

doi: <https://doi.org/10.15407/dopovidi2017.07.091>

УДК 615.361:615.451.1]:57.086.13:616–003.93

С.Є. Гальченко, Б.П. Сандомирський

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків
E-mail: segalchenko@gmail.com

Екстракти кріоконсервованих фрагментів органів свиней та поросят як компонент відновної медицини

Представлено академіком НАН України А.М. Гольцевим

Досліджено пептидний склад екстрактів кріоконсервованих фрагментів органів свиней та поросят і їх біологічну активність при експериментальних патологічних станах. Показано, що вихід пептидів у розчин більший з кріоконсервованих фрагментів органів свиней та поросят, а молекулярно-масовий розподіл пептидів у екстрактах залежить від органа та віку тварин. Після інкубування як контрольних, так і кріоконсервованих фрагментів органів за наявності інгібіторів протеїназ концентрація пептидів у супернатанті була статистично значуще меншою, ніж після інкубування без їх додавання. Такі екстракти стимулюють процес репаративної регенерації при експериментальних патологічних станах відповідних органів (гепатит, цироз печінки, холодова рана, некроз міокарда, спонтанна ішемія міокарда). Також встановлено, що введення шурам екстракту серця поросят стимулює проліферативну активність клітин у міокарді.

Ключові слова: кріоконсервування, фрагменти органа, екстракт, пептиди, регенерація.

Останнім часом в Україні і за її межами проводяться широкі дослідження ефективності та механізмів дії препаратів клітинної й тканинної терапії, у тому числі створених із органів тварин [1–3]. Головним чином це пов'язано з тим, що при цьому не виникають морально-етичні проблеми, а також відсутня небезпека інфікування характерними для людини вірусами, яка має місце у разі використання алогенного матеріалу. Але залишається небезпека передачі загальних для людини та тварин інфекцій. Тому в одержаному від тварин матеріалі повинна бути відсутня бактеріологічна, вірусологічна та мікологічна контамінація (наказ МОЗ України № 96 від 4 травня 2000 р). Для проведення аналізів на відсутність контамінації такого матеріалу потрібен відповідний час, протягом якого його раціонально зберігати в кріоконсервованому стані. Тканинні препарати використовують в клініці та наукових дослідженнях у вигляді клітин, фрагментів органа, екстрактів тканини відповідного органа та ін.

Мета дослідження — встановити пептидний склад екстрактів кріоконсервованих фрагментів органів свиней та поросят і їх біологічну активність при експериментальних патологічних станах.

Матеріали та методи. Фрагменти органів масою 2–5 мг отримували, подрібнюючи шматочки органів ножицями і тричі відмиваючи фізіологічним розчином. До фрагментів

органів по краплях додавали в співвідношенні 1:1 розчин кріопротектора (гліцерин, ДМСО, ПЕО-400 або ПЕО-1500) в кінцевій концентрації 10 %. Фрагменти розфасовували в поліетиленові ампули об'ємом 20 мл і заморожували зі швидкістю охолодження $1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{хв}$ до температури $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ з подальшим перенесенням у рідкий азот. Матеріал відігрівали на водяній бані з температурою $37-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ і відмивали від кріопротектора.

Екстракти одержували з кріоконсервованих фрагментів печінки свиней (ЕПС), печінки новонароджених поросят (ЕПП), серця свиней (ЕСцС), серця новонароджених поросят (ЕСцП), селезінки свиней (ЕСС) і шкіри новонароджених поросят (ЕШНП) шляхом їх інкубації у фізіологічному розчині протягом 30, 60 або 90 хв. Термолабільні протеїни видаляли. Екстракти, які використовувалися для дослідження молекулярно-масового розподілу пептидів, отримували з фрагментів органів, кріоконсервованих за наявності 10 % ПЕО-1500. Ці ж екстракти використовувалися і в інших експериментальних дослідженнях.

Концентрацію пептидів визначали спектрофотометричним методом на спектрофотометрі Perkin Elmer Lambda (США). Для визначення молекулярно-масового розподілу пептидів використовували метод високоефективної гелпроникної хроматографії. Для вивчення особливостей пептидного складу екстрактів використовували метод матрично-активованої лазерної десорбції/іонізації (МАЛДІ-ТоФ) MALDI MS Autoflex II ("Bruker Daltonics GmbH", Німеччина). Зареєстровані піки на мас-спектрах, що можуть відповідати окремим пептидним молекулам, порівнювали з даними Protein Knowledgebase (UniProtKB) Інтернет ресурсу Uniprot.org.

Для інгібування протеїназ використовували суміш інгібіторів Protease Inhibitor Cocktail ("Sigma-Aldrich", США). Ki-67-позитивні клітини визначали за допомогою первинних антитіл Ki-67 (clone MIB-1, IR 626, RTU FLEX, ДАКО, Данія). Візуалізацію первинних антитіл проводили за допомогою системи детекції ДАКО EnVision FLEX + (ДАКО, Данія).

Токсичний гепатит (ТГ) у щурів викликали шляхом одноразового введення в черевну порожнину 40 % розчину CCl_4 на вазеліновій олії в дозі 0,4 мл/100 г маси тварини (90 тварин). Щурам з ТГ (дві групи по 20 тварин) протягом чотирьох діб після ін'єкції CCl_4 щодобово в черевну порожнину вводили ЕПС або ЕПП. Щурам контрольної групи (15 тварин) у черевну порожнину замість екстракту вводили фізіологічний розчин. Цироз печінки (ЦП) моделювали введенням під шкіру 40 % розчину CCl_4 в олії з персикових кісточок у дозі 0,2 мл на 100 г маси тіла тварин двічі на тиждень.

Холодову рану моделювали на нелінійних щурах масою 180–210 г. Відмороження викликали мідним аплікатором з діаметром 10 мм і температурою $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$, експозиція – двічі по 30 с. Площу ран визначали за цифровими зображеннями за допомогою програми Bio Vision.

Для моделювання некрозу міокарда (НМ) проводили кріовплив на стінку лівого шлуночка серця кріоінструментом з діаметром аплікатора 3 мм, який охолоджувався рідким азотом.

Для реєстрації електрокардіограми (ЕКГ) тварин використовували апаратно-програмний комплекс "Полі-Спектр" ("Нейрософт", Росія). Для оцінки вираженості запального і резорбційно-некротичного синдрому в щурів з НМ визначали активність аланінамінотрансферази (АлАТ) і аспаратамінотрансферази (АсАТ) у сироватці крові за допомогою наборів "Фелісіт діагностика" (Дніпро, Україна).

Дослідним тваринам вводили екстракти з концентрацією пептидів 100 мкг/мл у черевну порожнину один раз на добу протягом усього експерименту. Доза пептидів становила

50 мкг на 100 г маси тварини. Контрольним щурам вводили фізіологічний розчин із розрахунку 0,5 мл на 100 г маси.

Статистичну обробку результатів проводили непараметричним методом MANOVA. Розрахунок показників виконували за допомогою програми SPSS Statistics 17.0. Дані представлені як середнє значення \pm похибка середнього.

Результати та їх обговорення. Мінімальний вихід пептидів у розчин спостерігався після інкубування фрагментів, які не були кріоконсервовані. Максимальна концентрація пептидів у супернатанті спостерігалася в тому випадку, коли фрагменти кріоконсервовували за наявності ПЕО-400 або ПЕО-1500. Їх концентрація достовірно зростала із збільшенням строку інкубації з 30 до 60 хв. Збільшення цього строку до 90 хв не спричиняло статистично достовірного підвищення концентрації пептидів. Згідно з результатами дослідження, молекулярно-масовий розподіл пептидів в екстрактах кріоконсервованих фрагментів органів залежить як від органа, так і від віку тварин.

Відомо, що функціонально активні пептиди утворюються за допомогою обмеженого протеолізу. Тому ми дослідили роль протеїназ в утворенні пептидів, які реєструються в екстрактах. Після інкубування як контрольних, так і кріоконсервованих фрагментів органів за наявності інгібіторів протеїназ концентрація пептидів у супернатанті була статистично значуще меншою, ніж після інкубування, яке проводилося без їх додавання. У разі інкубування кріоконсервованих фрагментів кількість низькомолекулярних пептидів у екстрактах була більшою, ніж у варіанті інкубування некріоконсервованих фрагментів. Це може бути пов'язано з активацією протеїназ у кріоконсервованих фрагментах. Зокрема, вони можуть контролювано активуватися у відповідь на стресорний вплив фізико-хімічних факторів, які діють на клітини під час заморожування—відігріву.

Зівставлення молекулярних мас пептидів, зареєстрованих методом МАЛДІ-ТоФ в екстрактах, і пептидів, наявних у базі даних UniProtKB, показало, що в ЕСС реєструються пептиди Putative uncharacterized protein, Glutathione peroxidase 5, TGF-beta receptor, type I, Myosin, Sperm surface antigen, Apolipoprotein D, ATPase class II type 9A, Myocyte enhancer factor 2D, Histone deacetylase 50, Apolipoprotein B, TLR-8 mRNA; в ЕШНП – Putative uncharacterized protein, Beta 3-adrenergic receptor, Rhophilin associated protein 1B, Diacylglycerol acyltransferase 1, Solute carrier family 2 member 2, TGF-beta receptor, type I, Myosin-7, Uncharacterized protein, Cathepsin B, Ubiquitin-activating enzyme E1C, 4B-cell translocation protein, Myocyte enhancer factor 2D, Proteasome activator subunit 3, Galectin, Uncharacterized protein, Calcium-activated neutral protease 1; в ЕСЦС – Thyrotropin-releasing hormone, Mineralocorticoid receptor, Chemokine (C-X3-C motif) ligand 1, Luteinizing hormone beta subunit, Interferon-induced protein 6-16, АТРА1 protein, Follicle-stimulating hormone primary response protein; в ЕСЦП – Lipocalin 6, Met-enkephalin-Arg-Phe, Sperm surface antigen, Bone morphogenetic protein 11, Succinate dehydrogenase iron-protein subunit, Myocyte enhancer factor 2D, Chemokine C-X3-C motif ligand 1, Natural resistance associated macrophage protein 1, Neuronal protein NP-190, Alpha-internexin, Suppressor of cytokine signaling 3, Follicle-stimulating hormone primary response protein 1. Крім наведених, в екстрактах детектуються піки пептидів, які відсутні в базі даних.

Отримані дані можуть бути використані для ідентифікації або стандартизації екстрактів у подальших дослідженнях та для з'ясування структури пептидів, що входять до складу екстрактів, за їх молекулярними масами.

У щурів з модельованим ТГ відсоток летальності в контрольній групі становив 40 %, а в групах тварин, яким вводили ЕПС або ЕПП, — по 20 %. Через добу після початку експерименту в сироватці крові щурів спостерігалася багатократне збільшення активності амінотрансфераз, що свідчить про значне ушкодження клітин печінки. Так, активність АлАТ збільшувалася у 18 разів, а АсАТ — у 5,6 раза порівняно з нормою. На 5-ту добу спостереження активність обох амінотрансфераз у тварин, яким вводили ЕПП або ЕПС, була хоч і вищою від значень, характерних для інтактних тварин, але вірогідно нижчою, ніж у контрольних.

У тварин з експериментальним ЦП активність амінотрансфераз збільшувалася (табл. 1). При цьому активність АлАТ була вищою від норми в 5,4 раза, а АсАТ — у 2 рази. На 15-ту добу у сироватці крові тварин, яким вводили ЕПП, спостерігалася достовірне зменшення активності трансаміназ порівняно з контролем. На 30-ту добу активність ферментів зменшувалася в обох випадках, але при використанні ЕПП цей показник нормалізувався.

Згідно з результатами визначення швидкості загоєння холодкових ран у щурів, яким вводили ЕШНП, ЕСС або фізіологічний розчин, на 3-тю добу експерименту статистично достовірних відмінностей в площі ран контрольної та дослідних груп не спостерігалася. Надалі відмічалася зменшення площі ран у варіантах із введенням ЕСС та ЕШНП: на 7-му добу — в 1,2 та 1,5 раза, на 14-ту добу — в 2,9 та 3,8 раза відповідно порівняно з контролем. Тобто починаючи з 7-ї доби площа ран у тварин, яким вводили ЕШНП або ЕСС, була статистично достовірно меншою, ніж у контрольних щурів. Таким чином, досліджувані екстракти прискорюють загоєння холодкових ран в експерименті.

У тварин зі спонтанною ішемією міокарда на ЕКГ відмічено елевацію сегмента ST і збільшення амплітуди зубця Т, зниження амплітуди зубця R в I і avl відведеннях. У цій групі тварин після введення ЕСцП протягом 2 місяців зареєстровано відновлення амплітуди зубця R. Підвищення сегмента ST змінювалося появою куполоподібного зубця Т, що свідчило про нормалізацію кровопостачання серцевого м'яза. У щурів з цією патологією, яким вводили фізіологічний розчин протягом 2 місяців, показники ЧСС, SDNN та CV практично не змінювалися.

У тварин, яким вводили ЕСцП, середня ЧСС збільшилася з 381 до 498 скор./хв. Спостерігалася чітко виражена нормалізація решти показників. Таким чином, аналіз варіабельності серцевого ритму показав, що введення ЕСцП щурам з ішемією серцевого м'яза сприяє нормалізації всіх електрофізіологічних показників роботи серця, які вивчалися в роботі.

Таблиця 1. Активність амінотрансфераз (мкмоль/(мл·год)) у сироватці крові щурів з ЦП та при його лікуванні ЕПП

Фермент	Норма	Строк спостереження, доба					
		1		15		30	
		ЦП	ЦП	ЦП + ЕПП	ЦП	ЦП + ЕПП	
АлАТ	0,34 ± 0,02	1,67 ± 0,07	1,40 ± 0,07	0,61 ± 0,05 *	0,52 ± 0,05	0,41 ± 0,03 **	
АсАТ	0,98 ± 0,07	1,90 ± 0,12	1,83 ± 0,11	1,37 ± 0,07 *	1,41 ± 0,09	1,23 ± 0,08 **	

* Відмінності статистично достовірні порівняно з ЦП, $p < 0,05$. ** Відмінності статистично недостовірні порівняно з нормою, $p > 0,05$.

Для дослідження проліферативної активності клітин серця і впливу на цей процес ЕСцП ми використовували визначення маркера Ki-67 – ядерного антигену, який експресується в клітинах тварин і людини на всіх стадіях клітинного циклу, крім Go [4]. У інтактних тварин без виявленої патології серця кількість Ki-67-позитивних клітин становила 7,9 % загального числа, а у тварин з ішемією міокарда – 12,0 % (табл. 2). Введення фізіологічного розчину як інтактним тваринам, так і тваринам з патологіями серця не впливало на кількість таких клітин. У здорових тварин, яким вводили ЕСцП, кількість Ki-67-позитивних клітин у міокарді на 3-тю добу збільшувалася до 16 %, а через 2 місяці їх кількість становила 6,1 %. У щурів з ішемією міокарда на 3-тю добу введення ЕСцП кількість мічених клітин значно збільшувалася – майже втричі порівняно з тваринами з ішемією на початок експерименту і в 4,5 раза порівняно з інтактними тваринами. В кінці експерименту кількість таких клітин також залишалася достатньо високою – 24,6 %.

Таблиця 2. Загальна кількість і кількість Ki-67-позитивних клітин в міокарді щурів

Умови експерименту	Строк спостереження, доба					
	Початкові показники		3		60	
	Всі клітини	Ki-67-позитивні клітини	Всі клітини	Ki-67-позитивні клітини	Всі клітини	Ki-67-позитивні клітини
Норма	645 ± 42	51 ± 4	–	–	–	–
Норма + ФР			527 ± 48	47 ± 5	584 ± 51	43 ± 4
Норма + ЕСцП			639 ± 50	102 ± 5*,#	627 ± 59	78 ± 3*,#
Ішемія + ФР	591 ± 36	71 ± 6*	571 ± 41	76 ± 4*	532 ± 44	77 ± 5*
Ішемія + ЕСцП			632 ± 54	227 ± 14*,#	601 ± 52	148 ± 9*,#

* Відмінності статистично достовірні порівняно з нормою, $p < 0,05$. # Відмінності статистично достовірні порівняно з початковими показниками, $p < 0,05$.

Таблиця 3. Морфометричні показники зони некрозу серця та активність АсАТ в сироватці крові щурів

Строк спостереження, доба	Група щурів	Показник		
		Діаметр некрозу, мм	Площа перерізу по центру некрозу, мм ²	Активність АсАТ, мкмоль / (год·мл)
1	НМ	7,24 ± 0,27	6,24 ± 0,04	4,4 ± 0,1
	НМ + ЕСцП	7,26 ± 0,15	2,57 ± 0,03*	4,4 ± 0,6
7	НМ	5,44 ± 0,43	4,36 ± 0,37	4,1 ± 0,1
	НМ + ЕСцП	4,85 ± 0,46	1,03 ± 0,24*	2,4 ± 0,1*
14	НМ	6,13 ± 0,58	3,55 ± 0,20	3,2 ± 0,1
	НМ + ЕСцП	4,63 ± 0,35*	1,06 ± 0,06*	2,5 ± 0,2*
30	НМ	5,01 ± 0,05	2,02 ± 0,05	2,9 ± 0,1
	НМ + ЕСцП	3,04 ± 0,38*	0,65 ± 0,08*	2,4 ± 0,1

* Відмінності статистично достовірні порівняно з НМ, $p < 0,05$.

Після моделювання НМ формувалася зона реактивного запалення з лейкоцитарною інфільтрацією вогнища ушкодження, а також чітка зона некрозу, відокремлена демаркаційною лінією. Через 1 добу після моделювання некрозу його діаметр в усіх групах був однаковий (табл. 3).

Але площа перерізу по центру некрозу після введення ЕСцП була меншою в 2,4 раза, ніж у контролі. На ЕКГ усіх тварин після кровопливу на міокард відмічалось зниження амплітуди зубців R, поява зубця $q \leq R$ і негативних зубців T в I та avL відведеннях. Підвищення активності АлАТ не спостерігалось, а активність АсАТ в сироватці крові експериментальних тварин через 1 добу після кріодеструкції міокарда збільшувалася в 1,5 раза. У щурів із торакотомією активність АсАТ залишалася на рівні норми.

У тварин, яким вводили ЕСцП, на 14-ту добу діаметр зони некрозу був статистично достовірно меншим порівняно з контролем. Площа перерізу по центру зони кріонекрозу також була статистично достовірно меншою. На 30-ту добу експерименту діаметр зони некрозу в цій групі тварин зменшився в 1,6 раза, а площа перерізу по центру зони кріонекрозу – в 3,1 раза порівняно з контролем.

Через 7 діб після початку експерименту активність АсАТ в сироватці крові знижувалася у тварин, яким вводили ЕСцП. Якщо у тварин з НМ у цей строк активність АсАТ в 1,4 раза перевищувала норму, то у щурів, яким вводили ЕСцП, цей показник статистично достовірно не відрізнявся від норми. На 14-ту добу активність АсАТ поверталася до значень норми у всіх випадках.

Таким чином, нами встановлено, що вихід речовин пептидної природи в розчин більший з кріоконсервованих фрагментів органів, а молекулярно-масовий розподіл пептидів у екстрактах залежить від органа та віку тварин. Показано, що такі екстракти стимулюють процес репаративної регенерації при експериментальних патологічних станах відповідних органів.

Автори висловлюють подяку за допомогу, надану в дослідженнях, канд. біол. наук Л.А. Рогозі, канд. біол. наук І.Г. Беспаловій, канд. мед. наук М.О. Чижу та Г.Г. Бабаєвій.

ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. Hemshekhar M., Anapatri V., Mookherjee N. Functions of cationic host defense peptides in immunity. *Pharmaceuticals*. 2016. **9**, № 40. С. 1–10.
2. Шабанов П.Д. Фармакологія лікарських препаратів пептидної структури. *Психофармакол. биол. наркол.* 2008. **8**, № 4. С. 2399–2425.
3. Васильева Е.В., Салимов Р.М., Ковалёв Г.И. Влияние интраназального и внутривентриального введения пептидов семакса и ноопепта на поведенческие характеристики мышей BALB/c. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2016. № 2. С. 31–36.
4. Антонеева И.И., Петров С.Б. Маркеры апоптоза и пролиферации опухолевых клеток в динамике прогрессирования рака яичника. *Онкология*. 2008. **10**, № 2. С. 234–237.

Надійшло до редакції 20.03.2017

REFERENCES

1. Hemshekhar, M., Anapatri, V. & Mookherjee, N. (2016). Functions of cationic host defense peptides in immunity. *Pharmaceuticals*, 9, No. 40, pp. 1-10. doi: <https://doi.org/10.3390/ph9030040>
2. Shabanov, P. D. (2008). Pharmacology of Drugs of Peptide Structure. *Psycho-Pharmacol. Biol. Narcol.*, 8, No. 4, pp. 2399-2425 (in Russian).
3. Vasilieva, E. V., Salimov, R. M. & Kovalev, G. I. (2016). Effect of intranasal and intraperitoneal administration of peptides semax and noopept on the behavior of BALB/c mice. *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*, No. 2, pp. 31-36 (in Russian).
4. Antoneeva, I. I. & Petrov, S. B. (2008). Markers of apoptosis and proliferation of tumor cells in the dynamics of ovarian cancer progression. *Oncology*, 10, No. 2, pp. 234-237 (in Russian).

Received 20.03.2017

С.Е. Гальченко, Б.П. Сандомирский

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков

E-mail: segalchenko@gmail.com

ЭКСТРАКТЫ КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ ФРАГМЕНТОВ ОРГАНОВ СВИНЕЙ И ПОРОСЯТ КАК КОМПОНЕНТ ВОССТАНОВИТЕЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ

Исследовали пептидный состав экстрактов криоконсервированных фрагментов органов свиней и поросят и их биологическую активность при экспериментальных патологических состояниях. Показано, что выход пептидов в раствор больше из криоконсервированных фрагментов органов свиней и поросят, а молекулярно-массовое распределение пептидов в экстрактах зависит от органа и возраста животных. При инкубировании как контрольных, так и криоконсервированных фрагментов органов в присутствии ингибиторов протеиназ, концентрация пептидов в супернатанте была статистически значимо меньше, чем после инкубирования без их добавления. Такие экстракты стимулируют процесс репаративной регенерации при экспериментальных патологических состояниях соответствующих органов (гепатит, цирроз печени, холодная рана, некроз миокарда, спонтанная ишемия миокарда). Также установлено, что введение крысам экстракта сердца поросят стимулирует пролиферативную активность клеток в миокарде.

Ключевые слова: криоконсервирование, фрагменты органа, экстракт, пептиды, регенерация.

S.Ye. Halchenko, B.P. Sandomirsky

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the NAS of Ukraine, Kharkiv

E-mail: segalchenko@gmail.com

EXTRACTS OF CRYOPRESERVED ORGAN FRAGMENTS OF PIGS AND PIGLETS AS A COMPONENT OF RESTORATIVE MEDICINE

The peptide composition of the extracts of cryopreserved fragments of organs of pigs and piglets and their biological activity under experimental pathological states are studied. It is shown that the release of peptides to the solution was higher from cryopreserved fragments of organs of pigs and piglets, and the molecular-mass distribution of peptides in the extracts depends on organ and age of animals. When incubating both control and cryopreserved organ fragments in the presence of proteinase inhibitors, the concentration of peptides in supernatant was statistically significantly lower than after the incubation without it. These extracts are shown to stimulate the process of reparative regeneration under experimental pathological states of the corresponding organs (hepatitis, hepatic cirrhosis, cold wound, myocardial necrosis, spontaneous myocardial ischemia). It is established that the injections of piglet heart extracts to rats stimulate the cell proliferative activity in myocardium.

Keywords: cryopreservation, fragments of organs, extract, peptides, regeneration.