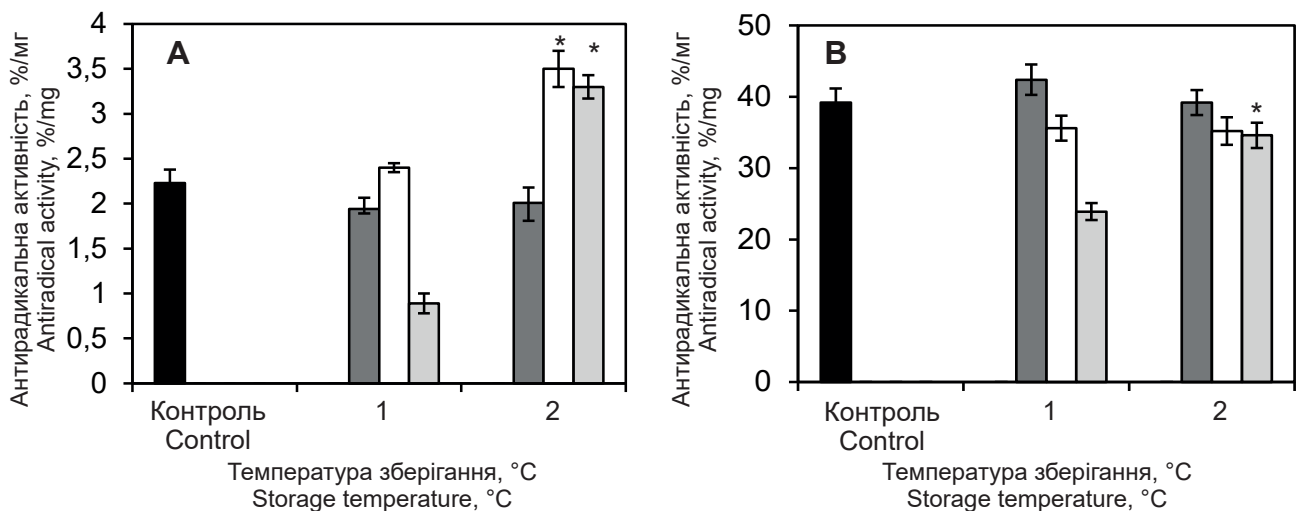


Рис. 4. Антирадикальна активність ЕПЛ (А) та фракції ЕПЛ з м. м. 10–12 кДа (В), отриманих із плацент, які зберігалися за низьких температур: 1 – при -20°C і 2 – при -80°C . ■ – ЕПЛ із свіжоотриманих плацент (контроль); ■ – ЕПЛ із плаценти, яка була охолоджена до відповідної температури; □ – ЕПЛ із плаценти, яка зберігалася протягом 3-х місяців; ■ – ЕПЛ із плаценти, яка зберігалася протягом 6-ти місяців. * – відмінності статистично значущі відносно контролю ($\alpha = 0,05$, $n = 5$).

Fig. 4. Antiradical activity of HPE (A) and HPE fraction with 10–12 kDa m. w. (B), derived from placenta stored at low temperatures: 1 – at -20°C and 2 – at -80°C . ■ – HPE from fresh placenta (control); ■ – HPE from placenta cooled down to corresponding temperature; □ – HPE from placenta stored for 3 months; ■ – HPE from placenta stored for 6 months; * – differences are statistically significant versus the control ($\alpha = 0.05$, $n = 5$).

не змінилася, а після зберігання плаценти за температури -20°C спостерігалася майже повна втрата антиоксидантної дії фракції з м. м. 10–12 кДа. Враховуючи отримані результати, можна припустити, що речовини, які активують захисні властивості еритроцитів по відношенню до окисного стресу у фракції 10–12 кДа, зберігаються в плаценті при низьких температурах (за винятком тривалого зберігання при -20°C).

Для визначення антирадикальної активності ЕПЛ залежно від строку зберігання плацент і кореляції з їх антиоксидантною дією була досліджена здатність ЕПЛ відновлювати ABTS^+ -радикал. На рис. 4 наведені значення антирадикальної активності ЕПЛ, отриманих із плацент, які зберігалися за низьких температур. Процес заморожування-відігріву практично не впливає на цей показник. Зберігання плаценти при -20°C впродовж 3-х місяців значно не змінює антирадикальну активність отриманих з неї екстрактів. Подовження строку зберігання у два рази зменшує цей показник на 50%, що супроводжується втратою антиоксидантної дії. Після 3- та 6-місячного зберігання досліджуваного біоматеріалу за температури -80°C антирадикальна активність ЕПЛ підвищується, що, можливо, пов'язано зі збільшенням доступності антиоксидантних груп для ABTS^+ -радикала. Цей процес не впливає на антиоксидантну дію по відношенню до еритроцитів із нітритом натрію. Антирадикальна активність фракції з м. м. 10–12 кДа значуще зменшується

It has been shown that an HPE fraction of about 12 kDa exhibits an antioxidant effect on erythrocytes in oxidative stress caused by sodium nitrite [24]. We investigated the influence of cryopreservation of the placenta on antioxidant effect of the extracts fraction, which contains macromolecules of 10–12 kDa m.w. It has been found that the antioxidant effect of the fraction was observed only after the pre-exposure with red blood cells (Fig. 2, 3). After 3 months of storage of the placenta at -20 and -80°C , no significant differences were found with fresh samples. The antioxidant action of the fraction after 6-month storage of the placenta at -80°C remained unchanged, and after storage of the placenta at -20°C , almost a complete loss of the antioxidant action of the fraction with 10–12 kDa m. w. was noted. Taking into account the results obtained, it can be assumed that substances, activating the protective properties of erythrocytes in relation to oxidative stress in a fraction of 10–12 kDa are preserved in the placenta at low temperatures (excluding a prolonged storage at -20°C).

Depending on the storage period of the placenta and the correlation with its antioxidant action, the HPE ability to reduce the ABTS^+ radical was investigated to determine the antiradical activity of HPE. Fig. 4A shows the antiradical activity of the HPE derived from placenta, stored at low temperatures. The freezing-thawing did not affect this index. Storage of the placenta at -20°C for 3 months did not significantly alter the anti-radical activity of the

ся тільки після 6-місячного зберігання за температури -20°C .

Отримані результати показали, що у водно-сольових екстрактах із плацент після 3-місячного знаходження за -20°C зберігається антиоксидантна дія по відношенню до еритроцитів у стані окисного стресу, викликаного нітритом натрію. Подовження строку зберігання плаценти до 6-ти місяців при -20°C призводить до втрати антиоксидантної дії її екстрактів. При цьому зменшується антирадикальна активність на 50% по відношенню до екстрактів із свіжоотриманої плаценти. Антиоксидантна дія водно-сольових екстрактів із плацент після 3-х і 6-ти місяців зберігання при -80°C відповідає цьому показнику для екстракту зі свіжоотриманої плаценти. Аналогічна закономірність властива фракції з м. м. 10–12 кДа.

Таким чином, плаценту можна зберігати впродовж 3-х місяців при -20°C зі збереженням антиоксидантних властивостей отриманих з неї екстрактів. Зниження температури до -80°C дозволяє вдвічі збільшити строк зберігання.

У подальшій роботі перспективним є вивчення захисної дії ЕПЛ по відношенню до інших окисників, зокрема тих, що впливають на мембрани еритроцитів, і визначення строків зберігання плацент за низьких температур, які не впливають на антиоксидантну дію.

Висновки

1. Отримані результати показали, що антиоксиданти, які знаходяться у водно-сольових екстрактах плаценти, мають захисну дію по відношенню до еритроцитів у стані окисного стресу, викликаного нітритом натрію, вони не втрачають своїх властивостей після 3-місячного зберігання плаценти за температури -20°C і 6-місячного при -80°C . Екстракти з плаценти, яка зберігалася за температури -20°C протягом 6-ти місяців, не виявляли антиоксидантної дії.

2. Встановлено, що після 6-місячного зберігання плаценти за температури -20°C антирадикальна активність отриманих із неї екстрактів знижується більше ніж на 50%.

3. Показано, що найбільш активна фракція ЕПЛ із м. м. 10–12 кДа зберігає свої антиоксидантні властивості після 3-місячного зберігання плаценти за температури -20°C і після 6-місячного при -80°C .

Література

1. Луценко НС, Прокопюк ОС, Бондаренко ІА, и др. Применение криоконсервированной плацентарной ткани при изоиммунизации беременных женщин. Проблемы криобиологии. 2008; 18(3): 316-8.

extracts derived from it. Two-fold extension of the shelf life reduces this value by 50%, which is accompanied by the loss of antioxidant action. After 3 and 6 months of storage of the investigated specimens at -80°C , antiradical activity of HPE was increased, which may be due to an enhanced availability of antioxidant groups for the ABTS⁺ radical. This process does not affect the antioxidant effect in relation to red blood cells with sodium nitrite. Antiradical activity of a fraction of 10–12 kDa m. w. was significantly decreased only after 6 months of storage at a temperature -20°C .

The obtained results showed that in aqueous-saline extract from the placenta stored 3 months at -20°C , the antioxidant action in relation to erythrocytes in oxidative stress caused by sodium nitrite was preserved. Prolongation of the storage period of the placenta for up to 6 months at a temperature of -20°C led to the loss of antioxidant action of its extract. This reduced the antiradical activity by 50% if comparing to the extract from the fresh placenta. The antioxidant effect of aqueous-saline extract from the placenta after 3 and 6 months of storage at a temperature of -80°C corresponded to this index for the extract from the fresh placenta. A similar pattern was characteristic of a 10–12 kDa fraction.

Thus, the placenta can be stored for 3 months at -20°C with preservation of antioxidant properties of extract derived from it. Lowering the temperature down to -80°C enables to double the storage term.

In future studies it is promising to investigate the protective effect of HPE in relation to other oxidants, in particular those affecting the membranes of erythrocytes, and to determine the shelf life of placentas at low temperatures, not affecting an antioxidant effect.

Conclusions

1. The HPE has been demonstrated to activate antioxidant protection of erythrocytes in oxidative stress caused by sodium nitrite. Antioxidants found in aqueous saline extract of placenta have not been shown to lose its properties after 3 months of the placenta storage at -20°C and during 3 and 6 months at -80°C .

2. It was established that after 6 months of the placenta storage at -20°C , the antiradical activity of the extract derived from it decreased by more than 50%, and antioxidant activity was absent.

3. It has been shown that the HPE fraction of 10–12 kDa has retained its antioxidant properties after 3 months of placental storage at -20°C and after 3 and 6 months at -80°C .



2. Нардид ОА, Розанова ЕД, Цымбал ЛВ, и др. Влияние низкотемпературного хранения плаценты на свойства ее экстрактов. Проблемы криобиологии. 2008; 18(2): 172.
3. Нарожний СВ, Нардид ОА, Розанова ЕД, та ін. Вплив заморожування плаценти на антиоксидантну дію її екстрактів по відношенню до еритроцитів при окисному стресі. Вестник проблем биологии и медицины. 2017; 4(3):168–72.
4. Погожих ДН, Розанова ЕД, Нардид ОА. Изменение свойств водно-солевых экстрактов плаценты человека в процессе низкотемпературного хранения. Проблемы криобиологии. 2008; 18(1):22–6.
5. Прокопюк ВЮ, Фалько ОВ, Мусатова ІБ. Кріоконсервування та низькотемпературне зберігання плацентарних біооб'єктів. Проблемы криобиологии и криомедицины. 2015; 25(4): 291–311.
6. Розанова СЛ, Розанова ЕД, Нардид ОА, и др. Антиоксидантная активность экстрактов плаценты после низкотемпературного и гипотермического хранения. Проблемы криобиологии. 2011; 21(3): 291–300.
7. Ansari FA, Ali SN, Arif H, et al. Acute oral dose of sodium nitrite induces redox imbalance, DNA damage, metabolic and histological changes in rat intestine. PLOS ONE [Internet]. 2017; 12(4): 1–22 [Cited 03.03.2018]. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0175196>.
8. Ansari FA, Ali SN, Mahmood R. Sodium nitrite-induced oxidative stress causes membrane damage, protein oxidation, lipid peroxidation and alters major metabolic pathways in human erythrocytes. Toxicol In Vitro. 2015; 29(7):1878–86.
9. Bala A, Haldar PK. Regulatory role of peroxynitrite (ONOO-) for oxidative damage to human Red Blood Cells (hRBC). Inflamm Cell Signal [Internet]. 2015; 2(1): 1–4. [Cited 03.03.2018]. Available from: http://www.smartscitech.com/index.php/ICS/article/view/695/pdf_78.
10. Baynes JW, Dominiczak MH. Medical Biochemistry. 4th ed. Philadelphia: Elsevier; 2014. Chapter 37, Oxygen and life; p. 497–506.
11. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, et al. Oxidative stress and antioxidant defense. World Allergy Organ J [Internet]. 2012; 5(1): 9–19. [Cited 03.03.2018]. Available from: <https://waojournal.biomedcentral.com/articles/10.1097/WOX.0b013e3182439613>.
12. Cao E, Chen Y, Cui Z, et al. Effect of freezing and thawing rates on denaturation of proteins in aqueous solutions. Biotechnol Bioenerg. 2003; 82(6): 684–90.
13. Choi HY, Kim SW, Kim B, et al. Alpha-fetoprotein, identified as a novel marker for the antioxidant effect of placental extract, exhibits synergistic antioxidant activity in the presence of estradiol. PLOS ONE [Internet]. 2014; 9(6): e99421. [Cited 03.03.2018]. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0099421>.
14. Çimen MYB. Free radical metabolism in human erythrocytes. Clinica Chimica Acta. 2008; 390: 1–11.
15. Gonța M. The role of the natural antioxidants in the oxihemoglobin oxidation and the diminution of nitrite concentration. Chem J of Moldova. 2007; 2(1): 67–77.
16. Harris DA. Spectrophotometric assays in: Spectrophotometry & spectrofluorimetry. Washington: IRL Press; 1987. p. 58.
17. 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; 49: 74–6.
18. Li X, Wang Z, Xiaofei Q, et al. Oxidative stress and antioxidant status in immune thrombocytopenia. J Blood Disord Transfus [Internet]. 2017; 8(4): 1–4. [Cited 03.03.2018]. Available from: <https://www.omicsonline.org/open-access/oxidative-stress-and-antioxidant-status-in-immune-thrombocytopenia-2155-9864-1000398.pdf>.
19. Lucantoni G, Pietraforte D, Matarrese P, et al. The red blood cell as a biosensor for monitoring oxidative imbalance in chronic obstructive pulmonary disease: an ex vivo and in vitro study. Antioxid Redox Signal. 2006; 8(7–8):1171–82.

References

1. Ansari FA, Ali SN, Arif H, et al. Acute oral dose of sodium nitrite induces redox imbalance, DNA damage, metabolic and histological changes in rat intestine. PLOS ONE [Internet]. 2017; 12(4): 1–22 [Cited 03.03.2018]. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0175196>.
2. Ansari FA, Ali SN, Mahmood R. Sodium nitrite-induced oxidative stress causes membrane damage, protein oxidation, lipid peroxidation and alters major metabolic pathways in human erythrocytes. Toxicol In Vitro. 2015; 29(7):1878–86.
3. Bala A, Haldar PK. Regulatory role of peroxynitrite (ONOO-) for oxidative damage to human Red Blood Cells (hRBC). Inflamm Cell Signal [Internet]. 2015; 2(1): 1–4. [Cited 03.03.2018]. Available from: http://www.smartscitech.com/index.php/ICS/article/view/695/pdf_78.
4. Baynes JW, Dominiczak MH. Medical Biochemistry. 4th ed. Philadelphia: Elsevier; 2014. Chapter 37, Oxygen and life; p. 497–506.
5. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, et al. Oxidative stress and antioxidant defense. World Allergy Organ J [Internet]. 2012; 5(1): 9–19. [Cited 03.03.2018]. Available from: <https://waojournal.biomedcentral.com/articles/10.1097/WOX.0b013e3182439613>.
6. Cao E, Chen Y, Cui Z, et al. Effect of freezing and thawing rates on denaturation of proteins in aqueous solutions. Biotechnol Bioenerg. 2003; 82(6): 684–90.
7. Choi HY, Kim SW, Kim B, et al. Alpha-fetoprotein, identified as a novel marker for the antioxidant effect of placental extract, exhibits synergistic antioxidant activity in the presence of estradiol. PLOS ONE [Internet]. 2014; 9(6): e99421. [Cited 03.03.2018]. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0099421>.
8. Çimen MYB. Free radical metabolism in human erythrocytes. Clinica Chimica Acta. 2008; 390: 1–11.
9. Gonța M. The role of the natural antioxidants in the oxihemoglobin oxidation and the diminution of nitrite concentration. Chem J of Moldova. 2007; 2(1): 67–77.
10. Harris DA. Spectrophotometric assays in: Spectrophotometry & spectrofluorimetry. Washington: IRL Press; 1987. p. 58.
11. 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; 49: 74–6.
12. Li X, Wang Z, Xiaofei Q, et al. Oxidative stress and antioxidant status in immune thrombocytopenia. J Blood Disord Transfus [Internet]. 2017; 8(4): 1–4. [Cited 03.03.2018]. Available from: <https://www.omicsonline.org/open-access/oxidative-stress-and-antioxidant-status-in-immune-thrombocytopenia-2155-9864-1000398.pdf>.
13. Lucantoni G, Pietraforte D, Matarrese P., et al. The red blood cell as a biosensor for monitoring oxidative imbalance in chronic obstructive pulmonary disease: an ex vivo and in vitro study. Antioxid Redox Signal. 2006; 8(7–8):1171–82.
14. Lutsenko NS, Prokopyuk OS, Bondarenko IA, et al. Application of cryopreserved placental tissue at isoimmunization of pregnant women. Problems of Cryobiology. 2008; 18(3): 316–8.
15. May JM, Qu ZC, Xia L, et al. Nitrite uptake and metabolism and oxidant stress in human erythrocytes. Am J Physiol Cell Physiol. 2000; 279(6): C1946–54.
16. Myatt L, Cui X. Oxidative stress in the placenta. Histochem Cell Biol 2004; 122(4):369–82.
17. Nardid OA, Rozanova ED, Tsymbal LV, et al. Effect of low-temperature storage of placenta on its extract properties. Problems of Cryobiology. 2008; 18(2): 172.
18. Narozhnyi SV, Nardid OA, Rozanova YeD, et al. [Effect of placenta freezing on antioxidant activity of its extracts against erythrocytes in oxidative stress]. Bulletin of Problems in Biology and Medicine. 2017; 4(3): 168–72. Russian.
19. Pogozhikh DN, Rozanova ED, Nardid OA, et al. Comparative evaluation of properties of human placenta extracts stored at



20. May JM, Qu ZC, Xia L, et al. Nitrite uptake and metabolism and oxidant stress in human erythrocytes. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2000; 279(6): C1946–54.
21. Myatt L, Cui X. Oxidative stress in the placenta. *Histochem Cell Biol.* 2004; 122(4):369–82.
22. Pogozhikh DN, Rozanova ED, Nardid OA, et al. Comparative evaluation of properties of human placenta extracts stored at -20°C and extracts obtained from stored at -20°C tissues. *Cryo-Letters.* 2010; 31(2): 172.
23. Poston L, Igosheva N, Mistry HD, et al. Role of oxidative stress and antioxidant supplementation in pregnancy disorders. *Am J Clin Nutr.* 2011; 94(6): 1980S–1985S.
24. Pradedova EV, Isheeva OD, Salyaev RK. Classification of the antioxidant defense system as the ground for reasonable organization of experimental studies of the oxidative stress in plants. *Russ J Plant Physiol.* 2011;58(2):210–7.
25. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med.* 1999; 26(9–10): 1231–7.
26. Rozanova S, Cherkashina Y, Repina S, et al. Protective effect of placenta extracts against nitrite-induced oxidative stress in human erythrocytes. *J Cell Mol Biol Lett.* 2012; 17(2): 240–8.
27. Rozanova S. Antioxidant properties of extracts derived from placentae of different gestation terms. *Oxid Antioxid Med Sci [Internet].* 2014; 3(3): 181-6. [Cited 03.03.2018]. Available from: <https://www.ejmanager.com/mnstemp/65/65-1407488704.pdf?t=1537727194>.
28. Sarciaux JM, Mansour S, Hageman MJ, et al. Effect of buffer composition and processing conditions on aggregation of bovine IgG during freeze-drying. *J Pharm Sci.* 1999; 88(12): 1354–61.
29. Shinde V, Dhalwal K, Paradkar AR, et al. Evaluation of in-vitro antioxidant activity of human placental extract. *Pharmacologyonline [Internet].* 2006;3:172-9. [Cited 03.03.2018]. Available from: <http://pharmacologyonline.silae.it/files/archives/2006/vol3/014.Shinde.pdf>.
30. Togashi S, Takahashi N, Kubo Y. Purification and identification of antioxidant substances in human-placenta extracts. *J Health Sci.* 2000; 46(2): 117-25.
31. Umekawa T, Sugiyama T, Kihira T, et al. Overexpression of thioredoxin-1 reduces oxidative stress in the placenta of transgenic mice and promotes fetal growth via glucose metabolism. *Endocrinology.* 2008;149(8):3980-8.
32. Whiteley GS, Fuller BJ, Hobbs KE. Deterioration of cold-stored tissue specimens due to lipid peroxidation: modulation by antioxidants at high subzero temperatures. *Cryobiology.* 1992; 29(6): 668–73.
33. Zwart A, Buursma A, van Kampen EJ, et al. A multi-wavelength spectrophotometric method for the simultaneous determination of five haemoglobin derivatives. *J Clin Chem Clin Biochem.* 1981; 19: 457–63.
- 20°C and extracts obtained from stored at -20°C tissues. *Cryo Letters.* 2010; 31(2): 172.
20. Pogozhikh DN, Rozanova ED, Nardid OA. Change of properties of human placenta aqueous-saline extracts during low temperature storage. *Problems of Cryobiology.* 2008; 18(1): 22–6.
21. Poston L, Igosheva N, Mistry HD, et al. Role of oxidative stress and antioxidant supplementation in pregnancy disorders. *Am J Clin Nutr.* 2011; 94(6): 1980S–1985S.
22. Pradedova EV, Isheeva OD, Salyaev RK. Classification of the antioxidant defense system as the ground for reasonable organization of experimental studies of the oxidative stress in plants. *Russ J Plant Physiol.* 2011;58(2):210–7.
23. Prokopyuk VY, Falko OV, Musatova IB. Low temperature preservation and storage of placental biological derivatives. *Probl Cryobiol Cryomed.* 2015; 25(4): 291–311.
24. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med.* 1999; 26(9–10): 1231-7. PMID: 10381194.
25. Rozanova S, Cherkashina Y, Repina S, et al. Protective effect of placenta extracts against nitrite-induced oxidative stress in human erythrocytes. *J Cell Mol Biol Lett.* 2012; 17(2): 240-8.
26. Rozanova S. Antioxidant properties of extracts derived from placentae of different gestation terms. *Oxid Antioxid Med Sci [Internet].* 2014; 3(3): 181-6. [Cited 03.03.2018]. Available from: <https://www.ejmanager.com/mnstemp/65/65-1407488704.pdf?t=1537727194>.
27. Rozanova SL, Rozanova ED, Nardid OA, et al. Antioxidant activity of placenta extracts after low temperature and hypothermic storage. *Problems of Cryobiology.* 2011; 21(3): 291–300.
28. Sarciaux JM, Mansour S, Hageman MJ, et al. Effect of buffer composition and processing conditions on aggregation of bovine IgG during freeze-drying. *J Pharm Sci.* 1999; 88(12): 1354–61.
29. Shinde V, Dhalwal K, Paradkar AR, et al. Evaluation of in-vitro antioxidant activity of human placental extract. *Pharmacologyonline [Internet].* 2006;3:172-9. [Cited 03.03.2018]. Available from: <http://pharmacologyonline.silae.it/files/archives/2006/vol3/014.Shinde.pdf>.
30. Togashi S, Takahashi N, Kubo Y. Purification and identification of antioxidant substances in human-placenta extracts. *J Health Sci.* 2000; 46(2): 117–25.
31. Umekawa T, Sugiyama T, Kihira T, et al. Overexpression of thioredoxin-1 reduces oxidative stress in the placenta of transgenic mice and promotes fetal growth via glucose metabolism. *Endocrinology.* 2008;149(8):3980–8.
32. Whiteley GS, Fuller BJ, Hobbs KE. Deterioration of cold-stored tissue specimens due to lipid peroxidation: modulation by antioxidants at high subzero temperatures. *Cryobiology.* 1992; 29(6): 668–73.
33. Zwart A, Buursma A, van Kampen EJ, et al. A multi-wavelength spectrophotometric method for the simultaneous determination of five haemoglobin derivatives. *J Clin Chem Clin Biochem.* 1981; 19: 457–63.