

dzono p.p.m. występującą równocześnie z uchyłkiem odbytnicy. Po uzyskaniu dostępu operacyjnego z przydobytniczego cięcia skóry najpierw obszywano uchyłki odbytnicy, a następnie operowano przepuklinę przepony miednicy według zmodyfikowanej metody Moltzen-Nielsena. W czasie zabiegu do obszycia odbytnicy i zamykania przepukliny obok nici z kwasu poliglikolowego (dexon) wykorzystywano plecione nici węglowe. W grupie tej przeprowadzono łącznie 14 operacji p.p.m. (u 10 psów po jednej i u 2 po obu stronach odbytu). Nawrót przepukliny zanotowano w 2 przypadkach na 13 operowanych i kontrolowanych w późnym okresie przepuklin, co stanowi 15,4 %. W pozostałych przypadkach nie stwierdzono nawrotu przepukliny przez cały okres obserwacji trwających od 12 do 39 miesięcy. U tych psów w czasie kolejnych kontroli klinicznych obserwowano postępujące wzmocnienie struktur przepony miednicy w miejscu wszyciego biomateriału.

U 2 psów doszło do odrzucenia wszyciego biomateriału w okresie 11 i 12 tygodni po operacji. U jednego psa powikłanie to najprawdopodobniej nastąpiło w wyniku zakażenia, ponieważ nastąpiło tylko po jednej stronie odbytu, podczas gdy zabieg ten był przeprowadzony po obu stronach odbytu.

W badaniach wykazano dużą przydatność plecionej nici węglowej w leczeniu p.p.m. i u.o. u psów.

89

present perineal hernia and rectal diverticulum. In those dogs dexon and the braided carbon thread were used in suturing the rectal diverticulum and perineal hernia. In this group of dogs 14 perineal hernias were made.

The recurrence of perineal hernia was observed in 2 of 13 cases controlled after operation. In remaining dogs no recurrence of the perineal hernia was observed during 12-39 months after operation. In this dogs during rectal examination thick perineal diaphragm was sensed in the in the operated regions

In 2 dogs the implanted material was rejected between 11 and 12 weeks after operation. In one dog the implanted material most likely was rejected by the organism as a result of an infection.

The investigations demonstrated that the braided carbon thread may be useful in the treatment of pelvic diaphragmic hernia and rectal diverticulum in dogs.

WPŁYW STABILIZACJI TKANKI NA PROFILE ELEKTROFORETYCZNE BIAŁEK EKSTRAHROWANYCH Z OSIERDZIA ŚWINI

BEATA C WALINA*, ARTUR TUREK*, ELEKTRA S LIUPKAS-DYRDA**, ZBIGNIEW NAWRAT***

* KATEDRA BIOFIZYKI

ŚLĄSKIEJ AKADEMII MEDYCZNEJ W SOSNOWCU

** KATEDRA BIOLOGII MOLEKULARNEJ, BIOCHEMII I BIOFARMACJI

ŚLĄSKIEJ AKADEMII MEDYCZNEJ W SOSNOWCU

*** FUNDACJA ROZWOJU KARDIOCHIRURGII W ZABRZU

Streszczenie

Badano profile elektroforetyczne białek uwalnianych z tkanek - zarówno natywnych, jak i modyfikowanych, trawionych i nie poddawanych działaniu pankreatyny. Utrwalanie tkanki osierdziejowej zarówno dimetylo-imidosuberynianem (DMS), jak i aldehydem glutarowym (GA) skutkowało zwiększeniem masy cząsteczkowej białek ekstrahowanych z modyfikowanych tkanek, w porównaniu z tkankami natywnymi (kontrolnymi). Wiele niskocząsteczkowych białek nie występowało w ekstraktach uzyskanych z tkanek najbardziej utrwalonych. Modyfikowane tkanki były bardziej odporne na trawienie enzymatyczne.

Słowa kluczowe: stabilizacja tkanek, sieciowanie, dimetylo-imidosuberynian, aldehyd glutarowy, elektroforeza białek

EFFECT OF TISSUE-STABILIZATION ON ELECTROPHORETIC PROFILES OF PROTEINS EXTRACTED FROM PORCINE PERICARDIUM

BEATA C WALINA*, ARTUR TUREK*, ELEKTRA S LIUPKAS-DYRDA**, ZBIGNIEW NAWRAT***

* DEPARTMENT OF BIOPHYSICS,

MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA, SOSNOWIEC

** DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY, BIOCHEMISTRY AND BIOPHARMACY,

MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA, SOSNOWIEC

*** FUNDATION FOR DEVELOPMENT OF CARDIAC SURGERY, ZABRZE

Abstract

The electrophoretic profiles of the proteins released from tissues - both native and modified, digested and untreated with pancreatin, have been studied. Fixation of pericardial tissue with dimethyl suberimidate (DMS) as well as with glutaraldehyde (GA) resulted in a higher molecular weight of proteins extracted from the modified tissues as compared with the native (control) tissues. Many low-molecular proteins were not present in extracts obtained from the most fixed tissues. The modified tissues were more resistant to enzymatic digestion.

Key words: tissue stabilization, crosslinking, dimethyl suberimidate, glutaraldehyde, protein electrophoresis

Modyfikowane chemicznie tkanki zawierające kolagen są wykorzystywane od prawie trzydziestu pięciu lat jako biomateriały do wytwarzania różnych protez biologicznych, włączając zastawki serca [1]. W tym celu najczęściej stosuje się osierdzie wołowe konserwowane aldehydem glutarowym. W wyniku stabilizacji tkanki następuje tworzenie się międzycząsteczkowych i wewnątrzcząsteczkowych wiązań sieciujących w poszczególnych białkach, np. w kolagenie [2]. Jednakże aldehyd glutarowy (GA) może powodować cytotoksyczność oraz kalcyfikację bioprotez *in vivo* [3]. Problemy kliniczne stymulują poszukiwanie alternatywnych metod sieciowania kolagenu. Jednym z bardziej atrakcyjnych odczynników sieciujących wydaje się dimetylo-imido-suberynian (DMS) [4].

Ocena efektywności sieciowania tkanki jest trudna z powodu złożoności procesu modyfikacji. Ponieważ dodatkowe wiązania poprzeczne tworzą się najłatwiej w białkach niskocząsteczkowych, proces ten jest uważany za przyczynę zmniejszenia się ilości takich białek ekstrahowanych z tkanki. Ponadto, im większa jest liczba wiązań sieciujących w modyfikowanej tkance, tym bardziej utrudniona jest reakcja zabezpieczonych grup z substancjami degradującymi tkankę. Tak więc zwiększona odporność tkanki na różne odczynniki chemiczne i enzymy proteolityczne może być przypisywana efektowi stabilizacji. Z drugiej strony, wyższe masy cząsteczkowe białek zawartych w zmodyfikowanych tkankach są interpretowane jako wynik obecności dodatkowych wiązań kowalencyjnych w strukturze białek [5]. Bazując na ekstrakcji białek z tkanek, opracowano metodę monitorowania efektu ich stabilizacji [6].

Celem niniejszej pracy było określenie wpływu procesu stabilizacji (prowadzonego z zastosowaniem DMS i GA) na ekstrakcję białek z tkanek osierdziowych, jak również na ich odporność na trawienie enzymatyczne. W tym celu badano profile elektroforetyczne białek uwalnianych z tkanek - zarówno natywnych, jak i modyfikowanych, trawionych i nie poddawanych działaniu pankreatyny.

Materiały i metody

Materiałem poddawanym badaniom były tkanki osierdzia włóknistego świni, pobierane bezpośrednio po uboju zwierząt. Tkanki były natychmiast płukane w schłodzonym (4°C) roztworze solanki buforowanej fosforanami (phosphate-buffered saline; PBS; pH 6,5) i następnie umieszczane w butelkach zawierających ten sam bufor. Butelki umieszczano w pojemniku chłodzonym lodem, wykorzystywanym do transportu. Z każdego worka osierdziowego oddzielano mechanicznie osierdzie włókniste, z którego usuwano ostrożnie tkankę tłuszczową. Oczyszczone kawałki tkanki osierdzia sieciowano z zastosowaniem 1% DMS (w czasie 0.5 h lub 1 h), a także stosując działanie kolejno 1% DMS (0.5 h) oraz 0.1% GA (0.5 h). Efekt stabilizacji oceniano na podstawie badania ekstrakcji białek. Oznaczano masy cząsteczkowe białek uwalnianych z tkanek natywnych i modyfikowanych. Badano także odporność tych tkanek na trawienie enzymatyczne (pankreatyną). Izolowanie białek i analizy elektroforetyczne prowadzono z zastosowaniem procedury Laemmli [7]. Białka rozdzielano z zastosowaniem metody elektroforezy w żelu poliakrylamidowym (polyacrylamide gel electrophoresis; PAGE) w obecności dodecylsulfianu sodowego (sodium dodecyl sulphate; SDS), powszechnie znanej jako metoda SDS-PAGE. Detekcję białek wewnątrz żelu poliakrylamidowego prowadzono stosując metodę barwienia błękitem Coomassie. Dokumentację żeli wykonywano z zastosowaniem systemu Biotec Fischer.

Introduction

Chemically modified, collagen-containing tissues are used almost thirty-five years as biomaterials in production of various bioprostheses, including heart valves [1]. Most often, the glutaraldehyde-preserved bovine pericardium is used for this purpose. As a result of the tissue stabilization, intermolecular and intramolecular crosslinking bonds are formed in particular proteins, for example in collagen [2]. However, the glutaraldehyde (GA) may cause cytotoxic effect as well as calcification of bioprostheses *in vivo* [3]. Clinical problems stimulate searching for alternative methods of the collagen crosslinking. Dimethyl suberimidate (DMS) seems to be one of the most attractive crosslinking reagents [4].

Evaluation of the tissue-crosslinking efficiency is difficult due to complexity of the modification process. As additional transverse bonds are formed most easily in low-molecular proteins, this process is considered to be a reason of the decrease in amount of such proteins extracted from tissue. Besides, the higher the number of cross-links in a modified tissue the more difficult it is for protected groups to react with substances degrading a tissue. Thus, the tissue increased resistance to various chemical reagents and proteolytic enzymes may be attributed to the stabilization effect. On the other hand, the higher molecular weight of proteins contained in modified tissues are interpreted as a result of the presence of additional covalent bonds in the proteins structure [5]. Based on protein-extraction from tissues, the method was developed to monitor their stabilization effect [6].

The objective of this work was to determine the influence of stabilization processes (carried out using DMS and GA) on protein extraction from pericardial tissues, as well as on their resistance to enzymatic digestion. The electrophoretic profiles of the proteins released from tissues - native and modified, digested and untreated with pancreatin, were studied for this purpose.

Materials and methods

The material being investigated were the fibrous porcine pericardium tissues sampled directly after slaughtering of animals. Tissues were immediately rinsed in cooled (4°C) solution of phosphate-buffered saline (PBS; pH 6,5) and then placed in bottles containing this same buffer. The bottles were put in ice-cooled container used for transportation. The fibrous pericardium was mechanically separated from each pericardial sac and the fatty tissue was carefully removed. The cleaned pericardium-tissue pieces have been crosslinked using 1% DMS (for 0.5 h or 1 h), and also using subsequent treatment with 1% DMS (0.5 h) and 0.1% GA (0.5 h). The stabilization effect was evaluated based on protein extraction assay. The molecular weight of proteins released from the native and modified tissues were determined. These tissues resistance to enzymatic (pancreatin) digestion has also been investigated. Isolation of the proteins and electrophoretic analyses were carried out using the Laemmli procedure [7]. The proteins have been separated using polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) in the presence of sodium dodecyl sulphate (SDS), commonly known as SDS-PAGE method. Protein-detection within polyacrylamide gel has been carried out using the Coomassie blue staining method. The gel-documentation has been performed using Biotec Fischer System.

Dla określenia zmian w białkach ulegających ekstrakcji z natywnych i stabilizowanych tkanek zawierających kolagen, kawałki osierdzia świni poddawano działaniu dimetylo-imidosuberynianu (DMS) oraz aldehydu glutarowego (GA). Przykładowe różnice między profilami elektroforetycznymi bazującymi na masie cząsteczkowej białek uwalnianych z tkanek przedstawiono w TABELI 1.

To determine changes in the proteins extractable from native and stabilized collagen-containing tissues, the porcine pericardium pieces were treated with dimethyl suberimidate (DMS) and glutaraldehyde (GA). An example of differences between electrophoretic profiles based on the molecular weight of the proteins released from the tissues has been presented in TABLE 1.

Tkanka Tissue	Masa cząsteczkowa białek uwalnianych z tkanek osierdzia [kDa] Molecular weight of proteins extracted from pericardium tissues [kDa]												
N		234			170		152			67	61	46	
N-P		227		180		161				70	62		42 32
DMS0.5	250			186							65	49	42
DMS0.5-P		235				164					59		42
DMS1	250				174				130		62	49	40
DMS1-P	242				178					70	62		
DMS/GA	242		199					144		66			
DMS/GA-P			206							72			

TABELA 1. Masa cząsteczkowa białek ekstrahowanych z tkanek osierdzia: natywnej (N); poddanej działaniu DMS przez 0.5 h (DMS0.5) lub 1 h (DMS1); traktowanej DMS przez 0.5 h i GA przez następne 0.5 h (DMS/GA); P - próbki trawione pankreatyną.

TABLE 1. Molecular weight of proteins extracted from pericardium tissues: native (N); treated with DMS for 0.5 h (DMS0.5) or 1 h (DMS1); treated with DMS for 0.5 h and subsequently with GA for 0.5 h (DMS/GA); P - pancreatin-digested samples.

Podsumowanie

Wykazano, że poddanie tkanki osierdziowej działaniu zarówno dimetylo-imidosuberynianu (DMS), jak i aldehydu glutarowego (GA) skutkowało zwiększeniem masy cząsteczkowej białek ekstrahowanych z modyfikowanych tkanek, w porównaniu z tkankami natywnymi (kontrolnymi). Wiele niskocząsteczkowych białek nie występowało w ekstraktach uzyskanych z tkanek najbardziej utrwalonych. Modyfikowane tkanki były bardziej odporne na trawienie enzymatyczne (pankreatyną). Dłuższy czas działania DMS powodował większą odporność tkanki na degradację proteolityczną. Dodatkowo traktowanie za pomocą GA tkanki modyfikowanej DMS skutkowało bardzo małą ilością białek ekstrahowanych z tkanki, jak również jej dużą odpornością na trawienie enzymatyczne.

Podziękowania

Praca finansowana przez Śląską Akademię Medyczną.

Piśmiennictwo

- [1] Carpentier A.: From valvular xenografts to valvular bioprosthesis (1965-1977). *Med. Instrum.*, 11 (1977), 98-101
- [2] Khor E.: Methods for the treatment of collagenous tissues for bioprostheses. *Review. Biomaterials*, 18 (1997), 95-105
- [3] Goissis G., Yoshioka S.A., Braile D., Ramirez V.D.A.: The chemical protecting group concept applied in crosslinking of natural tissues with glutaraldehyde acetals. *Artificial Organs*, 3 (1998), 210-214
- [4] Charulatha V., Rajaram A.: Crosslinking density and resorption of dimethyl suberimidate-treated collagen. *J. Biomed. Mater. Res.*, 36 (1997), 478-486

Summary

It has been demonstrated that treatment of pericardial tissue with dimethyl suberimidate (DMS) as well as with glutaraldehyde (GA) resulted in a higher molecular weight of proteins extracted from the modified tissues as compared with the native (control) tissues. Many low-molecular proteins were not present in extracts obtained from the most fixed tissues. The modified tissues were more resistant to enzymatic (pancreatin) digestion. The longer time of DMS-treatment caused the higher resistance of tissue to proteolytic degradation. Additional GA-treatment of DMS-modified pericardium resulted in very small amount of protein extracted from tissue, as well as its high resistance to enzymatic digestion.

Acknowledgements

This work was financially supported by Medical University of Silesia.

References

- [5] Moore M.A.: Pericardial tissue stabilized by dye-mediated photooxidation: a review article. *J. Heart Valve Dis.*, 6 (1997), 521-526
- [6] Moore M.A., Chen W-M., Phillips R.E., Bohachevsky I.K., McIlroy B.K.: Shrinkage temperature versus protein extraction as a measure of stabilization of photooxidized tissue. *J. Biomed. Mater. Res.*, 32 (1996), 209-214
- [7] Laemmli U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature*, 227 (1970), 680-685