

Склад водно-солевих екстрактів кріоконсервованих фрагментів органів свиней

С.Є. Гальченко

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

Composition of Aqueous-Saline Extracts of Cryopreserved Pig Organ Fragments

S.E. GALCHENKO

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

Визначено вплив режимів кріоконсервування фрагментів органів свиней і умов отримання екстрактів на їх склад. Встановлено, що при отриманні водно-солевих екстрактів вихід біологічно активних речовин в розчин з кріоконсервованих фрагментів органів більший, ніж з нативних. Вихід пептидів більший з фрагментів, кріоконсервованих у присутності ПЕО-1500. Оптимальний строк інкубації 60 хв.

Ключові слова: кріоконсервування, фрагменти ксеноорганів, екстракт.

Определено влияние режимов кріоконсервирования фрагментов органов свиней и условий получения экстрактов на их состав. Установлено, что при получении водно-солевых экстрактов выход биологически активных веществ в раствор из кріоконсервированных фрагментов больший, чем из нативных. Выход пептидов более высокий из фрагментов, кріоконсервированных в присутствии ПЭО-1500. Оптимальный срок инкубирования 60 мин.

Ключевые слова: кріоконсервирование, фрагменты ксеноорганов, экстракт.

The author studied the effect of cryopreservation regimes of pig organ fragments and the conditions of obtaining extracts on their composition. It was shown that during obtaining the water-saline extracts the release of biologically active substances into solution was higher in the case of cryopreserved fragments than of native ones. The release of peptides was higher in the case of fragments cryopreserved with PEO-1500. The optimal time of incubation was 60 min.

Key-words: cryopreservation, xenoorgan fragments, extract.

Препарати з біологічного матеріалу знаходять все більше застосування в клінічній практиці. Це пов'язано з тим, що такі препарати високо-ефективні і мають широкий спектр дії [1, 4, 6]. Вони можуть бути у вигляді як клітинних або тканинних трансплантатів, які зберігають свою життєздатність і деякий час функціонують в організмі, так і гомогенату, цитозольної фракції, екстракту і т.д. [2, 3, 9, 10]. Нормалізуючу та регуляторну дію екстрактів пов'язують з наявністю в них біологічно активних речовин, до яких в першу чергу відносять тканинно-специфічні пептиди. Вважається, що основною функцією таких пептидів, скоріше за все, є контроль проліферації, диференціації та елімінації клітин відповідної тканини. При цьому діюче начало представлено не окремими компонентами, а великою кількістю пептидів з різноспрямованою активністю [8, 15]. Відомо також, що такі пептиди є видонеспецифічними і тому можуть знайти використання при розробці препаратів з ксеногенних органів, стимулюючих репараційні процеси при відповідних патологіях [13]. Крім пептидів, в екстрактах містяться такі біологічні речовини, як білки і нуклеотиди, які також можуть прояв-

Biological preparations are gaining increasingly their use in clinical practice. This first of all is referred to the fact that such preparations are highly effective and have a wide spectrum of action [1, 4, 6]. These could be either cell or tissue transplants which are known to keep their viability and function for a certain time in an organism, or homogenate, cytosole fraction, extract etc. [2, 3, 9, 10]. A normalizing and regulatory effect of extracts is related to the presence in them of biologically active substances, which are primarily known as tissue-specific peptides. The principal function of such peptides is thought to be the control of proliferation, differentiation and cell elimination of a corresponding tissue. In this case this affecting start is represented by not separate components, but a great number of peptides with multi-directed activity [8, 15]. These peptides are also known to be non-specific between individual species, and therefore may be used for elaborating the new preparations of xenogenic organs, which stimulate the reparation processes at certain pathologies [13]. Along with peptides such biological substances as proteins and nucleotides are the extract components, which also may manifest their biological activity. While extracting the biologically active substances it is important to achieve the

Адреса для кореспонденції: Гальченко С.Є., Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61015; тел.: +38 (057) 770-29-35, факс: +38 (057) 772-00-84, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

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 57 770 2935, fax: +380 57 772 0084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

ляти біологічну активність. При екстрагуванні біологічно активних речовин важливо досягти максимального виходу цих речовин в екстракт. Попередні дослідження дали підставу вважати, що використання кріобіо-логічних технологій може бути перспективним [11].

Мета цієї роботи – визначення впливу режимів кріоконсервування фрагментів ксеногенних органів і умов отримання екстрактів на їх склад.

Матеріали та методи

Печінку, селезінку і підшлункову залозу статевозрілих свиней подрібнювали на фрагменти масою 3-5 мг і тричі відмивали в 10-кратному об'ємі фізіологічного розчину. Як кріопротектори використовували ДМСО і ПЕО-1500 у кінцевих концентраціях 10 і 20%. Розчини кріопротекторів з подвійною концентрацією додавали крапельно до фрагментів тканини в співвідношенні 1:1. Завись фрагментів розфасовували в пластикові контейнери об'ємом 1 мл і заморожували зі швидкістю 1°C/хв за допомогою програмного заморозувача УОП-6. Відігрівали на водяній бані при 40°C. Від ПЕО-1500 завись фрагментів відмивали фізіологічним розчином, а від ДМСО – розчином цукрози тієї ж молярної концентрації, що і кріопротектор, з подальшою заміною його на фізіологічний розчин.

Екстракти отримували шляхом інкубації фрагментів у фізіологічному розчині в співвідношенні 1:10 при 20-23°C, якщо не вказано інше, потім центрифугували протягом 15 хв при 1500 об/хв і аналізували склад надосаду.

Загальну концентрацію білка в екстрактах визначали методом Лоурі [14], а поліпептидів і нуклеотидів – спектрофотометрично. Для цього білки з екстракту попередньо осаджували центрифугуванням 15 хв при 3000 об/хв після його кип'ятіння на водяній бані впродовж 15 хв [7].

Отримані результати статистично обробляли за методом Стьюдента-Фішера.

Результати та обговорення

Однією з задач, що виникають при одержанні екстрактів, є отримання препарату з максимально можливим вмістом біологічно активних і мінімальним вмістом баластних речовин. У зв'язку з цим ми вивчали концентрацію білка, пептидів і нуклеотидів в водно-солевих екстрактах, які отримували з кріоконсервованих фрагментів селезінки, печінки і підшлункової залози свиней, у залежності від кріопротектора і його концентрації. Як контроль використовували нативні фрагменти.

З наведених в табл. 1 даних видно, що мінімальний вихід білка в розчин спостерігається при

maximum release of these substances into the extract. Previous investigations gave us the reason to consider perspective the cryobiological technologies in terms of this [11].

Determining the effect of cryopreservation regimens upon the fragments of xenogenic organs and the conditions of the extract preparing on their composition was set to be the aim of the work.

Materials and methods

Liver, spleen and pancreas of mature pigs were dissected into 3-5 mg fragments and thrice washed in 10-times' volume of physiological solution. DMSO and PEO-1500 in final concentrations of 10 and 20% were used as cryoprotectants. Cryoprotectant solutions of double concentration were drop-wise added to the tissue fragments in the ratio of 1:1. Suspension of fragments was packed into 1 ml plastic containers and frozen with the rate of 1°C/min using UOP-6 programmable freezer. It was thawed on water bath under the temperature of 40°C. The fragments' suspension was washed-out from PEO-1500 cryoprotectant with physiological solution and from DMSO it was done using the sucrose solution of the same molar concentration as the cryoprotectant, fragments suspension was washed out with physiological solution.

Extracts were obtained by fragments' incubation in physiological solution in the ratio of 1:10 at 20-23°C (if other is not specified), then centrifuged for 15 min at 1500 rot/min and the sediment composition was analyzed.

Total protein concentration in extracts was determined by Lowry method [14], for polypeptides and nucleotides this procedure was performed spectrophotometrically. With this aim the proteins taken from extracts were preliminarily sedimented by centrifugation for 15 min at 3000 rot/min after boiling in water bath for 15 min [7].

Obtained results were statistically processed using Student-Fisher method.

Results and discussion

The task of obtaining the preparation with maximally possible content of biologically active substances and the minimum amount of ballast ones is known to be one of the problems which appear during extracts obtaining. In terms of this we studied the concentration of protein, peptides and nucleotides in aqueous-saline solutions obtained from cryopreserved fragments of pig spleen, liver and pancreas depending on the cryoprotectant and its concentration. Native fragments were used as the control.

As the data of Table 1 demonstrate, the minimum release of protein into solution is observed during incubation of the fragments which have not been frozen. The maximum protein release into cryo-

інкубації фрагментів, які не піддавалися заморожуванню. Максимальний вихід білка в розчин із кріоконсервованих фрагментів спостерігається, якщо заморожування проводилося в присутності 10%-го ДМСО, а мінімальний – 20%-го ПЕО-1500. Це може бути пов'язане з тим, що при використанні як кріопротектора ДМСО життєздатність фрагментів менша, ніж при кріоконсервуванні в присутності ПЕО-1500 [12]. Зменшення життєздатності фрагментів може бути обумовлено пошкодженням плазматичних мембран клітин, що викликає вихід цитоплазматичних білків у розчин. Крім того, ДМСО, як проникаючий кріопротектор, на відміну від ПЕО-1500, можливо модифікує стан і розчинність як міжклітинних білків, так і мембранних і цитозольних. Фізико-хімічні фактори, що впливають на клітини при їх заморожуванні, можуть також модифікувати властивості ліпідного біслою як цитоплазматичних, так і мембранних органел, створюючи умови для виходу білків, які містяться в цих структурах. Додаткове пошкодження клітинних мембран можливе і під час відмивання матеріалу від ДМСО. Спостерігається залежність виходу білка від концентрації кріопротектора. При інкубації фрагментів більше 60 хв концентрація білка в екстракті практично не збільшується.

Динаміка виходу поліпептидів (табл. 2) також свідчить про те, що їх вихід з кріоконсервованого матеріалу в порівнянні з контролем більший. Цей факт може мати значення при розробці підходів щодо збільшення вмісту пептидів в препаратах. Встановлена залежність виходу пептидів може бути викликана тими ж причинами, що і вихід білка з кріоконсервованого матеріалу. Відомо, що більшість регуляторних пептидів утворюється з фізіологічно неактивних білків-попередників за допомогою спеціальних ферментів, протеаз, які в потрібний момент “вирізають” необхідну аміно-

Таблиця 1. Концентрація білка (мг/мл) в екстракті в залежності від часу інкубації фрагментів органів свиней, кріопротектора і його концентрації
Table 1. Protein concentration (mg/ml) in the extract depending on the incubation time of pig organ fragments, cryoprotectant and its concentration

Джерело фрагментів Source of fragments	Кріопротектор Cryoprotectant	Концентрація,% Concentration,%	Час інкубації, хв Incubation time,min		
			30	60	90
Селезінка Spleen	Контроль Control		0,11±0,01	0,17±0,01	0,18±0,02 ¹
	ДМСО DMSO	10	0,35±0,03	0,62±0,05	0,73±0,05 ¹
		20	0,32±0,03	0,56±0,03	0,61±0,05 ^{1,2}
	ПЕО – 1500 PEO – 1500	10	0,26±0,02 ³	0,40±0,02 ³	0,44±0,03 ^{1,3}
		20	0,20±0,02 ³	0,29±0,02 ^{2,3}	0,30±0,03 ^{1,2,3}
	Печінка Liver	Контроль Control		0,23±0,02	0,25±0,02 ¹
ДМСО DMSO		10	0,47±0,03	0,63±0,04	0,72±0,04 ¹
		20	0,33±0,02 ²	0,52±0,04	0,56±0,03 ^{1,2}
ПЕО – 1500 PEO – 1500		10	0,26±0,01 ³	0,31±0,023	0,43±0,03 ³
		20	0,25±0,02 ³	0,31±0,023	0,31±0,02 ^{1,2,3}
Підшлункова залоза Pancreas		Контроль Control		0,36±0,03	0,54±0,03
	ДМСО DMSO	10	0,53±0,03	0,91±0,04	0,98±0,03 ¹
		20	0,42±0,03	0,82±0,04	0,91±0,04 ¹
	ПЕО – 1500 PEO – 1500	10	0,68±0,03 ³	0,76±0,04 ^{1,3}	0,79±0,04 ^{1,3}
		20	0,40±0,02 ²	0,59±0,03 ^{2,3}	0,65±0,04 ^{1,2,3}

Примітки: ¹ – відмінності статистично недостовірні в порівнянні з попереднім строком інкубації, $p > 0,05$; ² – відмінності статистично достовірні в порівнянні з 10%-ю концентрацією кріопротектора, $p < 0,05$; ³ – відмінності статистично достовірні в порівнянні з тією ж концентрацією ДМСО, $p < 0,05$.

Notes: ¹ – differences are not statistically significant comparing to the previous incubation term, $p > 0.05$; ² – differences are statistically significant comparing to 10% cryoprotectant concentration, $p < 0.05$; ³ – differences are statistically significant comparing to the same DMSO concentration, $p < 0.05$.

preserved fragments' solution is observed in the case when freezing is accomplished in the presence of 10% DMSO, and the minimum one is noted when using 20% PEO-1500. This may be related to the fact that when using DMSO as a cryoprotectant the viability of fragments is lower than at cryopreservation in the presence of PEO-1500 [12]. Reduction of the fragments viability may occur due to the impairment of cell plasmatic membranes, that causes a release of cytoplasmatic proteins into solution. Also, DMSO as a penetrating cryo-protectant is thought to modify the state and solubility of both intercellular proteins as well as membrane and cytosole ones, in contrast to PEO-1500. Physical and chemical factors affecting the cells while freezing may also modify the properties of lipid

Таблиця 2. Концентрація пептидів (мкг/мл) в екстракті в залежності від часу інкубації фрагментів органів свиней, кріопротектора і його концентрації
Table 2. Peptides' concentration (µg/ml) in the extract depending on the incubation time of pig organ fragments, cryoprotectant and its concentration

Джерело фрагментів Source of fragments	Кріопротектор Cryoprotectant	Концентрація, % Concentration, %	Час інкубації, хв Incubation time, min		
			30	60	90
Селезінка Spleen	Контроль Control		20,4±1,3	42,7±3,5	51,2±4,1 ¹
	ДМСО DMSO	10	43,8±3,2	68,7±5,1	71,9±5,9 ¹
		20	54,6±4,0	74,6±5,9	74,6±6,1 ¹
	ПЕО – 1500 PEO – 1500	10	56,7±3,9 ³	85,4±6,7 ³	88,2±6,5 ¹
		20	61,0±4,7	92,8±7,4 ³	106,4±7,2 ^{1,2,3}
	Печінка Liver	Контроль Control		16,0±0,9	17,0±1,1
ДМСО DMSO		10	16,8±1,2	29,3±4,4	37,9±2,7 ¹
		20	27,0±1,7 ²	41,7±3,2 ²	53,3±4,9 ^{1,2}
ПЕО – 1500 PEO – 1500		10	36,7±2,6	62,2±4,0 ³	67,3±3,4 ^{1,3}
		20	29,7±2,3	72,2±3,8 ³	71,7±4,7 ^{1,3}
Підшлункова залоза Pancreas		Контроль Control		26,2±2,0	38,3±2,9
	ДМСО DMSO	10	31,3±2,7	51,5±2,4	62,3±3,9
		20	36,8±2,9	61,5±3,5	66,2±3,3 ¹
	ПЕО – 1500 PEO – 1500	10	54,3±3,9	87,3±3,6 ³	97,0±4,0 ^{1,3}
		20	64,7±3,4	97,3±8,7 ³	102,3±7,6 ^{1,3}

Примітки: ¹ – відмінності статистично недостовірні в порівнянні з попереднім строком інкубації, $p > 0,05$; ² – відмінності статистично достовірні в порівнянні з 10%-ю концентрацією кріопротектора, $p < 0,05$; ³ – відмінності статистично достовірні в порівнянні з тією ж концентрацією ДМСО, $p < 0,05$.

Notes: ¹ – differences are not statistically significant comparing to the previous incubation term, $p > 0.05$; ² – differences are statistically significant comparing to 10% cryoprotectant concentration, $p < 0.05$; ³ – differences are statistically significant comparing to the same DMSO concentration, $p < 0.05$.

кислотну послідовність. Іноді з одного попередника з'являється ціла група пептидів, необхідна для успішного пристосування різних систем організму до певних змін навколишнього середовища. Так, з білка проопіомеланокортіна (265 амінокислотних залишків) виникає ціле сімейство коротких пептидів: адреноректоротропний гормон, меланоцитостимулюючі гормони, пептид морфіноподібної дії, пептид-регулятор жирового обміну та ін. Сам білок-попередник не володіє активністю пептидів, які входять до його складу, але при необхідності з нього можна швидко (значно швидше, ніж шляхом рибосомального синтезу) одержати необхідні організму продукти [5]. Можливо, що вплив стресорних факторів, які

aminoacid residues) gives the life to the whole family of short peptides: adreno-corticotropic hormone, melanocyte stimulating hormones, morphine-like effect peptide, peptide-regulator of fat metabolism *etc.* Protein-precursor itself does not possess an activity of peptides the part of which they are, but if necessary it is possible to derive from it very quickly the products essential for an organism (much quicker than by ribosomal synthesis) [5]. Effect of stress factors, which appear during freeze-thawing, as well as cell damage are thought to trigger the mechanism of peptides formation, which are capable of activating the reparation processes, as well as cell proliferation, which under normal conditions is triggered in response to an organ damage.

bilayer of both cytoplasmatic and membrane organellas, by this way making the conditions to release the proteins present in these structures. An extra damage of cell membranes is also possible during the material washing-out of DMSO. There is a dependence of protein release upon the cryoprotectant concentration. During the fragments incubation for more than 60 min the protein concentration in extract was found almost not to increase.

Dynamics of polypeptides release out of a cryopreserved material (Table 2) also proves it to be higher comparing to the control. This fact may be important while elaborating the approaches for peptides content increase in preparations. This established dependence of peptides release may be caused by the same reasons as protein release out of cryopreserved material. The major part of regulatory peptides are known to be formed of physiologically inactive proteins-precursors due to special enzymes, proteases, which by the right moment "are cutting" the amino acid sequence needed. Sometimes one precursor gives the rise to the whole group of peptides, essential for a successful adaptation of various organism systems to the changes in environment. Thus the proteins of pro-opiomelanocortin (265

виникають під час заморожування-відігріву, а також пошкодження клітин включають механізм утворення пептидів, які здатні активізувати репараційні процеси, а також проліферацію клітин, яка в нормальних умовах включається у відповідь на пошкодження органу. Якщо виходити з припущення, що основна біологічна дія таких препаратів обумовлена пептидами, то оптимальними умовами отримання екстрактів можна вважати інкубацію фрагментів органів, кріоконсервованих у присутності 20% ПЕО-1500, впродовж 60 хв. Процедура відмивання від ПЕО-1500 більш проста, ніж від ДМСО, тому що для цього не потрібно використовувати спеціальні (цукрозні) розчини.

Крім того, при такому режимі кріоконсервування вихід нуклеотидів не менший, ніж в інших випадках (табл. 3). Цей факт може мати значення тому, що нуклеотиди відносяться до біологічно активних речовин і це потрібно враховувати при визначенні механізмів дії і спрямованості впливу препаратів.

Спостерігається також залежність концентрації біологічно активних речовин в екстракті від температури, при якій проводилось екстрагування (табл. 4). Вихід усіх речовин в розчин при 4°C значно менший, ніж при 20 і 37°C. Вихід білка в усіх випадках більший, якщо інкубація проводилася при 37°C. Збільшення концентрації нуклеотидів відзначається тільки при інкубації фрагментів печінки. Достовірного збільшення концентрації пептидів не спостерігається.

Висновки

Таким чином, при отриманні водно-сольових екстрактів вихід біологічно активних речовин в розчин з кріоконсервованих фрагментів органів більший, ніж з нативних. Вихід пептидів більш високий з фрагментів, кріоконсервованих у присутності ПЕО-1500, оптимальний строк інкубації 60 хв.

If we refer to the supposition that major biological effect of such preparations is caused by peptides, the optimum conditions for extracts obtaining may be considered the incubation of organ fragments, cryopreserved in the presence of 20% PEO-1500 for 60 min. Procedure of PEO-1500 washing out is much easier than that for DMSO washing-out, we do not need the use of special (sucrose) solutions.

In addition, at such a cryopreservation regimen the nucleotides release is not less than in other cases (Table 3). This fact may be of importance as nucleotides are also related to biologically active substances, and this must be taken into account while determining

Таблиця 3. Концентрація нуклеотидів (мкг/мл) в екстракті в залежності від часу інкубації фрагментів органів свиней, кріопротектора і його концентрації

Table 3. Nucleotides' concentration ($\mu\text{g/ml}$) in the extract depending on the incubation time of pig organ fragments, cryoprotectant and its concentration

Джерело фрагментів Source of fragments	Кріопротектор Cryoprotectant	Концентрація, % Concentration, %	Час інкубації, хв Incubation time, min		
			30	60	90
Селезінка Spleen	Контроль Control		20,4 \pm 2,1	27,6 \pm 1,9	31,8 \pm 2,4 ¹
	ДМСО DMSO	10	38,6 \pm 2,9	42,8 \pm 4,1 ¹	47,6 \pm 3,6 ¹
		20	41,5 \pm 3,0	48,7 \pm 3,6 ¹	52,7 \pm 3,9 ¹
	ПЕО – 1500 PEO – 1500	10	28,9 \pm 2,6 ³	57,3 \pm 3,8 ³	64,9 \pm 5,1 ^{1,3}
		20	51,1 \pm 3,4 ²	79,1 \pm 5,3 ^{2,3}	90,1 \pm 7,2 ^{1,2,3}
	Печінка Liver	Контроль Control		21,2 \pm 2,1	26,5 \pm 2,2 ¹
ДМСО DMSO		10	25,3 \pm 2,2	32,3 \pm 2,8 ¹	34,3 \pm 2,6 ¹
		20	30,8 \pm 2,6	47,2 \pm 3,0 ²	52,3 \pm 3,7 ^{1,2}
ПЕО – 1500 PEO – 1500		10	35,8 \pm 2,8 ³	61,3 \pm 4,1 ³	63,3 \pm 4,3 ^{1,3}
		20	39,3 \pm 2,7 ³	64,8 \pm 4,2 ³	68,2 \pm 3,9 ^{1,3}
Підшлункова залоза Pancreas		Контроль Control		50,3 \pm 2,9	92,8 \pm 6,3
	ДМСО DMSO	10	51,2 \pm 3,3	105,3 \pm 5,0	116,7 \pm 8,3 ¹
		20	53,5 \pm 5,5	112,7 \pm 7,7	120,7 \pm 7,8 ¹
	ПЕО – 1500 PEO – 1500	10	70,8 \pm 5,2 ³	117,2 \pm 8,9	132,5 \pm 7,2 ^{1,3}
		20	90,5 \pm 5,3 ^{2,3}	129,7 \pm 8,4	133,2 \pm 8,2 ¹

Примітки: ¹ – відмінності статистично недостовірні в порівнянні з попереднім строком інкубації, $p > 0,05$; ² – відмінності статистично достовірні в порівнянні з 10%-ю концентрацією кріопротектора, $p < 0,05$; ³ – відмінності статистично достовірні в порівнянні з тією ж концентрацією ДМСО, $p < 0,05$.

Notes: ¹ – differences are not statistically significant comparing to the previous incubation term, $p > 0.05$; ² – differences are statistically significant comparing to 10% cryoprotectant concentration, $p < 0.05$; ³ – differences are statistically significant comparing to the same DMSO concentration, $p < 0.05$.

Таблиця 4. Залежність концентрації біологічно активних речовин від температури. Концентрація ПЕО-1500 – 20%, строк екстракції – 60 хв

Table 4. Concentration dependence of biologically active substances on the extraction temperature. PEO-1500 was used in 20% concentration, extraction time was 60 min

Джерело фрагментів Source of fragments	Речовина Substance	Температура екстракції, °C Extraction temperature, °C		
		4	20	37
Селезінка Spleen	Білок, мг/мл Protein, mg/ml	0,22±0,02*	0,35±0,02	0,50±0,03*
	Пептиди, мкг/мл Peptides, mg/ml	38,0±2,3*	92,0±5,1	100,5±5,4
	Нуклеотиди, мкг/мл Nucleotides, µg/ml	57,0±3,3*	81,5±4,4	88,5±3,6
Печінка Liver	Білок, мг/мл Protein, mg/ml	0,18±0,02*	0,32±0,03	0,46±0,02*
	Пептиди, мкг/мл Peptides, mg/ml	31,5±3,1*	75,2±4,3	87,5±3,8
	Нуклеотиди, мкг/мл Nucleotides, µg/ml	34,0±2,1*	68,2±3,3	84,7±5,5*
Підшлункова залоза Pancreas	Білок, мг/мл Protein, mg/ml	0,39±0,02*	0,69±0,03	0,95±0,07*
	Пептиди, мкг/мл Peptides, mg/ml	43,7±1,6*	94,5±5,3	102,2±5,6
	Нуклеотиди, мкг/мл Nucleotides, µg/ml	51,2±3,5*	137,8±4,7	149,7±7,2

Примітка: * – відмінності статистично достовірні в порівнянні з 20°C, p<0,05

Note: * – statistically significant differences comparing to 20°C, p<0.05

Література

1. Бондаренко Т.П., Легащ Е.И. Криоконсервирование аденокортикальной ткани и ее использование в клинике // Клинич. фармація.– 1999.– Т. 3, №2.– С. 112-115.
2. Бызов В.В., Высеканцев И. П., Гальченко С.Е., Сандомирский Б.П. Опыт применения эндотрахеального введения экстракта криоконсервированных фрагментов ксеноселезенки в комплексном лечении больных с гнойными процессами в легких // Пробл. криобиологии.– 2001.– №3.– С. 87-88.
3. Грищенко В.И., Демин Ю.А., Гончарук Е.И. и др. Характеристика эмбрионального препарата "Гемонейронал" // Пробл. криобиологии.– 2001.– №3.– С. 38.
4. Грищенко В.И., Сандомирский Б.П. Концепция клеточной терапии // Пробл. криобиологии.– 2000.– №1.– С. 3-6.
5. Зилов В.Г., Судаков К.В., Эпштейн О.И. Элементы информационной биологии и медицины.– М., 2000.–248 с.
6. Легащ Е.И. Опыт клинического использования криоконсервированной аденокортикальной ткани // Пробл. криобиологии.– 2000.– №3.– С. 85-90.
7. Методы практической биохимии / Ред. Д. Уильямс, К. Уилсон.– М.: Мир, 1978.– 268 с.
8. Морозов В.Г., Хавинсон В.Х. Пептидные биорегуляторы (25-летний опыт экспериментального и клинического изучения).– СПб.: Наука, 1996.– 74 с.
9. Петренко О.Ю., Мазур С.П., Мойсеева Н.М., Оченашко О.В. Вивчення можливостей використання трансплантації клітин фетальної печінки при лікуванні гострої печінкової недостатності // Трансплантологія.– 2000.– Т. 1, №1.– С. 276-278.

the effect mechanisms and direction of the preparation influence.

There is also the concentration dependence of biologically active substances in extract upon the temperature of extracting (Table 4). Release of all the substances into solution at 4°C is much lower than at 20 and 37°C. The protein release in all cases is higher if the incubation is performed at 37°C. The increase of nucleotide concentration is only noted during liver fragments incubation. No significant increase of peptides concentration is observed.

Conclusions

Thus when obtaining aqueous-saline extracts the release of biologically active substances into solution of cryopreserved organ fragments is higher than that of native ones. The yield of peptides is much higher in the fragments cryopreserved in the PEO-1500 presence, the optimum incubation time was found to be 60 min.

References

1. Bondarenko T.P., Legach E.I. Cryopreservation of adreno-cortical tissue and its use in clinics // Klinichna farmatsia.– 1999.– Vol.3, N2.– P. 112-115.
2. Byzov V.V., Vysekantsev I.P., Galchenko S.E., Sandomirsky B.P. Application experience of the endotracheal introduction of extract of xeno-spleen cryopreserved fragments in the program of combined therapy of the patients with purulent processes in lungs // Problems of Cryobiology.– 2001.– N3.– P. 181-182.
3. Grischenko V.I., Demin Yu.A., Goncharuk E.I. et al. Characteristics of 'Hemoneuronal' embryonic preparation // Problems of Cryobiology.– 2001.– N3.– P. 136.
4. Grischenko V.I., Sandomirsky B.P. The Cell Therapy Concept // Problems of Cryobiology.– 2000.– N1.– P. 3-6.
5. Zilov V.G., Sudakov K.V., Epstein O.I. Elements of informational biology and medicine.– Moscow, 2000.– 248 p.
6. Legach E.I. The experience of cryopreserved adrenocortical tissue clinical use // Problems of Cryobiology.– 2000.– N3.– P. 85-90.
7. *Methods of practical biochemistry* / Eds. D. Williams, C. Wilson.– Moscow: Mir, 1978.– 268 p.
8. Morozov V.G., Khavinson V.Kh. Peptide bioregulators (a 25-year's experience of experimental and clinical study).– St-Petersburgh: Nauka, 1996.– 74 p.
9. Petrenko O.Yu., Mazur S.P., Moiseeva N.M., Ochenashko O.V. Studying the possibilities of fetal liver cell transplantation when treating acute liver insufficiency // Transplantologiya.– 2000.– Vol.1, N1.– P. 276-278.
10. Prokopyuk O.S., Loskutov V.N., Lazurenko V.V., Yurkova O.V. Treatment of vaginal infected wounds in puerperae using placenta preparations // Medicine today and tomorrow.– Kharkov, 1997.– Issue 2.– P. 110-111.
11. Sandomirsky B.P., Byzov V.V., Ivanov L.V., Galchenko S.E. Some biopharmaceutical properties of the extract of

10. Прокопюк О.С., Лоскутов В.Н., Лазуренко В.В., Юркова О.В. Лечение инфицированных ран промежности у родильниц с использованием препаратов плаценты // Медицина сегодня и завтра.– Харьков, 1997.– Вып. 2.– С.110-111.
11. Сандомирский Б.П., Бызов В.В., Иванов Л.В., Гальченко С.Е. Некоторые биофармацевтические свойства экстракта криоконсервированных фрагментов ксеноселезенки // Фармаком.– 2002.– №2.– С. 78-82.
12. Сандомирский Б.П., Гальченко С.Е., Тыныныка Л.Н. Влияние условий криоконсервирования на сохранность фрагментов печени свиней и поросят // Пробл. мед. науки та освіти.– 2003.– №2.– С. 46-48.
13. Хавинсон В.Х. Тканеспецифическое действие пептидов // Бюл. эксперим. биол. и мед.– 2001.– Т. 132, №8.– С. 228-229.
14. Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A. L. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem.– 1951.– Vol. 193.– P. 265-275.
15. 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.
- cryopreserved xenospleen fragments // Farmakom.– 2002.– N2.– P. 78-82.
12. Sandomirsky B.P., Galchenko S.E., Tynynyka L.N. Effect of the cryopreservation conditions on the integrity of pig and piglets' liver fragments // Problemy med. nauki ta osvity.– 2003.– N2.– P.46-48.
13. Khavinson V.Kh. Tissue-specific effect of peptides//Bul. of experimental biology and medicine.– 2001.– Vol.132, N8.– P. 228-229.
14. Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A. L. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem.– 1951.– Vol. 193.– P. 265-275.
15. 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 30.03.2004

Надійшла 30.03.2004