

УДК 612.015.21.019:615.361.41:577.112

Л.А. Рогоза*, І.Г. Беспалова, С.Є. Гальченко, О.Ю. Семенченко, Б.П. Сандомирський

Концентрація пептидів у екстрактах кріоконсервованих фрагментів органів свиней та поросят і роль ендогенних протеаз в їх утворенні

UDC 612.015.21.019:615.361.41:577.112

L.A. Rohoza*, I.G. Bepalova, S.Ye. Galchenko, O.Yu. Semenchenko, B.P. Sandomirsky

Concentration of Peptides in Extracts of Cryopreserved Fragments of Pig and Piglet Organs and Role of Endogenous Proteases in Their Formation

Реферат: Одним із підходів до проблеми корекції порушень функцій організму є створення лікарських засобів на основі біологічно активних пептидів. Нами розроблено метод одержання таких пептидів, який включає в себе процес кріоконсервування фрагментів органів. Досліджено концентрацію пептидів у екстрактах, одержаних із некріоконсервованих та кріоконсервованих фрагментів органів свиней та поросят, залежно від використаного кріопротектора та часу інкубації, а також визначена роль ендогенних протеаз в утворенні пептидів при інкубації фрагментів органів. Встановлено, що після 60-хвилинної інкубації фрагментів серця свиней та поросят, кріоконсервованих із поліетиленоксидом з м.м. 1500 (ПЕО-1500), концентрація пептидів у супернатанті значущо більша, ніж у супернатанті при інкубації контрольних та кріоконсервованих із гліцерином або ПЕО-400. Вихід пептидів у супернатант із фрагментів селезінки свиней та шкіри поросят, кріоконсервованих із ПЕО-400 чи ПЕО-1500, більший, ніж із некріоконсервованих або кріоконсервованих під захистом гліцерину. Після інкубації як контрольних, так і кріоконсервованих (кріопротектор ПЕО-1500) у присутності інгібіторів протеаз фрагментів органів, концентрація пептидів у супернатанті значущо менша, ніж без їх додавання. Встановлено, що при додаванні інгібіторів протеаз зменшується кількість низькомолекулярних пептидів в екстрактах.

Ключові слова: фрагменти органів, кріоконсервування, екстракт, пептиди, інгібітори протеаз.

Реферат: Одним из подходов к проблеме коррекции нарушений функций организма является создание лекарственных средств на основе биологически активных пептидов. Нами разработан метод получения таких пептидов, который включает в себя процесс кріоконсервирования фрагментов органов. Исследована концентрация пептидов в экстрактах, полученных из некріоконсервированных и кріоконсервированных фрагментов органов свиней и поросят, в зависимости от использованного кріопротектора и времени инкубации, а также определена роль эндогенных протеаз в образовании пептидов при инкубации фрагментов органов. Установлено, что после 60-минутной инкубации фрагментов сердца свиней и поросят, кріоконсервированных с полиэтиленоксидом с м.м. 1500 (ПЭО-1500), концентрация пептидов в супернатанте значимо больше, чем в супернатанте после инкубации контрольных и кріоконсервированных с глицерином или ПЭО-400. Выход пептидов в супернатант из фрагментов селезенки свиней и кожи поросят, кріоконсервированных с ПЭО-400 или ПЭО-1500, больше, чем из некріоконсервированных или кріоконсервированных под защитой глицерина. После инкубации как контрольных, так и кріоконсервированных (кріопротектор ПЭО-1500) в присутствии ингибиторов протеаз фрагментов органов, концентрация пептидов в супернатанте значимо меньше, чем без их добавления. Установлено, что при добавлении ингибиторов протеаз уменьшается количество низкомолекулярных пептидов в экстрактах.

Ключевые слова: фрагменты органов, кріоконсервирование, экстракт, пептиды, ингибиторы протеаз.

Abstract: Production of medicines based on bioactive peptides is one of the approaches of correcting body dysfunctions. We have developed the method to procure these peptides, which includes cryopreservation of organ fragments. The concentration of peptides in the extracts obtained from non-cryopreserved and cryopreserved fragments of pig and piglet organs was investigated, depending on the used cryoprotectant and incubation period. The role of endogenous proteases in formation of peptides during incubation of organ fragments was discovered. It was found that after 60-min incubation of heart fragments of pigs and piglets, cryopreserved with polyethylene oxide with MW of 1500 (PEO-1500), the peptide concentration in supernatant was significantly higher than after incubation of those of control and cryopreserved with either glycerol or PEO-400. Yield of peptides into supernatant from fragments of pig spleen and piglet skin, cryopreserved with PEO-400 or PEO-1500 was higher than that from non-cryopreserved or cryopreserved under protection of glycerol ones. Following incubation of both control and cryopreserved (cryoprotectant PEO-1500) fragments of organs with protease inhibitors, the peptide concentration in the supernatant was significantly lower than without their addition. It has been found that after introduction of protease inhibitors the amount of low molecular peptides in extracts decreased.

Key words: fragments of organs, cryopreservation, extract, peptides, protease inhibitors.

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

*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:

вул. Переяславская, 23, м. Харків, Україна 61015;
тел.: (+38 057) 373-74-35, факс: (+38 057) 373-30-84,
електронна пошта: cryo@online.kharkov.ua

Надійшла 11.02.2014

Прийнята до друку 27.02.2014

Проблеми кріобіології і кріомедицини. – 2014. – Т. 24, №2. – С. 132–139.
© 2014 Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України

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

*To whom correspondence should be addressed:

23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015;
tel.: +380 57 3737435, fax: +380 57 373 3084,
e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Received February 11, 2014

Accepted February 27, 2014

Probl. Cryobiol. Cryomed. 2014. 24(2): 132–139.

© 2014 Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

За останні роки накопичено значну кількість даних, які свідчать про важливу роль низькомолекулярних пептидів у процесах регуляції гомеостазу. Новим, патогенетично обумовленим, підходом до вирішення проблеми корекції порушень функцій організму є створення лікарських засобів на основі біологічно активних речовин, зокрема низькомолекулярних пептидів [3, 5, 11], які здійснюють перенесення інформації, необхідної для нормального функціонування, розвитку та взаємодії клітинних популяцій, а також беруть участь у регуляції фізіологічної та репаративної регенерації. Встановлено, що для регуляторних пептидів характерна виражена тканиноспецифічність, тобто здатність до відновлення функції тих органів і тканин, з яких вони отримані. Однак цим речовинам не притаманна видоспецифічність, тому створені на їхній основі препарати не мають антигенних властивостей та асоційованих із ними побічних ефектів [11, 13].

Найбільш поширений підхід до одержання речовин пептидної природи полягає в тому, що тканину подрібнюють і поміщають в ацетон, який потім видаляють. Далі її висушують та обробляють розчином трихлороцтової кислоти у присутності хлоридів цинку, магнію і кальцію. Екстракцію проводять протягом 72 годин при безперервному перемішуванні, далі видаляють осад. Отриманий супернатант відмивають охолодженою сумішшю ефіру та ацетону, розчиняють у підкисленій дистильованій воді й відсепаровують матеріал із м. м. менше 10000 [14]. Можливими модифікаціями методу є заморожування матеріалу, використання сильнішої, ніж трихлороцтова, кислоти та ін. [4, 15].

Розроблений нами підхід полягає в одержанні водно-сольових екстрактів із кріоконсервованих фрагментів органів. Показано високу біологічну активність таких екстрактів, зокрема фрагментів селезінки свиней, печінки та підшлункової залози новонароджених поросят [2].

Мета роботи – дослідити концентрацію пептидів у екстрактах некріоконсервованих та кріоконсервованих фрагментів органів свиней і поросят залежно від використаного кріопротектора та часу інкубації, а також визначити роль ендогенних протеаз в утворенні пептидів при інкубації фрагментів органів.

Матеріали та методи

Експерименти проводили за регламентом, затвердженим Комітетом з біоетики Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (м. Харків). Органи (серце та селезінка статевозрілих свиней, серце та шкіра новонароджених поросят) подрібнювали ножицями на фрагменти, маса яких в середньому становила 2–5 мг, і тричі відмивали фізіологічним розчином у співвідношенні 1:10.

Large amount of data has been accumulated recently testifying to an important role of low molecular peptides in homeostasis regulation. Production of medicines based on bioactive substances such as low molecular peptides [4, 6, 17] is a new pathogenetically stipulated approach to solve the problem for correcting dysfunctions of an organism. These peptides transfer an information required for proper functioning, development and interaction of cell populations, they take part in the regulation of physiological and reparative regeneration as well. It has been established that the regulatory peptides are characterized by expressed tissue-specificity, *i. e.* the ability to restore the functions of organs and tissues from which they are derived. However, species-specificity is not inherent for these substances, therefore the preparations developed on their base have no antigenic properties and side effects associated with them [6, 14].

The most common approach to obtain substances of peptide nature is that the tissue is fragmented and placed into acetone, which is removed later. Then it is dried and treated with a solution of trichloroacetic acid with zinc, magnesium, and calcium chlorides. Extraction is carried out for 72 hours with continuous agitation; the sediment is removed later. The obtained supernatant is washed with cooled mixture of ether and acetone, dissolved in acidated distilled water and the substances of MW below 10,000 are separated [10]. Possible modifications of the method are the freezing of material, the use of stronger acid than trichloroacetic one *etc.* [5, 9].

The approach developed by us is to obtain aqueous-saline extracts from cryopreserved fragments of organs. There was shown a high biological activity of these extracts, including fragments of pig spleen, liver and pancreas of newborn piglets [3].

The research aim is to study the concentration of peptides in extracts of non-cryopreserved and cryopreserved fragments of pig and piglet organs depending on used cryoprotectant and incubation period, as well as to determine the role of endogenous proteases in formation of peptides during incubation of organ fragments.

Materials and methods

The experiments were performed according to the regulations, approved by the Bioethics Committee at the IPC&C of the NAS of Ukraine (Kharkiv). Organs (heart and spleen of mature pigs, heart and skin of newborn piglets) were cut with scissors into 2–5 mg fragments and thrice washed with physiological solution in the ratio of 1:10.

Organ fragments were dropwise supplemented with 20% cryoprotectant solution (glycerol, PEO-400 or PEO-1500) in 1:1 ratio and carefully mixed. The suspension of fragments of 20 ml was packed into

До фрагментів органів по краплях додавали 20%-й розчин кріопротектора (гліцерин, ПЕО-400 або ПЕО-1500) у співвідношенні 1:1, ретельно і обережно перемішуючи. Завись фрагментів об'ємом 20 мл розфасовували в поліетиленові ампули і заморожували зі швидкістю охолодження 1 град/хв за допомогою програмного заморожувача УОП-6 (СКТБ з ДВ ІПКіК НАН України) до -70°C із подальшим перенесенням у рідкий азот. Матеріал відігрівали на водяній бані за температури $37\text{...}40^{\circ}\text{C}$. Від гліцерину та ПЕО-400 фрагменти відмивали сахарозними середовищами з такою ж молярною концентрацією, як і кінцева концентрація кріопротектора, а від ПЕО-1500 – фізіологічним розчином. Як контроль використовували некріоконсервовані фрагменти.

Для одержання екстрактів фрагменти органів інкубували в фізіологічному розчині 30, 60 або 90 хв за температури $22\text{...}24^{\circ}\text{C}$. Для видалення термолабільних протеїнів супернатант прогрівали на водяній бані 15 хв і очищували, пропускаючи через фільтрувальний папір. Концентрацію пептидів визначали при довжині хвилі 280 нм на спектрофотометрі «Lambda 35» («Perkin Elmer», США) [10].

Для інгібування протеаз під час приготування екстрактів застосовували готову до використання суміш інгібіторів «Protease Inhibitor Cocktail» («Sigma-Aldrich», США), яку додавали до фрагментів із розрахунку 1 мл на 20 г тканини відповідно до рекомендації виробника.

Молекулярно-масовий розподіл низькомолекулярних фракцій пептидної природи визначали методом високоефективної гельпроникної хроматографії [1]. Попередньо екстракти пропускали через фільтр («Millipore», США) з діаметром пор 0,45 мкм. Гель-фільтрацію проводили на колонці діаметром 16 мм та довжиною 400 мм, заповненій полівініловим гелем «TSKGel Toyopearl HW-40 Fine» («Toyo Soda Manufacturing Co», Японія). Для елюації використовували фосфатно-сольовий буфер (pH 7,5) такого складу: 30 ммоль/л $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$; 100 ммоль/л NaCl. Хроматограми реєстрували за допомогою ультрафіолетового детектора «LKB-2238 Uvicord S11» («LKB-Produkter AB», Швеція) при довжині хвилі 254 нм. Сигнал детектора записували за допомогою двоканального самописного потенціометра «LKB-2210 Rekorder» («LKB-Produkter AB») та інтегратора «Waters-746» («Millipore»), який надає дані про час утримання та кількісні співвідношення окремих фракцій у суміші (у процентах). Попередньо колонку калібрували стандартними речовинами: інсуліном, глюкагоном, соматостатином та вітамінами B_2 і B_{12} .

Статистичну обробку результатів проводили непараметричним методом MANOVA за допомо-

polyethylene tubes and frozen with the cooling rate of 1 deg/min with a programmable freezer UOP-6 (Special Designing and Technical Bureau with Experimental Unit of the IPC&C) down to -70°C with the following plunging into liquid nitrogen. The specimens were thawed in water bath at $37\text{...}40^{\circ}\text{C}$. The fragments were washed free of glycerol and PEO-400 with sucrose media with the same molar concentration, as final concentration of cryoprotectant and with physiological solution in case of PEO-1500. Non-cryopreserved fragments served as the control.

To obtain extracts, the fragments of organs were incubated with physiological solution for 30, 60 and 90 min at $22\text{...}24^{\circ}\text{C}$. Supernatant was warmed in water bath for 15 min and passed through the filter paper to remove thermolabile proteins. Concentration of peptides was spectrophotometrically assessed at 280 nm with Lambda 35 (Perkin Elmer, USA) [15].

To inhibit proteases during preparation of extracts the Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich, USA) was supplemented to the fragments in an amount of 1 ml per 20 g of tissue according to manufacturer's recommendations.

For determining the molecular-mass distribution of low molecular fractions of peptide origin the high-efficiency gel-penetrating chromatography was used [1]. Primarily the extracts were passed through a filter (Millipore, USA) with a pore diameter of 0.45 μm . Gel filtration was performed in a column of 16 mm diameter and length of 400 mm, filled with polyvinyl gel TSKGel Toyopearl HW-40 Fine (Toyo Soda Manufacturing Co, Japan). For elution the following phosphate-saline buffer (pH 7.5) was used: 30 mmol/l $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$; 100 mmol/l NaCl. Chromatograms were recorded with ultraviolet detector LKB-2238 Uvicord S11 (LKB-Produkter AB, Sweden) at 254 nm. The detector signal was recorded with two-channel potentiometer LKB-2210 Rekorder (LKB-Produkter AB) and Waters-746 integrator (Millipore), which provided the data on hold-up time and quantitative ratio of individual fractions in the mixture (in percentage). The column was preliminary calibrated with the standard substances: insulin, glucagon, somatostatin, vitamins B_2 and B_{12} .

The results were statistically processed with MANOVA non-parametric method using Statistics 17.0 software (SPSS Inc., USA). The data were presented as mean value \pm error of mean.

Results and discussion

The concentration of peptides in extracts derived from cryopreserved fragments of organs was studied depending on the used cryoprotectant: penetrating glycerol, less penetrating (if compared with glycerol) PEO-400 and non-penetrating PEO-1500. Non-cryopreserved fragments served as the control.



гою програми «Statistics 17.0» («SPSS Inc.»), США). Дані представлені як середнє значення \pm похибка середнього.

Результати та обговорення

Концентрацію пептидів у екстрактах, які одержували з кріоконсервованих фрагментів органів, вивчали залежно від використаного кріопротектора: проникаючий гліцерин, повільно (у порівнянні з гліцерином) проникаючий ПЕО-400 та непроникаючий ПЕО-1500. Контролем були некріоконсервовані фрагменти.

Як видно з даних табл. 1, вже на 30 хв інкубації кріоконсервованих фрагментів органів концентрація пептидів у супернатанті була статистично значуще більшою порівняно з контролем, за винятком фрагментів серця свиней, серця і шкіри поросят, кріоконсервованих у присутності гліцерину. Після інкубації протягом 60 хв концентрація пептидів збільшувалася у всіх випадках, крім фрагментів серця свиней, кріоконсервованих під захистом гліцерину. Після 60-хвилинної інкубації фрагментів серця свиней та поросят концентрація пептидів у супернатанті була статистично значуще більшою, ніж при інкубації контрольних фрагментів та кріоконсервованих із використанням гліцерину або ПЕО-400. Вихід пептидів із фрагментів селезінки свиней та шкіри поросят, кріоконсервованих із ПЕО-1500, також був більший, ніж із некріоконсервованих або кріоконсервованих під захистом гліцерину. Не спостерігалось відмінностей у концентрації пептидів при інкубації фрагментів, кріоконсервованих у присутності ПЕО-400 та ПЕО-1500. При цьому статистично значуще збільшувалася концентрація пептидів порівняно з 30-хвилинною інкубацією. Після 90-хвилинної інкубації збільшення концентрації пептидів не спостерігалось в жодному з випадків порівняно з попереднім строком інкубації. Тому в подальшому ми досліджували екстракти фрагментів органів, кріоконсервованих з ПЕО-1500, при інкубації протягом 60 хв.

Відомо, що продукція пептидів клітинами в культурі за відсутності в середовищі поживних речовин і поява пептидного матеріалу в культуральній

Table 1 shows that already after 30 min incubation of cryopreserved fragments of organs the concentration of peptides in supernatant was significantly higher in comparison with the control except the fragments of pig heart, piglet heart and skin cryopreserved with glycerol. After 60 min incubation the concentration of

Таблиця 1. Концентрація пептидів (мкг/мл) у супернатанті залежно від кріопротектора та часу інкубації контрольних і кріоконсервованих фрагментів органів

Table 1. Concentration of peptides ($\mu\text{g/ml}$) in supernatant depending on cryoprotectant and incubation period of control and cryopreserved fragments of organs

Орган Organ	Кріопротектор Cryoprotectant	Час інкубації, хв Incubation period, min		
		30	60	90
Серце свиней Pig heart	Контроль Control	19,0 \pm 1,2	22,3 \pm 2,1	25,7 \pm 2,2
	Гліцерин Glycerol	20,4 \pm 2,0	32,7 \pm 3,3	45,8 \pm 4,3
	ПЕО-400 PEO-400	33,2 \pm 3,4 ²	79,9 \pm 5,6 ^{1,2}	86,3 \pm 8,8 ²
	ПЕО-1500 PEO-1500	56,8 \pm 4,6 ^{2,3}	117,1 \pm 9,9 ^{1,2,3}	129,6 \pm 11,2 ^{2,3}
Серце поросят Piglet heart	Контроль Control	28,8 \pm 2,2	37,6 \pm 2,4	49,5 \pm 4,5
	Гліцерин Glycerol	33,8 \pm 3,3	55,4 \pm 4,5 ¹	66,4 \pm 5,4
	ПЕО-400 PEO-400	42,4 \pm 3,7 ²	88,2 \pm 7,6 ^{1,2}	92,6 \pm 8,2 ²
	ПЕО-1500 PEO-1500	79,1 \pm 6,5 ^{2,3}	128,3 \pm 10,9 ^{1,2,3}	131,0 \pm 11,7 ^{2,3}
Селезінка свиней Pig spleen	Контроль Control	18,1 \pm 1,2	42,7 \pm 3,5 ¹	54,4 \pm 4,9
	Гліцерин Glycerol	27,4 \pm 2,3	60,6 \pm 5,1 ¹	66,5 \pm 6,1
	ПЕО-400 PEO-400	34,5 \pm 3,2	71,6 \pm 6,8 ¹	91,3 \pm 7,2 ²
	ПЕО-1500 PEO-1500	39,4 \pm 3,3 ²	92,8 \pm 7,4 ^{1,2}	111,6 \pm 9,8 ²
Шкіра поросят Piglet skin	Контроль Control	10,8 \pm 1,2	25,4 \pm 2,1 ¹	29,5 \pm 2,2
	Гліцерин Glycerol	13,6 \pm 1,1	30,6 \pm 2,5 ¹	44,2 \pm 3,8
	ПЕО-400 PEO-400	20,8 \pm 1,7 ²	42,3 \pm 3,7 ¹	54,7 \pm 4,6
	ПЕО-1500 PEO-1500	29,5 \pm 2,4 ^{2,3}	55,2 \pm 4,5 ^{1,2}	66,9 \pm 6,1 ²

Примітки: відмінності статистично значущі в порівнянні ¹ – з попереднім строком інкубації, $p < 0,05$; ² – з таким самим часом інкубації фрагментів, кріоконсервованих із гліцерином, $p < 0,05$; ³ – з таким самим часом інкубації фрагментів, кріоконсервованих із ПЕО-400, $p < 0,05$.

Note: differences are statistically significant if compared with ¹ – the previous incubation period, $p < 0.05$; ² – the same incubation period of fragments cryopreserved with glycerol, $p < 0.05$; ³ – the same incubation period of fragments cryopreserved with PEO-400, $p < 0.05$.



рідині відбуваються через 5–10 хв після початку інкубації та досягає максимуму через 90–120 хв [5]. За аналогією до утворення біологічно активних фрагментів гемоглобіну [6] можна припустити, що й інші внутрішньоклітинні функціональні білки залучені до подібних процесів поетапної деградації. В результаті утворюються короткі фрагменти, які потім виводяться з клітин. Аналіз структур пептидів цитохром-с-оксидази, глутамат-амоній лігази, гліцеральдегідфосфатдегідрогенази або *p*-актину, ідентифікованих у препаратах тканин великої рогатої худоби і шурів, вказує на описані вище принципи утворення пептидів. Було встановлено, що переважна частина пептидів, локалізованих всередині клітин, має здатність пригнічувати проліферацію, у той час як більшість пептидів, які виділяються у навколишнє середовище, навпаки, її стимулюють. Результати порівняння активності компонентів супернатантів і лізатів переживаючих клітинних культур також свідчать про різноспрямованість регуляторної дії відповідних пептидних пулів [5].

Виділення пептидів у позаклітинне середовище – універсальний механізм, що сформувався ще у одноклітинних організмів, для яких характерна реакція хемотаксису, і протягом наступної еволюції зберігся в удосконаленому вигляді в якості позитивного та необхідного функціонального набутку. У клітинних ансамблях вищих тварин ендогенна пептидна система ефективно регулює та модулює функції пристосування організму до умов існування [3, 7].

Протеоліз – ферментативний гідроліз білків і пептидів, який каталізується протеолітичними ферментами (протеазами) і відіграє важливу роль у регуляції обміну речовин в організмі [9, 16]. Обмежений протеоліз білкових молекул має першорядне значення для регуляції обміну речовин в організмі [8, 12, 17]. Реакції обмеженого протеолізу беруть участь у процесах утворення та інактивації практично всіх ферментів, гормонів та інших біологічно активних білків і пептидів, а отже, й у контролі активності основних біорегуляторів. Тому ми провели дослідження з метою з'ясування ролі протеаз в утворенні пептидів, які рееструються в екстрактах.

При інкубації як контрольних, так і кріоконсервованих (кріопротектор ПЕО-1500) у присутності інгібіторів протеаз (ІП) фрагментів органів, концентрація пептидів у супернатанті статистично значуще менша, ніж коли інкубація проводилася без їх додавання (табл. 2). Це свідчить про значну роль ендогенних протеаз в утворенні пептидів. Зокрема, вони можуть контролювано активуватися у відповідь на стресорну дію фізико-хімічних факторів, які впливають на клітини при заморожуванні-відігріві, оскільки вихід пептидів із контрольних фрагментів при додаванні ІП після 60 хв інкубації не збільшується, за винятком фрагментів шкіри поросят.

peptides increased in all the cases except the fragments of pig heart cryopreserved under protection of glycerol. After 60 min incubation of pig and piglet heart fragments the concentration of peptides in supernatant was significantly higher than after incubation of the control fragments and those cryopreserved with glycerol and PEO-400. Yield of peptides from the fragments of pig spleen and piglet skin cryopreserved with PEO-1500 was also higher than from non-cryopreserved fragments or cryopreserved under protection of glycerol. There were no differences in peptide concentration after incubation of fragments cryopreserved with PEO-400 and PEO-1500. Herewith, the peptide concentration significantly increased if compared with 30 min incubation. After 90 min incubation there was no increase of peptides concentration in any cases if compared with the previous incubation period. Therefore, later we used 60 min incubation to investigate the extracts of organ fragments cryopreserved with PEO-1500.

It has been known that the production of peptides by cells in culture without nutrients in the medium and the appearance of peptide substances in culture medium are observed 5–10 min later the start of incubation and reach a maximum after 90–120 min [4]. Considering the similar formation of biologically active fragments of hemoglobin [7] we can assume that other intracellular functional proteins are involved in such processes of stepwise degradation. Short fragments are formed as the result and excreted from the cells later. Structural analysis of peptides of cytochrome-*c*-oxidase, glutamate-ammonia ligase, glyceraldehyde phosphate dehydrogenase or *p*-actin identified in tissue preparations of cattle and rats confirmed the above principles of peptides formation. It was found that the majority of peptides localized inside the cells had the ability to inhibit proliferation while greater part of peptides released to external medium on the contrary stimulated proliferation. Comparing of the activity of components of supernatants and lysates of survival cell cultures also testified to different targeting of regulatory effect of relevant peptide pools [4].

Yield of peptides into extracellular environment is an universal mechanism formed even in unicellular organisms which characteristic is a chemotactic response and following evolution was preserved in an improved form as a positive and necessary acquired function. The endogenous peptide system in cell assemblies of higher animals effectively regulates and modulates the functions of organism adaptation to the existence conditions [11, 17].

Proteolysis is an enzymatic hydrolysis of proteins and peptides which is catalyzed by proteolytic enzymes (proteases) and plays an important role in regulating metabolism of an organism [8, 13]. Limited proteolysis of protein molecules is of great importance for the regulation of metabolism in an organism [2, 12, 16]. Reactions of limited proteolysis are involved in the



Таблиця 2. Концентрація пептидів (мкг/мл) у супернатанті після додавання інгібіторів до фрагментів органів, не підданих кріоконсервуванню та кріоконсервованих у присутності ПЕО-1500

Table 2. Concentration of peptides ($\mu\text{g/ml}$) in supernatant after introduction of protease inhibitors to organ fragments either non-cryopreserved or cryopreserved in presence of PEO-1500

Орган Organ	Умови експерименту Experimental conditions	Час інкубації, хв Incubation period, min		
		30	60	90
Серце свиней Pig heart	Контроль Control	17,2 ± 1,4	24,8 ± 1,6*	28,4 ± 2,2
	Контроль + ІП Control + PI	10,4 ± 0,9	14,6 ± 1,5	18,5 ± 1,4
	Кріоконсервовані фрагменти Cryopreserved fragments	52,1 ± 4,5	106,4 ± 10,9*	121,6 ± 9,6
	Кріоконсервовані фрагменти + ІП Cryopreserved fragments + PI	24,6 ± 1,9	57,2 ± 4,4*	73,3 ± 6,5
Серце поросят Piglet heart	Контроль Control	30,1 ± 2,3	48,4 ± 3,8*	55,8 ± 4,6
	Контроль + ІП Control + PI	14,6 ± 1,1	19,6 ± 1,8	27,8 ± 3,1
	Кріоконсервовані фрагменти Cryopreserved fragments	72,1 ± 6,2	111,5 ± 9,9*	131,5 ± 11,5
	Кріоконсервовані фрагменти + ІП Cryopreserved fragments + PI	48,4 ± 4,4	66,7 ± 5,6*	79,9 ± 7,9
Селезінка свиней Pig spleen	Контроль Control	23,2 ± 1,8	45,8 ± 3,2*	55,2 ± 5,4
	Контроль + ІП Control + PI	13,2 ± 1,1	15,9 ± 1,2	20,3 ± 1,9
	Кріоконсервовані фрагменти Cryopreserved fragments	61,3 ± 4,9	92,7 ± 7,9*	101,3 ± 9,8
	Кріоконсервовані фрагменти + ІП Cryopreserved fragments + PI	33,1 ± 2,8	46,4 ± 4,0	55,8 ± 5,3
Шкіра поросят Piglet skin	Контроль Control	21,2 ± 1,9	39,9 ± 3,1*	44,5 ± 3,8
	Контроль + ІП Control + PI	6,7 ± 0,5	11,2 ± 0,9*	13,4 ± 1,1
	Кріоконсервовані фрагменти Cryopreserved fragments	32,1 ± 2,8	49,8 ± 3,9*	59,3 ± 4,6
	Кріоконсервовані фрагменти + ІП Cryopreserved fragments + PI	12,3 ± 1,1	22,4 ± 2,0*	29,2 ± 2,1

Примітки: * – відмінності статистично значущі в порівнянні з попереднім часом інкубації; відмінності статистично значущі в порівнянні з фрагментами без додавання ІП при всіх умовах експерименту, $p < 0,05$.

Note: * – differences are statistically significant if compared with the previous incubation period; differences are statistically significant if compared with the fragments with no addition of PI at all the experimental conditions, $p < 0.05$.

formation and inactivation of all the enzymes, hormones and other biologically active proteins and peptides and thereby in the control of activity of the main bioregulators. Therefore we performed a study to determine the role of proteases in formation of peptides revealed in the extracts.

Incubation of both control and cryopreserved (with cryoprotectant PEO-1500) fragments of organs with protease inhibitors (PI) resulted in significantly lower peptide concentration revealed in the supernatant if compared with their absence (Table 2). It testified to a significant role of endogenous proteases in peptides formation. In particular, they can be triggered by stressor action of physical and chemical factors that affect the cells during freeze-thawing, whereas no increase of peptides yield from the control fragments was found following supplementing PI after 60 min incubation, excluding the case of piglet skin fragments.

The increase of peptides concentration to 60 min (with some exceptions) may be due to the fact that either used PI do not inhibit all the proteases or there is a yield of the peptides being already in the cells. It is also possible that during cryopreservation the activity of proteases in cells increases. It has been known that during transition of an organism from one physiological state to another and as a result of starvation or some stressor responses the proteolysis of tissue proteins is sharply enhanced [12, 13].

Assessment of peptides content within different molecular weight ranges revealed that the extract of piglet heart fragments had no peptides with $MW < 1100$, unlike other organs (Table 3). The extracts of cryopreserved pig heart fragments had no peptides with $MW > 2000$, but small amount of them was found in control extracts and after supplementing PI to the control and cryopreserved pig heart fragments. This may be due to activation of proteases in cryopreserved fragments. A similar dependence in peptides concentration was observed

Підвищення концентрації пептидів на 60 хв (за деяким виключенням) може бути пов'язане або з тим, що використані ІІ інгібують не всі протеази, або з виходом пептидів, які вже існують у клітинах. Можливо також, що в процесі кріоконсервування збільшується активність протеаз у клітинах. Відомо, що при переході організму з одного фізіологічного стану в інший, а також в результаті голодування та деяких стресорних реакцій різко посилюється протеоліз тканинних білків [8, 9].

Під час дослідження вмісту пептидів у різних діапазонах молекулярних мас встановлено, що в екстрактах фрагментів серця поросят, на відміну від інших органів, відсутні пептиди з м. м. < 1100 (табл. 3). У екстрактах кріоконсервованих фрагментів серця свиней не детектуються пептиди з м. м. > 2000, але визначається їх невелика кількість в екстрактах контрольних, а також при додаванні ІІ до контрольних і кріоконсервованих фрагментів серця свиней. Це може бути пов'язано з активацією протеаз у кріоконсервованих фрагментах. Аналогічна залежність концентрації пептидів спостерігається і при інкубації фрагментів селезінки свиней. Можна також відмітити, що при інкубації фрагментів досліджених органів у присутності ІІ зменшується кількість низькомолекулярних пептидів.

Висновки

Після 60-хвилинної інкубації фрагментів серця свиней та поросят кріоконсервованих із ПЕО-1500 концентрація пептидів у супернатанті статистично значимо більша, ніж у супернатанті після інкубації контрольних та кріоконсервованих із гліцерином чи ПЕО-400. Вихід пептидів у супернатанті із фрагментів селезінки свиней та шкіри поросят, кріокон-

Таблиця 3. Вміст пептидів (%) у різних діапазонах молекулярних мас у супернатанті після додавання інгібіторів до фрагментів органів, не підданих кріоконсервуванню та кріоконсервованих у присутності ПЕО-1500

Table 3. Content of peptides (%) in various ranges of molecular weight in supernatant after introduction of protease inhibitors to fragments either non-cryopreserved or cryopreserved in presence of PEO-1500

Орган Organ	Діапазон молекулярних мас Range of molecular weight	Умови експерименту Experimental conditions			
		Контроль Control	Контроль + ІІ Control + PI	Кріоконсервовані фрагменти Cryopreserved fragments	Кріоконсервовані фрагменти + ІІ Cryopreserved fragments + PI
Серце свиней Pig heart	> 10000	-	-	-	-
	> 2000-7000	0,6 ± 0,1	1,7 ± 0,2	-	0,8 ± 0,1
	> 1100-2000	64,5 ± 5,1	72,4 ± 6,9	52,3 ± 4,9	68,4 ± 6,1
	< 1100	34,9 ± 2,8	24,9 ± 2,3	47,7 ± 4,7	31,6 ± 2,8
Серце поросят Piglet heart	> 10000	6,2 ± 0,4	12,6 ± 1,3	3,3 ± 0,2	9,4 ± 0,7
	> 2000-7000	50,3 ± 4,1	57,7 ± 4,9	40,4 ± 3,6	67,0 ± 6,4
	> 1100-2000	43,5 ± 3,9	30,7 ± 3,0	56,3 ± 5,1	22,8 ± 2,3
	< 1100	-	-	-	-
Селезінка свиней Pig spleen	> 10000	30,2 ± 2,2	41,2 ± 4,0	23,1 ± 2,0	39,1 ± 3,6
	> 2000-7000	3,4 ± 2,8	1,8 ± 0,1	-	0,9 ± 0,1
	> 1100-2000	26,0 ± 2,3	41,1 ± 3,5	22,5 ± 2,1	37,4 ± 3,2
	< 1100	40,4 ± 3,6	15,9 ± 1,2	54,3 ± 5,3	22,6 ± 2,2
Шкіра поросят Piglet skin	> 10000	49,4 ± 4,1	53,2 ± 5,3	37,2 ± 3,2	50,3 ± 5,7
	> 2000-7000	19,4 ± 1,4	33,1 ± 3,2	19,5 ± 1,6	27,9 ± 2,4
	> 1100-2000	10,8 ± 1,0	6,2 ± 0,5	14,6 ± 1,2	9,3 ± 0,7
	< 1100	20,4 ± 1,9	7,5 ± 0,8	28,3 ± 2,4	12,5 ± 1,2

during the incubation of pig spleen fragments. It can be also noted that incubation of fragments of studied organs with PI resulted in decreased amount of low molecular peptides.

Conclusions

Incubation during 60 min of pig and piglet heart fragments cryopreserved with PEO-1500 resulted in higher peptide concentration in supernatant than after incubation of control and cryopreserved with glycerol or PEO-400 fragments. Yield of peptides into the supernatant from pig spleen and piglet skin fragments cryopreserved with PEO-1500 was higher than the one from the fragments non-cryopreserved or cryopreserved under protection of glycerol; no differences were found with case of fragments cryopreserved with PEO-400. A significant role of endogenous proteases



сервованих із ПЕО-1500, більший, ніж із некріо-консервованих або кріоконсервованих під захистом гліцерину; відмінностей із фрагментами, кріоконсервованими з ПЕО-400, в цьому випадку не спостерігалось. Встановлена значна роль ендогенних протеаз в утворенні пептидів при інкубації фрагментів органів. При додаванні до середовища інкубації ІІІ зменшується кількість низькомолекулярних пептидів.

Література

1. Буланова А.В., Полякова Ю.Л. Хроматография в медицине и биологии // Учеб. пособие. – 2-е изд. – Самара: Изд-во «Самар. ун-т», 2006. – 116 с.
2. Гальченко С.Е. Экстракти кріоконсервованих фрагментів ксеноорганів: одержання та біологічна дія // Проблеми кріобіології. – 2005. – Т. 15, №3. – С. 403–406.
3. Замятнин А.А. Фрагментоміка природних пептидних структур // Успехи биол. химии. – 2009. – Т. 49. – С. 405–428.
4. Кайдашев И.П. Тканевая специфичность пептидных экстрактов, выделенных из различных органов, и иммуно-регуляторное действие пептидного экстракта почек // Биополимеры и клетка. – 1995. – Т. 11, №5. – С. 61–74.
5. Карелин А.А., Иванов В.Т. Пептидоміка – новое направление постгеномных технологий // Вестник Рос. акад. наук. – 2005. – Т. 75, №2. – С. 139–156.
6. Кленов Р.О., Чернова Е.В., Кленова Н.А. Спектры пептидных соединений в эритроцитах разного возраста в условиях действия экзогенного АТФ // Вестник СамГУ. Естественнауч. серия. – 2009. – Т. 68, №2. – С. 155–160.
7. Мокрушин А.А., Самойлов М.О. Пептидзависимые механизмы долговременной посттетанической потенциации (факты и гипотезы) // Успехи физиолог. наук. – 1999. – Т. 30, №1. – С. 3–28.
8. Никандров В.Н., Пыжова Н.С. Протеолиз как универсальный механизм регуляции биохимических и биологических процессов. Дискуссионные аспекты // Известия Нац. акад. наук Беларуси. Серия мед. наук. – 2008. – №1. – С. 4–22.
9. Нурмагомедова П.М., Омарова М.М. Активность нейтральной протеазы в тканях и сыворотке крови гомойотермного организма при охлаждении // Известия высш. учеб. заведений. Северо-кавказский регион. Серия: Естественные науки. – 2006. – №11. – С. 89–93.
10. Уильямс Д., Уилсон К. Методы практической биохимии. – М.: Мир, 1978. – 268 с.
11. Хавинсон В.Х., Рыжак Г.А. Пептидная регуляция основных функций организма // Вестник Росздравнадзора. – 2010. – №6. – С. 58–62.
12. Чукаева И.И., Богова О.Т., Корочкин И.М. и др. Инфаркт миокарда и воспаление // Медицина неотложных состояний. – 2007. – №4(11). – С. 19–23.
13. Шатаева Л.К., Хавинсон В.Х., Ряднова И.Ю. Пептидная саморегуляция живых систем (факты и гипотезы). – СПб.: Наука, 2003. – 222 с.
14. Пат. 2136296 РФ, А61К35/30, А61К38/02. Способ получения пептидов, обладающих антигонотропным действием / Н.В. Мельников, Ф.Н. Нигамов, М.М. Алсынбаев. – №97120213/14; заявл. 04.12.1997; опубл. 10.09.1999; Бюл. №25.
15. Пат. 2089204 (13) С1 РФ, А61К35/48, А61К35/55. Способ получения пептидов, восстанавливающих функцию предстательной железы / Н.В. Мельников, В.Ф. Кулагин, В.Г. Юсупов. – №94042209/14; заявл. 24.11.1994; опубл. 10.09.1997; Бюл. №25.
16. Lone A.M., Nolte W.M., Tinoco A.D., Saghatelian A. Peptidomics of the prolyl peptidases // The AAPS Journal. – 2010. – Vol. 12, №4. – P. 483–491.
17. Yamaguchi O., Taneike M., Otsu K. Cooperation between proteolytic systems in cardiomyocyte recycling // Cardiovasc. Res. – 2012. – Vol. 96, №1. – P. 46–52.

has been established in the formation of peptides during incubation of organ fragments. Introduction of PI to the incubation medium results in a reduction of low molecular peptides amount.

References

1. Bulanova A.V., Polaykova Yu.L. Chromatography in medicine and biology: Manual. Samara: Samara University; 2006.
2. Chukaeva I.I., Bogova O.T., Korochkin I.M. et al. Myocardial infarction and inflammation. Meditsyna Neotlozhnykh Sostoyaniy 2007; 4(11): 19–23.
3. Galchenko S.E. Extracts of cryopreserved fragments of xenorgans: derivation and biological action. Problems of Cryobiology 2005; 15(3): 403–406.
4. Karelin A.A., Ivanov V.T. Peptidomics is a new development in post-genomic technologies. Vestnik Ros Akad Nauk 2005; 75(2): 139–156.
5. Kaydashev I.P. Tissue specificity of peptide extracts derived from various organs and immunoregulatory effect of peptide extract of kidney. Biopolimery i Kletka 1995; 11(5): 61–74.
6. Khavinson V.Kh., Ryzhak G.A. Peptide regulation of main functions of an organism. Vestnik Roszdravnadzora 2010; (6): 58–62.
7. Klenov R.O., Chernova E.V., Klenova N.A. Spectra of peptide compounds in erythrocytes of different ages under the action of exogenous ATP. Bull of Samara State University. Series Natural Science 2009; 68(2): 155–160.
8. Lone A.M., Nolte W.M., Tinoco A.D., Saghatelian A. Peptidomics of the prolyl peptidases. The AAPS Journal 2010; 12(4): 483–491.
9. Melnikov N.V., Kulagin V.F., Yusupov V.G., inventors. Method of peptide derivation restoring prostate function. Patent of Russian Federation 2089204 (13) C1, A61K35/48, A61K35/55. 1997 Sept 10.
10. Melnikov N.V., Nigamov F.N., Alsynbaev M.M., inventors. Method of peptide derivation having antigonototropic effect. Patent of Russian Federation 2136296, A61K35/30, A61K38/02. 1995 Sept 10.
11. Mokrushin A.A., Samoylov M.O. Peptide-dependent mechanisms of long-term post-tetanic potentiation (facts and hypotheses). Uspekhi Fiziolog Nauk 1999; 30(1): 3–28.
12. Nikandrov V.N., Pyzhova N.S. Proteolysis as a universal mechanism for the regulation of biochemical and biological processes. Controversial aspects. Proceedings of National Academy of Sciences of Belarus. Series Medical Science 2008; (1): 4–22.
13. Nurmagomedova P.M., Omarova M.M. Activity of neutral protease in tissues and blood serum of homeothermic organism during cooling. Proceedings of Higher Education Establishments. North Caucasus: Natural Sciences 2006; (11): 89–93.
14. Shataeva L.K., Khavinson V.Kh., Ryadnova I.Yu. Peptide self-regulation of living systems (facts and hypothesis). St. Petersburg: Nauka; 2003.
15. Williams D., Wilson K. Principles and techniques of practical biochemistry. London: Edward Arnold; 1975.
16. Yamaguchi O., Taneike M., Otsu K. Cooperation between proteolytic systems in cardiomyocyte recycling. Cardiovascular Research 2012; 96(1): 46–52.
17. Zamyatnin A.A. Fragmentomics of natural peptide structures. Uspekhi Biologicheskoy Khimii 2009; 49: 405–428.

