

Na podstawie uzyskanych wyników (RYS.1-5, TAB.1-2) stwierdzono, że roztwór antybiotyków powodował zwiększenie stabilności biochemicznej i strukturalnej tkanek osierdzia świni - zarówno natywnej, jak i modyfikowanej za pomocą taniny. Wzrost stabilności biochemicznej odzwierciedlał się w mniejszej ilości białek niskocząsteczkowych ekstrahowanych z tkanek poddanych działaniu antybiotyków (RYS.1, TAB.1). Wyniki te sugerują również możliwość udziału antybiotyków w sieciowaniu tkanki osierdzia. Sugestia ta wymaga jednak potwierdzenia. Badania histologiczne wykazały stabilność struktury tkanek poddanych działaniu antybiotyków (RYS.2-5, TAB.2). Dalsze badania powinny wyjaśnić kwestie, w jakim stopniu obserwowane efekty są trwałe i czy biomateriały tkankowe przechowywane w roztworach zawierających antybiotyki muszą być silnie usieciowane.

Podziękowania

Praca finansowana przez Śląską Akademię Medyczną.

- [7] Jorge-Herrero E., Fernández P., Turnay J., Olmo N., Calero P., García R., Freile I., Castillo-Olivares J.L. (1999) Influence of different chemical cross-linking treatments on the properties of bovine pericardium and collagen. *Biomaterials*. 20: 539-545.
- [8] Khor E. (1997) Methods of the treatment of collagenous tissue for bioprotheses. *Biomaterials*. 18: 95-105.
- [9] Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227: 209-214.
- [10] Nawrat Z., Kostka P., Małota Z., Cwalina B., Religa Z. (2001) Biologiczne zastawki serca - doświadczenia własne w modyfikacji materiału odzwierzęcego. XII Krajowa Konf. Naukowa "Biocybernetyka i Inżynieria Biomedyczna", T. 1, Wyd. IBIB PAN, Warszawa, 479-483.
- [11] Schmidt C.E., Baier J.M. (2000) Acellular vascular tissues: natural biomaterials for tissue repair and tissue engineering. *Biomaterials*. 21: 2215-2231.
- [12] Sclafani A.P., Romo III T., Jacono A.A., McCormick S., Cocker R., Parker A. (2000) Evaluation of acellular dermal graft in sheet (AlloDerm) and injectable (Micronized AlloDerm) forms for soft tissue augmentation. *Arch. Facial Plast. Surg.* 2: 130-136.
- [13] van Wachem P.B., Brouwer L.A., Zeeman R., Dijkstra P.J., Feijen J., Hendriks M., Cahalan P.T., van Luyn M.J.A. (2000) In vivo behaviour of epoxy-crosslinked porcine heart valve cusps and walls. *J. Biomed. Mater. Res.* 53: 18-27.
- [14] Yang E.K., Young K.S., Seo Y.K., Youn H.H., Lee D.H., Park S.N., Park J.K. (2000) Tissue engineered artificial skin composed of dermis and epidermis. *Artif. Organs*. 24: 7-17.

EFEKTY SIECOWANIA OSIERDZIA ŚWINI BADANE ZA POMOCĄ SPEKTROSKOPII EPR - METODY ZNAKOWANIA SPINOWEGO

BEATA C WALINA, LECHOSŁAW DUL
KATEDRA BIOFIZYKI,
ŚLĄSKA AKADEMIA MEDYCZNA, SOSNOWIEC

Streszczenie

Celem pracy była ocena udziału ϵ -aminowych grup lizyny w elastynie, jak również ϵ -aminowych grup lizyny i hydroksylizyny w kolagenie w modyfikacji tkanki osierdziowej za pomocą glutaraldehydu (GA). Materiałami badanymi były: nierozpuszczalny kolagen typu I, elastyna i osierdzie włókniste świni, zarówno natywne i usieciowane glutaraldehydem. Do badania efektu sieciowania wykorzystano spektroskopię elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR) - metodę znakowania spinowego (znacznik spinowy: izotiocyaniano-Tempo; ITCTO). Można stwierdzić, że w procesie sieciowania tkanki kolagenowej przez GA uczestniczą grupy ϵ -aminowe zarówno lizyny i hydroksylizyny. W czystym kolagenie GA reaguje głównie z grupami ϵ -aminowymi hydroksylizyny.

Słowa kluczowe: kolagen, elastyna, tkanka osierdzia, sieciowanie, glutaraldehyd, EPR, znakowanie spinowe.

PORCINE PERICARDIUM CROSSLINKING-EFFECTS INVESTIGATED BY EPR SPECTROSCOPY - SPIN LABELING METHOD

BEATA C WALINA, LECHOSŁAW DUL
DEPARTMENT OF BIOPHYSICS,
MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA, SOSNOWIEC

Abstract

The aim of this work was to elucidate contribution of the ϵ -amino groups of lysine in elastin as well as of the ϵ -amino groups of lysine and hydroxylysine in collagen to the pericardial tissue modification by means of glutaraldehyde (GA). The investigated materials were: insoluble collagen type I, elastin and porcine fibrous pericardium, both native and crosslinked with glutaraldehyde. The electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy - method of spin labeling (spin label: isothiocyanato-Tempo; ITCTO) - has been used for study of the crosslinking-effects. It may be stated that in the process of collagenous tissue crosslinking by GA participate ϵ -amino groups of both lysine and hydroxylysine. In pure collagen, GA reacts mainly with ϵ -amino groups of hydroxylysine.

Key words: collagen, elastin, pericardium tissue, crosslinking, glutaraldehyde, EPR, spin labeling

Proces utrwalania tkanek bogatych w kolagen (w literaturze: tkanek kolagenowych) jest wiązany przede wszystkim z sieciowaniem tego białka [3,8,10]. Najczęściej stosowanym czynnikiem sieciującym jest aldehyd glutarowy (glutaraldehyd; GA) [5,7]. Przyjmuje się, że GA reaguje z kolagenem tworząc wiązania głównie z grupami ϵ -aminowymi lizyny [3,7,11]. Grupy te mogą wiązać znacznik spinowy izotiocyanato-Tempo (ITCTO) [1,6,9]. Istnieje więc możliwość wykorzystania spektroskopii elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR) - metody znakowania spinowego - do badania efektów sieciowania tkanek kolagenowych. Cząsteczki ITCTO związane z poszczególnymi grupami ϵ -aminowymi lizyny kolagenu obecnego w tkance (np. osierdziu) powinny wykazywać różne czasy korelacji rotacyjnej. Tak więc widmo EPR znacznika powinno odzwierciedlać efekt sieciowania kolagenu.

Z drugiej strony, w tkance osierdziejowej GA powinien reagować także z grupami ϵ -aminowymi elastyny, której włókna przeplatają się z gęsto upakowanymi włóknami kolagenowymi [2].

Celem pracy było wyjaśnienie udziału ϵ -aminowych grup lizynowych elastyny oraz ϵ -aminowych grup lizyny i hydroksylizyny kolagenu w modyfikacji tkanki osierdziejowej za pomocą GA.

Materiały i metody

Badanymi materiałami były: nierozpuszczalny kolagen typu I ze ścięgna Achillesa wołu (Sigma), elastyna z więzadła szyi wołu (Sigma), jak również tkanki osierdziejowej różnego zwierzęcia, pobierane bezpośrednio po uboju zwierząt. Materiały te sieciowano z użyciem 0,2% roztworu GA w czasie 15 min. lub 2 h. Próbki natywne i modyfikowane zalewano roztworem znacznika spinowego 4-izotiocyanato-Tempo i inkubowano w 4°C przez 24 h. Po tym czasie nadmiar znacznika odmywano 10-krotnie, stosując wirowanie (6000 obr/min). Pomiędzy każdym wirowaniem próbkę płukano roztworem solanki buforowanej fosforanami (phosphate-buffered saline; PBS; pH 6,5). Następnie materiał umieszczano w kapilarze o średnicy 1 mm i wykonywano pomiary z użyciem spektrometru EPR firmy Radiopan-Poznań. Widma próbek rejestrowano za pomocą spektrometru EPR typ SE/X 2542, z rezonatorem cylindrycznym TM₁₁₀. Stosowano moc mikrofalową ok. 100 mW z modulacją częstotliwości 100 kHz, amplitudę modulacji 0,08 mT oraz czas rejestracji 16 min. ze stałą czasową 1 s. Pomiary prowadzono w temperaturze pokojowej.

Wyniki i dyskusja

Podczas wcześniejszych badań prowadzonych w Katedrze Biofizyki stwierdzono, że wzrost efektywności sieciowania tkanki osierdziejowej za pomocą GA powodował bardzo wyraźną zmianę stosunku intensywności widm EPR pochodzących od znacznika spinowego o dużej lub małej ruchliwości. Wydłużeniu czasu działania GA na tkankę towarzyszyło zmniejszenie intensywności widma EPR w postaci trypletu wąskich linii [4].

Analiza kształtu widma EPR znacznika spinowego ITCTO związanego z czystym, natywnym kolagenem (RYS. 1; COL) sugeruje, że w tym białku grupy ϵ -aminowe lizyny posiadają stosunkowo dużą swobodę ruchu - ich czas korelacji rotacyjnej jest krótki. Świadczy o tym spektrum EPR znacznika spinowego związanego z tym białkiem, będące trypletem wąskich, symetrycznych linii [1,12].

Diametralnie różne jest widmo EPR znacznika spinowego ITCTO związanego z elastyną (RYS.1; ELA). Spek-

Process of the collagen-rich tissues fixation (in the literature: collagenous tissues) is first of all connected with crosslinking of this protein [3,8,10]. Glutaraldehyde (GA) is the crosslinking agent most often used for this purpose [5,7]. It is accepted that GA reacts with collagen forming bonds mainly with ϵ -amino groups of lysine [3,7,11]. These groups may bind a spin label: isothiocyanato-Tempo (ITCTO) [1,6,9]. So, it is possible to use the electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy - method of spin labeling - for study the collagenous tissues crosslinking-effects. ITCTO-molecules bound to the ϵ -amino groups of lysine in collagen present in tissue (for example: pericardium) should indicate different times of rotary correlation. Thus, the label's EPR spectrum should reflect the collagen crosslinking effect.

On the other hand - in the pericardial tissue, GA should react also with ϵ -amino groups of elastin, which fibers interlace with thickly packed collagenous fibers [2].

The aim of this work was to elucidate contribution of the ϵ -amino groups of lysine in elastin as well as of the ϵ -amino groups of lysine and hydroxylysine in collagen, to the pericardial tissue modification by means of GA.

Materials and methods

The investigated materials were: insoluble collagen type I from bovine Achilles tendon (Sigma), elastin from bovine neck ligaments (Sigma) as well as tissues of porcine fibrous pericardium, sampled directly after slaughtering of animals. These materials have been crosslinked using 0,2% GA solution, during 15 min. or 2 h. Native and modified samples have been flooded with solution of spin label 4-isothiocyanato-Tempo and incubated at 4°C for 24h. After this time, an excess of the label has been washed 10 times using centrifugation (6000 r.p.m.). Between each of centrifugations, the sample was rinsed with phosphate-buffered saline (PBS; pH 6,5). Afterwards the material has been placed into capillary vessel of 0,8 mm diameter and measurements have been carried out using the EPR spectrometer (Radiopan-Poznań). The samples' spectra have been recorded by means of EPR spectrometer type SE/X 2542 with cylindrical TM₁₁₀ resonator. The microwave power nearly 100 mW with modulation frequency 100 kHz, modulation amplitude 0,08 mT, and scan time 16 min with time constant 1s have been used. Measurements have been carried out at room temperature.

Results and discussion

It has been demonstrated during earlier investigations carried out in Department of Biophysics that increase in efficiency of the pericardial tissue crosslinking by means of GA caused very clear change in intensity ratios of the EPR spectra originated from spin label of high or low mobility. Prolongation of the tissue treatment with GA was accompanied by decrease in intensity of the EPR spectrum in form of the narrow lines' triplet [4].

Analysis of the spin-labeled EPR lineshape of the ITCTO incorporated into pure, native collagen (FIG.1; COL) suggests that in this protein ϵ -amino groups of lysine possess relatively large freedom of movement - their rotary-correlation time is short. It is betokened by the EPR spectrum of spin label bound to this protein, being the triplet of narrow, symmetrical lines [1,12].

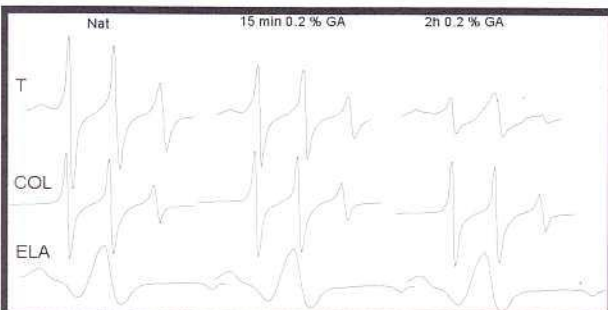
Diametrically different is the EPR spectrum of the ITCTO spin label bound to the elastin (FIG.1; ELA). EPR spectrum is formed by wide, overlapping lines. This indicates that ϵ -amino groups of lysine in the elastin possess con-

trum EPR tworzą szerokie, nakładające się na siebie linie. Oznacza to, że w elastynie grupy ϵ -aminowe lizyny mają znacznie ograniczoną ruchliwość - znacznik spinowy związany z nimi wykazuje bardzo długi czas korelacji rotacyjnej.

Porównując widma EPR znacznika spinowego ITCTO związanego z tkanką osierdzia świni (RYS.1; T) oraz z kolagenem (RYS.1; COL) i elastyną (RYS.1; ELA), przeprowadzono identyfikację składowych widm uzyskanego dla znacznika związanego z tkanką. Stwierdzono, że spektrum EPR składające się z trzech wąskich, symetrycznych linii (C_w) pochodzi od znacznika spinowego ITCTO związanego z grupami ϵ -aminowymi lizyny w kolagenie, natomiast szeroki sygnał (E_s) pochodzi od znacznika związanego z grupami ϵ -aminowymi lizyny w elastynie.

Dla wyjaśnienia udziału obu białek (ich grup ϵ -aminowych lizyny) w procesie sieciowania tkanki osierdziovej, modyfikowano ją za pomocą 0.2% GA. Nie obserwowano wpływu GA na widma EPR znacznika spinowego ITCTO związanego z elastyną (RYS.2; ELA) ani z kolagenem (RYS.2; COL) - mimo, że stwierdzono wyraźne zmiany właściwości kolagenu. Białko to po modyfikacji za pomocą GA zmieniło barwę z białej na żółtą. Ponadto zwiększyła się jego twardość i wytrzymałość na cięcie. Elastyna, która nie zawiera hydroksylizyny, nie zmieniła swoich właściwości zewnętrznych po modyfikacji GA.

Porównując wyniki uzyskane dla kolagenu i elastyny po ich sieciowaniu GA (RYS.2; COL; ELA) z wynikami uzyskanymi dla usieciowanych tkanek osierdziowych (RYS.2; T), znakowanych spinowo znacznikiem ITCTO, można przypuszczać, że w procesie sieciowania kolagenu uczestniczą ϵ -aminowe grupy zarówno lizyny i hydroksylizyny, lecz znacznik spinowy ITCTO nie reaguje z tymi drugimi.



RYS.2. Zmiany widm EPR znacznika spinowego izotiocyaniano-Tempo związanego z elastyną (ELA), kolagenem (COL) i tkanką osierdziową (T), natywnymi (Nat) i modyfikowanymi z użyciem 0,2% GA w czasie 15 min. lub 2 h.

siderably limited mobility - spin label bound to them indicates very long rotary-correlation time.

Identification of components of spectrum obtained for ITCTO spin label connected with tissue have been carried out, comparing EPR spectra of the label bound to the porcine pericardium tissue (FIG.1; T), collagen (FIG.1; COL) and elastin (FIG.1; ELA). It has been demonstrated that EPR spectrum consists of three narrow, symmetrical lines (C_w) originates from spin label ITCTO bound to the ϵ -amino groups of lysine in the collagen, whereas wide signal (E_s) originates from label bound with the ϵ -amino groups of lysine in the elastin.

For elucidation of the both proteins' (their ϵ -amino groups of lysine) contribution to the tissue crosslinking process, tissue was modified by means of 0.2% GA. There has been not observed influence of GA on EPR spectrum of the ITCTO spin label bound to the elastin (FIG.2; ELA) or the collagen (FIG.2; COL) - although clear changes of the collagen properties have been ascertained. After modification by GA, this protein changed colour from white for yellow. Besides, its hardness and cutting strength increased. Elastin, which doesn't contain hydroxylysine, didn't change its outer properties after GA-modification.

Comparing results obtained for collagen and elastin after their crosslinking by GA (FIG.2; COL; ELA) with results obtained for crosslinked pericardial tissues (FIG.2; T), spin-labeled by ITCTO-label, it may be supposed that in the collagen crosslinking process participate ϵ -amino groups of both lysine and hydroxylysine, but the spin label ITCTO doesn't react with these second ones.

Decrease in the EPR spectrum intensity of the label bound to crosslinked pericardial tissue, corresponding to mobile ϵ -amino groups of lysine, and lack of such changes for pure collagen may indicate that the tissue crosslinking process is more complex than it is described in literature.

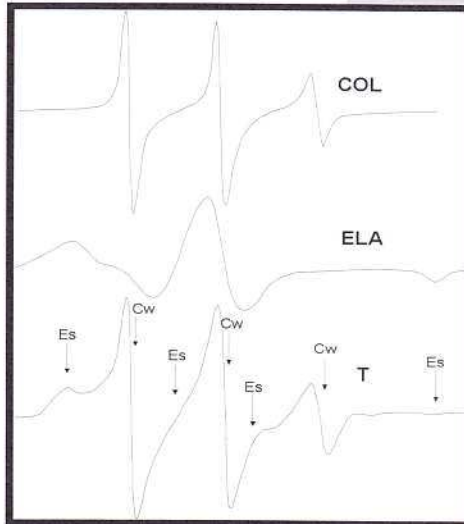
The tissular collagen isn't separate part of whole system which one is the tissue, but it is one element of complex system. There are connections and linkages between collagen, elastin, proteoglycans and fibroblasts which decide function and form of whole tissue. It is accepted that fibroblasts determine physiological functions of pericardial sac. It is probable that fibroblasts may be responsible for qualitative and quantitative relations between particular components of pericardial tissue [2].

Summary

Results obtained in this work suggest that in pure collagen - as an effect of lack of interactions with the elastin and the fibroblasts - GA reacts mainly with the ϵ -amino groups of hydroxylysine. On the other hand, the ϵ -amino groups of both lysine and hydroxylysine participate in the process of the collagen-rich pericardial tissue crosslinking by means of GA. It is probably due to the presence of other components in the tissue.

Acknowledgements

This work was financially supported by Medical University of Silesia. EPR-measurements have been carried out in Department of Molecular Biology, Biochemistry and Biopharmacy (Medical University of Silesia) headed by Prof. Tadeusz Wilczok.



RYS.1. Widma EPR znacznika spinowego izotiocyaniano-Tempo związanego z próbkami natywnymi: COL - kolagen, ELA - elastyna, T - tkanka osierdziowa; E_s i C_w - składowe widma odpowiadające znacznikowi o odpowiednio małej i dużej ruchliwości.

FIG.1. EPR spectra of the spin label isothiocyanato-Tempo connected with native samples: COL - collagen, ELA - elastin, T - pericardial tissue; E_s and C_w - spectrum-components related to the low and great-mobility label, respectively.

Zmniejszenie intensywności widma EPR znacznika związanego z usieciowaną tkanką osierdziową, odpowiadającego ruchliwym grupom ϵ -aminowym lizyny, i brak takich zmian dla czystego kolagenu, może oznaczać, że proces sieciowania tkanki jest procesem bardziej złożonym, niż jest opisywane w literaturze. Kolagen tkankowy nie jest odrębną częścią całego układu, jakim jest tkanka, ale jednym z elementów wieloskładnikowego systemu. Między kolagenem, elastyną, proteoglikanami i fibroblastami występują powiązania i sprzężenia, które decydują o funkcji i kształcie całej tkanki. Uważa się, że fibroblasty determinują fizjologiczne funkcje pełnione przez worek osierdziowy. Jest prawdopodobne, że fibroblasty mogą być odpowiedzialne za stosunki jakościowe i ilościowe między poszczególnymi składnikami tkanki osierdziowej [2].

Podsumowanie

Wyniki uzyskane w tej pracy sugerują, że w czystym kolagenie, w wyniku braku oddziaływań z elastyną i fibroblastami, GA reaguje głównie z grupami ϵ -aminowymi hydroksylizyny. Natomiast w procesie sieciowania za pomocą GA bogatej w kolagen tkanki osierdziowej uczestniczą zarówno grupy ϵ -aminowe hydroksylizyny, jak i lizyny kolagenu. Prawdopodobnie jest to spowodowane obecnością innych składników w tkance.

Podziękowania

Praca finansowana przez Śląską Akademię Medyczną. Pomiar EPR prowadzono w Katedrze Biologii Molekularnej, Biochemii i Biofarmacji ŚAM, kierowanej przez Prof. Tadeusza Wilczka.

STABILNOŚĆ BIOCHEMICZNA TKANEK OSIERDZIA MODYFIKOWANYCH ALDEHYDEM GLUTAROWYM LUB MRÓWKOWYM

BEATA C WALINA*, ARTUR TUREK*, MAŁGORZATA MIŚKOWIEC*, ZBIGNIEW NAWRAT**, DOROTA DOMAL-KWIATKOWSKA***

*KATEDRA BIOFIZYKI,

ŚLĄSKA AKADEMIA MEDYCZNA, SOSNOWIEC

**FUNDACJA ROZWOJU KARDIOCHIRURGII, ZABRZE

***KATEDRA BIOLOGII MOLEKULARNEJ, BIOCHEMII I BIOFARMACJI,

ŚLĄSKA AKADEMIA MEDYCZNA, SOSNOWIEC

Streszczenie

Porównywano stabilność biochemiczną tkanek osierdzia świni: natywnej i modyfikowanych za pomocą aldehydu glutarowego (GA) lub mrówkowego (FA). Analizowano profile elektroforetyczne białek uwalnianych z badanych tkanek, zarówno trawionych i nie poddawanych działaniu pankreatyny. Tkanki modyfikowane były bardziej odporne na trawienie enzymatyczne, niż tkanka natywna. Mała liczba prążków reprezentujących białka niskocząsteczkowe w ekstraktach uzyskanych z tkanek modyfikowanych świad-

Piśmiennictwo

References

- [1] Berliner L.J. Spin labeling. Theory and applications. Acad. Press, New York-San Francisco-London, 1976.
- [2] Bochenek A., Reicher M. (Red. Łasiński W.) Anatomia człowieka. Tom III. Układ naczyniowy. PZWL, Warszawa, 1993.
- [3] Cheung D.T., Perelman N., Ko E. C., Nimni M.E. Mechanism of crosslinking of proteins by glutaraldehyde. III. Reaction with collagen in tissues. *Connect. Tissue Res.* 1985, 13: 109-115.
- [4] Dul L., Cwalina B. Wpływ procesu sieciowania za pomocą aldehydu glutarowego na inkorporację znacznika spinowego do tkanki kolagenowej. XI Zjazd PTBiof., Cieszyn, Publ.: Current Topics in Biophysics. 2001, 25(1), 63.
- [5] Friess W. Collagen - biomaterial for drug delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 1998, 45: 113-136.
- [6] Gwoździński K., Bartosz G. Synteza i właściwości nitroksylowych znaczników spinowych oraz ich zastosowanie w badaniach błon biologicznych. *Zagadnienia Biofizyki Współczesnej*, 1978, 3: 45-100.
- [7] Khor E. Method for the treatments of collagenous tissue for bioprotheses. *Biomaterials*, 1997, 18: 95-105.
- [8] Langdon S.E., Cherebecky R., Pereira C.A., Abdulla D., Lee J.M. Biaxial mechanical/structural effects of equibiaxial strain during crosslinking of bovine pericardial xenograft materials. *Biomaterials*, 1999, 20: 137-135.
- [9] Middleton D.A., Reid D.G., Watts A. The conformation of a functional spin-labeled derivative of gastric H/K-ATPase investigated by EPR spectroscopy. *Biochemistry*, 1995, 34: 7420-7429.
- [10] Rumian S., Mazurkiewicz S., Legendziewicz J., Woch W.M. Ocena zmian biofizycznych tkanki osierdziejowej po krótkotrwałym utrwaleniu w 0,62% wodnym roztworze glutaraldehydu. *Polski Przegląd Chirurgiczny*, 1992, 64(12): 1086-1090.
- [11] Sheu M.T., Huang J.C., Yeh G.C., Ho H.O. Characterization of collagen gel solutions and collagen matrices for cell culture. *Biomaterials*, 2001, 22: 1713-1719.
- [12] Surewicz K.W. Metody interpretacji widm EPR znakowanych spinowo błon biologicznych. *Zagadnienia Biofizyki Współczesnej*, 1978, 3: 21-44.

BIOCHEMICAL STABILITY OF PERICARDIAL TISSUES MODIFIED USING GLUTARALDEHYDE OR FORMALDEHYDE

BEATA C WALINA*, ARTUR TUREK*, MAŁGORZATA MIŚKOWIEC*, ZBIGNIEW NAWRAT**, DOROTA DOMAL-KWIATKOWSKA***

*DEPARTMENT OF BIOPHYSICS,

MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA, SOSNOWIEC

**FOUNDATION FOR DEVELOPMENT OF CARDIAC SURGERY, ZABRZE

***DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY, BIOCHEMISTRY AND BIOPHARMACY, MEDICAL UNIVERSITY OF SILESIA, SOSNOWIEC

Abstract

Biochemical stability of pericardial tissues native and modified using glutaraldehyde (GA) and formaldehyde (FA) have been compared. The electrophoretic profiles of the proteins released from investigated tissues, both digested and untreated with pancreatin, have been studied. The modified tissues were more resistant to enzymatic digestion as compared with native one. A small number of lines representing low-molecular proteins in extracts obtained from the modified tissues point to these tissues higher stabil-