

Тканинна та вікова специфічність водно-сольових екстрактів кріоконсервованих фрагментів ксеноорганів

С.Є. ГАЛЬЧЕНКО

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

Tissue and Age Specificity of Aqueous-Saline Extracts from Cryopreserved Xenoorgans Fragments

S.E. GALCHENKO

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

Хроматографічним методом досліджено молекулярно-масовий розподіл пептидів у водно-сольових екстрактах кріоконсервованих фрагментів ксеноорганів, який залежить від органу та віку тварини. Отримані результати можуть бути використані при встановленні механізмів біологічної дії пептидних екстрактів та у розробці препаратів на їх основі.

Ключові слова: екстракт, кріоконсервування, ксеноорган, хроматографія, пептиди.

Хроматографическим методом исследовали молекулярно-массовое распределение пептидов в водно-солевых экстрактах кріоконсервованных фрагментов ксеноорганов, которое зависит от органа и возраста животного. Полученные результаты могут быть использованы при установлении механизмов биологического действия пептидных экстрактов и разработке препаратов на их основе.

Ключевые слова: экстракт, кріоконсервирование, ксеноорган, хроматография, пептиды.

The molecular mass distribution of peptides in water-saline extracts from cryopreserved xenoorgans fragments was studied in this work using the chromatographic method. It was shown that it depended on both kind of organ and the animal age. The data obtained can find application in investigating the mechanisms of biological action of these extracts as well as for working out the preparations on their basis.

Key-words: extract, cryopreservation, xenoorgan, chromatography, peptides.

Екстракти ксеногенних тканин мають високу біологічну активність, зокрема, стимулюють репараційні процеси при деяких патологічних станах в організмі, і їх дія є тканинно-специфічною та видонеспецифічною [1, 2, 4], що дає можливість використовувати їх при розробці імунобіологічних препаратів.

Розроблений нами спосіб отримання водно-сольових екстрактів фрагментів ксеногенних органів із використанням кріобіологічних технологій дозволяє збільшити вихід біологічно активних речовин із тканини в розчин [8]. Основна біологічна дія таких екстрактів пов'язана з наявністю в них регуляторних тканинно-специфічних пептидів.

Дослідженню структури та механізму дії фізіологічно активних пептидів приділяють увагу спеціалісти різного профілю [2, 3, 9, 10]. Речовини цього класу дають багато варіантів регулювання функцій організму на всіх рівнях його інтеграції від регуляції окремих процесів метаболізму в клітині до генералізованих реакцій поведінки. Ці пептиди приймають участь у регуляції багатьох процесів у організмі, в тому числі проліферації, репарації та регенерації [1, 3, 6]. Створення препаратів на основі біологічно активних речовин, вивчення механізму їх дії потребують комплексних досліджень,

Адреса для кореспонденції: Гальченко С.Є., Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61015; тел.: +38 (057) 372-74-35, факс: +38 (057) 373-30-84, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Extracts of xenogenic tissue are known to possess a high biological activity, particularly, to stimulate repair processes at some pathological states in an organism, their action is tissue-specific and species-non-specific [1, 2, 4], that enables us to use them when elaborating immunobiological preparations.

Our own method for obtaining aqueous-saline extracts from xenogenic organs using cryo-biological technologies enables us to increase the release of biologically active substances to the solution out of tissue [8]. Principal biological effect of such extracts is related to regulatory tissue-specific peptides present in them.

Many experts pay great attention to studying the structure and effect mechanism of physiologically active peptides [2, 3, 9, 10]. Such substances provide a number of issues to regulate organism functions at all the integration levels from the regulation of certain metabolism processes in a cell to generalized behavior responses. These peptides participate in the regulation of different processes in an organism, among which are proliferation, repair and regeneration [1, 3, 6]. Production of the preparations based on biologically active substances, studying their effect mechanism require profound studies directed to the isolation, fractioning and analysis of them.

Address for correspondence: Galchenko S.E., Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the Natl. Acad. Sci. of Ukraine, 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 372 7435, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

спрямованих на виділення, фракціонування та аналіз цих речовин.

Мета роботи – вивчення молекулярно-масового розподілу пептидів в екстрактах кріоконсервованих фрагментів органів свиней і поросят хроматографічним методом.

Матеріали і методи

У роботі були використані водно-сольові екстракти печінки свиней (ЕПС), новонароджених поросят (ЕПНП), а також підшлункової залози свиней (ЕПЗС), які отримували з кріоконсервованих фрагментів цих органів за методом [8].

Експерименти проводили згідно з правилами “Європейської конвенції захисту хребетних тварин, що застосовуються в експериментальних та інших дослідних цілях” (Страсбург, 1985).

Для визначення молекулярно-масового розподілу низькомолекулярних фракцій екстрактів, що включають пептиди та інші органічні з’єднання, використовували гель-проникаючу хроматографію [5]. Перед цим екстракти пропускали через фільтр “Міліпор” з діаметром пор 0,45 мкм. Гель-фільтрацію проводили на колонці діаметром 16 мм та довжиною 400 мм, яка заповнена полівініловим гелем TSKGel Toyopearl HW-40 Fine (Японія). Для елюації використовували фосфатно-сольовий буфер такого складу: $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ – 30 ммоль/л, NaCl – 100 ммоль/л, pH – 7,5. Елюент подавали до колонки через петльовий інжектор (об’єм 0,1 мл) перистальтичним насосом LKB-2132 (Швеція). Хроматограми реєстрували ультрафіолетовим детектором LKB-2238 Uvicord S11 при довжині хвилі 254 нм. Сигнал детектора записували двоканальним самопишучим потенціометром LKB-2210 Rekorder та інтегратором Watear-746, який фіксує дані про час утримання та кількісні співвідношення окремих фракцій в суміші у відсотках. Молекулярні маси фракцій визначали за часом утримання стандартних речовин (інсуліну, глюкагону, соматостатину та вітамінів B_2 і B_{12}).

Результати та обговорення

Хроматограми ЕПС і ЕПНП (рисунок, криві а, б; табл. 1, 2) свідчать про те, що поліпептидний склад цих екстрактів відрізняється за якістю та кількістю. У ЕПНП спостерігається менша кількість фракцій, а кількість пептидів з молекулярною масою, яка перевищує 10000 (фракція Р), значно менша. Якщо на хроматограмі ЕПС фракція Р становить 42,6, то на хроматограмі ЕПНП – 3,7%. Другою за величиною на хроматограмі ЕПС є фракція G_1 (молекулярна маса 1270), питома площа якої становить 21,6%, а на хроматограмі ЕПНП вона відсутня, найбільшою на ній є фракція поліпептидів з молекулярною масою 1100, інші фракції значно

The study was aimed at studying a molecular-mass distribution of peptides in cryopreserved organ fragments from pigs and piglets using the method of chromatography.

Materials and methods

In the research there were used aqueous-saline pig liver extracts (PLE), those of newborn piglets (NPLE), as well as pig pancreas extracts (PPE) derived from cryopreserved fragments of these organs by the method [8].

Experiments were carried-out in compliance with the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 18.III.1986).

To determine the molecular-mass distribution of low-molecular extract fractions, containing peptides and other organic compounds there was used gel-penetrating chromatography [5]. Prior to this, the extracts were filtered using Milipor filter with 0.45 μm pore diameter. Gel-filtration was done in the column of 16 mm diameter and 400 mm length, filled with TSKGel Toyopearl HW-40 Fine polyvinyl gel (Japan). Phosphate-saline buffer of a following composition was used for elution: $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 30 mmol/l, NaCl 100 mmol/l, pH 7.5. Eluent was supplied to the column through a loop injector (0.1 ml volume) by LKB-2132 peristaltic pump (Sweden). Chromatograms were recorded using LKB-2238 Uvicord S11 ultraviolet detector at a 254 nm wave length. The detector signal was recorded by a two-channel LKB-2210 Rekorder self-recording potentiometer and Watear-746 integrator to record the data on holding time and quantitative ratios of some fractions in a mixture in percents. Molecular masses of fractions were determined according to holding time for standard substances (insulin, glucagon, somatostatin and B_2 and B_{12} vitamins).

Results and discussion

PLE and NPLE chromatograms (Figure, curves a, b; Tables 1,2) prove these extracts’ polypeptide composition to differ on quality and quantity. In NPLE there is observed lower amount of fractions, while the number of peptides with the molecular mass exceeding 10000 (fraction P) is significantly lower. If fraction P makes 42.6 in PLE chromatogram, this value for NPLE is 3.7%. Fraction G_1 (molecular mass of 1270) is the following value in NPLE chromatogram, specific square of which makes 21.6%, it is absent in PLE chromatogram, as the highest there is polypeptides’ fraction with the molecular mass of 1100, other fractions are considerably lower. Polypeptides with m.m. less than 800 are also absent in NPLE, though they appear in PLE in a small amount.

PPE composition (Figure, curve c; Table 3) is characterized by a small amount of peptides with the

менші. В ЕПНП також відсутні поліпептиди з молекулярною масою менше 800, які в ЕПС виявляються, хоча і в незначній кількості.

Склад ЕПЗС (рисунок, крива в; табл. 3) характеризується незначною кількістю пептидів з молекулярною масою, більшою за 10000 та значною – з 500, 800 та 1090 (фракції К, І, Н). До уваги слід брати і пептиди інших фракцій, кількість яких в екстрактах незначна, тому що біологічна дія регуляторних пептидів *in vitro* та *in vivo* виявляється при незначних їх концентраціях [3].

Таким чином, у досліджених екстрактах кріоконсервованих фрагментів ксеноорганів спостерігаються речовини пептидної природи з широким спектром молекулярних мас. Ці спектри різні для екстрактів фрагментів різних органів. Якісний та кількісний склад екстрактів залежить від віку тварин. Основна відмінність ЕПНП від ЕПС полягає в меншій кількості фракцій (7 та 12 відповідно), але ефективність ЕПП, яка виявляється в стимуляції репараційних процесів у печінці, при токсичному гепатиті дещо вища, ніж ЕПС [1]. Це може бути пов'язано з різним якісним складом регуляторних пептидів у цих екстрактах. Адже процеси регене-

molecular mass higher than 10000 and with a considerable part of those with m.m. 500, 800 and 1090 (fractions K, I, H). You should also take into account the peptides of other fractions, which amount is insignificant in extracts, as the biological effect of regulatory peptides *in vitro* and *in vivo* is manifested at their low concentrations [3].

Therefore in studied extracts of cryopreserved xenoorgans fragments there are observed substances of peptides origin with a wide spectrum of molecular masses. These spectra are different for fragments extracts derived from various organs. Qualitative and quantitative composition of extracts is dependent upon an animal's age. Major difference of NPPE upon PPE consists in less quantity of fractions (7 and 12 correspondingly), while NPPE efficacy which is manifested in stimulation of

Таблиця 1. Пептидний склад екстракту кріоконсервованих фрагментів печінки статевозрілої свині за даними хроматографії

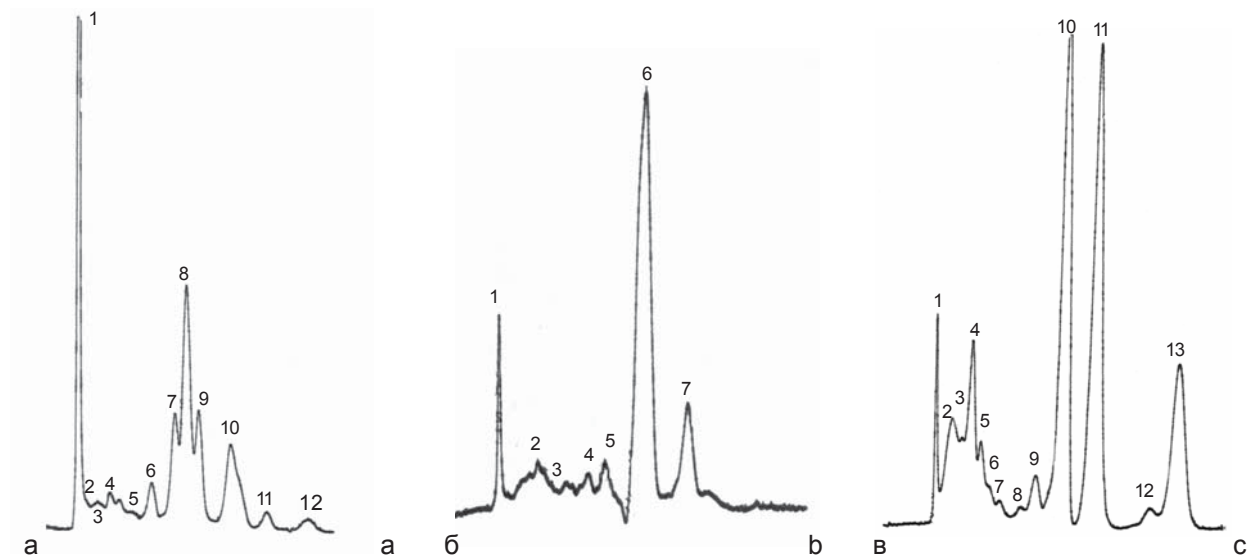
Table 1. Peptides content of cryopreserved liver fragments in mature pig on chromatography data

Номер фракції Fraction N	Фракція Fraction	Площа фракції, мм ² Fraction square, mm ²	Питома площа піку фракції,% Specific weight of the fraction peak,%	Молекулярна маса пептидів Molecular mass of peptides
1	P	421,5	42,6	10000
2	A	0,1	0,1	6180
3	B ₁	10,0	1,0	5400
4	C	6,3	0,6	4440
5	D	0,1	0,1	3400
6	F ₁	28,8	2,9	2190
7	G	85,6	8,7	1490
8	G ₁	214,1	21,6	1270
9	H	85,1	8,6	1090
10	I	112,9	11,1	800
11	J	15,6	1,6	630
12	K	9,3	0,6	500

Таблиця 2. Пептидний склад екстракту кріоконсервованих фрагментів печінки новонародженого поросяти за даними хроматографії

Table 2. Peptides content in cryopreserved liver fragments extract derived from newborn piglet on chromatography data

Номер фракції Fraction N	Фракція Fraction	Площа фракції, мм ² Fraction square, mm ²	Питома площа піку фракції, % Specific weight of the fraction peak, %	Молекулярна маса пептидів Molecular mass of peptides
1	P	26,1	6,7	10000
2	B	14,0	3,6	5560
3	C ₁	0,7	0,2	4200
4	F	3,1	0,8	4200
5	F ₂	15,2	3,9	1790
6	H	281,6	71,7	1100
7	I	39,6	10,1	800



Хроматограми екстрактів криоконсервованих фрагментів: печінки свині (а), печінки новонародженого поросяти (б) і підшлункової залози свині (в).

Chromatograms of cryopreserved fragments extracts: pig liver (a), newborn piglet liver (b) and pig pancreas (c).

рації та репарації, у регулюванні яких приймають участь відповідні пептиди, в ембріональний період розвитку та в дорослому організмі протікають неоднаково. Таким чином, частина регуляторних пептидів з органів новонароджених поросят можуть бути пептидами, які характерні для тканини ембріонів.

Одна з особливостей фізіологічно активних пептидів – їх утворення у разі потреби з білкової молекули попередника шляхом протеолізу при участі ферментів різних класів. Цей спосіб більш швидкий, ніж рибосомальний синтез, він дозволяє оперативніше реагувати на потреби організму. Той факт, що вихід пептидів в екстракт із криоконсервованих фрагментів органів вищій, ніж з нативних [8], дозволяє припустити, що внаслідок впливу негативних факторів криоконсервування на клітини запускається механізм такого утворення пептидів, які сприяють запуску процесів репарації та регенерації відповідного органу [1].

Відомо також, що криоконсервований біологічний матеріал проявляє меншу антигенність, ніж нативний [7], тому можливо, що фізико-хімічні фактори, які впливають

reparation processes in liver, is somewhat higher at toxic hepatitis than PLE one [1]. This may be associated with the different qualitative content of regulatory peptides in these extracts, as regeneration and reparation processes in the regulation of which certain

Таблиця 3. Пептидний склад екстракту криоконсервованих фрагментів підшлункової залози статевозрілої свині за даними хроматографії
Table 3. Peptides content of cryopreserved pancreas fragments extract in mature pig on chromatography data

Номер фракції Fraction N	Фракція Fraction	Площа фракції, мм ² Fraction square, mm ²	Питома площа піку фракції, % Specific weight of the fraction peak, %	Молекулярна маса пептидів Molecular mass of peptides
1	P	61,8	3,4	10000
2	A	140,3	7,6	8170
3	B ₁	0,1	0,1	5500
4	B ₂	204,9	11,2	5280
5	C ₁	69,9	3,8	4290
6	D	11,3	0,6	3370
7	E	9,5	0,5	2870
8	F ₁	6,6	0,4	1900
9	G	42,6	2,3	1500
10	H	473,4	25,6	1090
11	I	552,1	30,1	800
12	J	18,6	1,0	530
13	K	245,2	13,4	500

на клітини під час заморожування (гіперосмолярність, зміна рН і т.д.), сприяють вивільненню і виходу в екстракт ендogenous антигенних пептидів (глікопептидів) з молекул головного комплексу гістосумісності, як це відбувається при обробці тканини кислотою [2]. Але для з'ясування, чи вірні ці припущення, потрібні додаткові дослідження.

Висновки

1. Молекулярно-масовий розподіл пептидів у водно-сольових екстрактах кріоконсервованих фрагментів ксеноорганів залежить від органу та віку тварин. Отримані дані слід мати на увазі при дослідженні механізмів дії екстрактів тканини.

2. Результати хроматографічного дослідження екстрактів тканин можуть бути використані при розробці та стандартизації препаратів на їх основі.

Автор висловлює щире подяку ст. наук. співробітнику ІПКІК НАН України О.Ю. Семенченку за методичну допомогу при виконанні цієї роботи.

Література

1. Гальченко С.Є., Белочкіна І.В., Тининика Л.М., Сандомирський Б.П. Вплив екстрактів підшлункової залози і печінки свиней на щурів з експериментальними патологіями відповідних органів // Трансплантологія.– 2003.– Т. 4, № 1.– С. 68 -70.
2. Кайдашев І.П. Тканевая специфичность пептидных экстрактов, выделенных из различных органов, и иммунорегуляторное действие пептидного экстракта почек // Биополимеры и клетка.– 1995.– Т. 4, № 5.– С. 61-74.
3. Кузник Б.И., Морозов В.Г., Хавинсон В.Х. Цитомедины: 25-летний опыт экспериментальных и клинических исследований.– СПб.: Наука, 1998.– 310 с.
4. Смирнов В.С., Малинин В.В., Кетлинский С.А. Терапия вторичных иммунодефицитных состояний пептидными биорегуляторами. Иммунодефицитные состояния / Под ред В.С. Смирнова и И.С. Фрейдлин.– СПб: Фолиант, 2000.– С. 477-533.
5. Столяров Б.В., Савинов И.М., Витенберг А.Г., Карцова А.А. Практическая газовая и жидкостная хроматография.–СПб, 1998.– 610 с.
6. Тутельян В.А., Хавинсон В.Х., Малинин В.В. Физиологическая роль коротких пептидов в питании // Бюл. эксперим. биол. и мед.– 2003.– Т. 135, №1.– С. 4-10.
7. Цуцаева А.А. Глубокий анабиоз и его роль в биологии и медицине // Пробл. криобиологии.– 2001.– №3.– С.93-94.
8. Пат. 64381 А Україна, МПК⁷ А61К35/12. Спосіб отримання екстрактів ксеногенних органів / С.Є. Гальченко, Н.Ю. Шкодовська, Б.П. Сандомирський, В.І. Грищенко. №2003054649. Заявлено 22.05.2003; Опубл. 16.02.2004. Бюл. № 2, Пром. власність.– С. 4.41.
9. Deigin V.I., Poverenny A.M., Semina O.V., Semenets T.N. Reciprocal effect of optical isomerism of EW-dipeptides on immune response // Immunol. Lett.– 1999.– Vol. 67, №1.– P. 41-46.

peptides are participating, in an embryonic development period and in an adult organism are known to occur in a different way. As a result, some regulatory peptides from newborn piglets' organs may be those characteristic for an embryo tissue.

One of the characteristics of physiologically active peptides is their formation in the case of protein molecule necessity of the precursor by proteolysis with participation of various classes' enzymes. This way is more rapid than ribosomal synthesis and enables to react quicker to an organism's needs. The fact that peptides' release out of cryopreserved organs fragments into the extract is higher than of native ones [8] permits the supposition that as a result of negative cryopreservation factors effect on cells the formation mechanism of these peptides is triggered, which promote triggering of reparation and regeneration processes of a certain organ [1].

It is also known that cryopreserved biological material manifests a lower antigenicity than native one [7], so physical and chemical factors affecting the cells during freezing (hyperosmolarity, pH change etc.) promote the release and release into the extract of endogenous antigen peptides (glycopeptides) out of molecules of main histocompatibility complex, the same as when acid treated tissue [2]. Although to confirm the supposition there is needed the further research.

Conclusions

1. Molecular-mass distribution of peptides in aqueous-saline extracts of cryopreserved xenoorgans fragments depends on the type of organ and animal's age. Obtained data should be considered when studying the effect mechanisms of tissue extracts.

2. Chromatography results of tissue extracts could be used for production and standardization of the preparations on its base.

The author acknowledges A.Yu. Semenchenko, Senior Research Fellow of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine for his help during performing this research .

References

1. Galchenko S.E., Belochkina I.V., Tynnyka L.M., Sandomirsky B.P. Effect of pig pancreas and liver extracts on rats with experimental pathologies of corresponding organs // Transplantologia.– 2003.– Vol. 4, N1.– P. 68-70.
2. Kajdashev I.P. Tissue specificity of peptides extracts isolated from different organs and immune regulatory effect of kidneys pepetide extract // Biopolymery i Kletka.– 1995.– Vol.4, N5.– P. 61-74.
3. Kuznik B.I., Morozov V.G., Khavinson V.Kh. Cytomedines: a 25-year's experience of experimental and clinical research.– St-Petersburg: Nauka, 1998.– 310 p.

10. Xu X.C., Howard T., Mohanakumar T. Tissue-specific peptides influence human T-cell repertoire to porcine xenoantigens 1 // Transplantation.– 2001.– Vol. 72, N7.– P. 1205-1212.

Надійшла 23.11.2004

4. Smirnov V.S., Malinin V.V., Ketlinsky S.A. Therapy of secondary immune-deficient states using peptide bioregulators. Immune-deficient states / Edited by Smirnov V.S., Frejdlin I.S.– St-Petersburg: Foliant, 2000.– P. 477-533.
5. Stolyarov B.V., Savinov I.M., Vitenberg A.G., Kartzova A.A. Practical gas and liquid chromatography.– St-Petersburg, 1998.– 610 p.
6. Tutelyan V.A., Khavinson V.Kh., Malinin V.V. Physiological role of short peptides in nutrition//Bulletin of experimental biology and medicine.– 2003.– Vol. 135, N1.– P. 4-10.
7. Tsutsaeva A.A. Deep anabiosis and its role in biology and medicine // Problems of Cryobiology.– 2001.– N3.– P. 93-94.
8. Patent 64381 A Ukraine, TPC A 61K35/12. Method for obtaining extracts from xenogenic organs/ S.E. Galchenko, N.Yu. Shkodovskaya, B.P. Sandomirsky, V.I. Grischenko.– N2003054649. Accepted in 22.05.2003; Issued in 16.02.2004. Bul.N2. Promyslova vlasnist- P.4.41.
9. Deigin V.I., Poverenny A.M., Semina O.V., Semenets T.N. Reciprocal effect of optical isomerism of EW-dipeptides on immune response // Immunol. Lett.– 1999.– Vol. 67, N1.– P. 41-46.
10. Xu X.C., Howard T., Mohanakumar T. Tissue-specific peptides influence human T-cell repertoire to porcine xenoantigens 1 // Transplantation.– 2001.– Vol. 72, N7.– P. 1205-1212.

Accepted in 23.11.2004