

## Молекулярно-масовий розподіл пептидів і їх спектральні характеристики в екстрактах шкіри щурів та сироватці крові в залежності від виду травми

UDC 577.112.6:612.79.015.12

L.A. ROGOZA<sup>1</sup>, I.G. BESPALOVA<sup>1</sup>, I.A. SALIENKO<sup>2\*</sup>

## Molecular-Mass Distribution of Peptides and Their Spectral Characteristics in Extracts of Rat Skin and Blood Serum According to Trauma Type

Відомо, що регуляторні пептиди приймають безпосередню участь в регуляції як фізіологічної, так і репаративної регенерації. Вони тканино-специфічні і видонеспецифічні [2]. Можливо, вони можуть утворюватися при необхідності корекції того чи іншого патологічного стану. Встановлена висока біологічна активність екстрактів кріоконсервованих фрагментів органів свиней та поросят, яка пов'язується з наявністю в них таких пептидів [1].

Мета роботи – вивчити вплив травм шкіри на молекулярно-масовий розподіл пептидів в екстрактах шкіри та сироватці крові щурів, а також вплив екстрактів кріоконсервованих фрагментів шкіри новонароджених поросят (ЕШНП) і селезінки свиней (ЕСС) на цей показник в динаміці загоєння холододових травм.

### Матеріали та методи

Експерименти проведено згідно з «Загальними принципами експериментів на тваринах», схваленими II Національним конгресом з біоетики (2004 р., Київ, Україна) і узгодженими з положеннями «Європейської Конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних і інших наукових цілей» (Страсбург, 1985).

Перед нанесенням травм робили епіляцію на стегні. Три паралельні різані рани глибиною 2 мм, довжиною 10 мм наносили з інтервалом 5 мм. Термічні травми наносили мідним аплікатором діаметром 10 мм з температурою 100°C і –196°C, експозиція 35 і 60 сек відповідно. Опромінення ультрафіолетом (УФ) проводили еритемною лампою ЕУВ-30 з відстані 10 см на протязі 10 хв. Екстракт кріоконсервованих фрагментів шкіри новонароджених поросят і селезінки свиней одержували за методом [3] та вводили в черевну порожнину

It has been known that regulatory peptides directly participate in regulation of both physiologic and reparative regeneration. They are tissue-specific and species-non-specific [2]. They may be likely formed if necessary for the correction of any pathologic state. High biological activity of cryopreserved extracts of pigs' and piglets' organ fragments, which is associated with the presence of these peptides in it, has been established [1].

The research aim is to study the effect of skin trauma on molecular-mass distribution of peptides in skin extracts and blood serum of rats, and the effect of extracts of cryopreserved skin fragments of newborn piglets (ESNP) and pigs' spleen (ESP) on that index of cold trauma healing in dynamics.

### Materials and methods

All experiments were carried out according to "General ethical principles of experiments in animals", approved by the Ist National congress for Bioethics (Kiev, Ukraine, 2004) and confined with the regulations of "European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes" (Strasbourg, 1985).

Before trauma initiation, the thigh was depilated. Three parallel slash wounds of 2 mm depth, 10 mm length, were done with 5 mm interval. Thermal traumas were made copper applicator of 10 mm diameter and with temperature of 100 and –196°C, 35 and 60 seconds exposure, correspondingly. Irradiation with ultraviolet light was carried out with EUV-30 lamp in a distance of 10 cm for 10 min. The extract of cryopreserved fragments of newborn piglets' skin and pigs' spleen was obtained on the method [3] and introduced into abdominal cavity for 1 ml one per day. Peptide concentration in extracts made 100 µg/ml. All experi-

<sup>1</sup>Харківський національний університет ім. В.Н. Каразіна<sup>2</sup>Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

\*Адреса для кореспонденції: вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61015; тел.:+38 (057) 372-74-35, факс: +38 (057) 373-30-84, електронна пошта: cryo@online.kharkov.ua

<sup>1</sup>V.N. Karazin Kharkov National University, Kharkov, Ukraine<sup>2</sup>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 3727435, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

по 1 мл 1 раз на добу. Концентрація пептидів в екстрактах становила 100 мкг/мл. Всі маніпуляції з тваринами проводили під поверхневим ефірним наркозом. Екстракти шкіри щурів отримували інкубуванням фрагментів шкіри в фізіологічному розчині протягом 60 хв. Для визначення молекулярно-масового розподілу речовин пептидної природи в екстрактах використовували високо-ефективну гелпроникаючу хроматографію. Спектрофлуориметричні вимірювання проводили на спектрофлуориметрі Varian Cary Eclipse. Результати статистично обробляли за допомогою пакета програм Statistica for Windows 5.1.

### Результати та обговорення

Розробка нових високоєфективних лікарських препаратів, у тому числі й для лікування ран шкіри, продовжує залишатися актуальною задачею. Було показано, що ЕШНП і ЕСС нормалізують процес загоєння холодових та опікових ран [1], а це пов'язується з наявністю в них регуляторних пептидів. Тому попередньо ми дослідили молекулярно-масовий розподіл речовин пептидної природи в цих екстрактах і нативній шкірі щурів. Однаковими літерами на хроматограмах помічені піки, що відповідають речовинам пептидної природи з однаковою молекулярною масою. Цей розподіл залежить від біологічного матеріалу, але спостерігаються і спільні для всіх екстрактів піки – P, E, F, G (рис. 1).

На 2-у добу після нанесення травм на хроматограмі екстракту механічно травмованої шкіри реєструється три додаткових піки, а саме A, B і E (рис. 2). Максимальна кількість піків спостерігається при холодовій травмі та після УФ опромінення шкіри. Отже, молекулярно-масовий розподіл в екстрактах шкіри залежить від виду травми, що може відображати специфічність розвитку і регуляції процесів запалення при різних видах травм. Встановлено що після нанесення травм змінюється молекулярно-масовий розподіл пептидів і в сироватці крові.

При цьому змінюються також спектральні характеристики як екстрактів шкіри, так і сироватки

ments with animals were carried out under interfacial ether narcosis. Extracts of rats' skin were obtained with incubating of its fragments in physiological solution for 60 min. For determining the molecular-mass distribution of substances' peptide origin in extracts, the high-efficiency gel-penetrating chromatography was used. Spectrofluorimetric measurements were carried out with Varian Cary Eclipse spectrofluorimeter. Results were statistically processed using Statistica for Windows 5.1 software.

### Results and discussing

Development of new high-efficiency medicines, including for the healing of skin wounds, remains an actual problem. It has been shown that ESNP and ESP normalize the adhesion process of cold and burn wounds [1], but this is associated with the presence of regulatory peptides in it. So, initially we have investigated the molecular-mass distribution of peptide origin substances in these extracts and native rats' skin. The peaks are marked the same letters in chromatograms, corresponding to the substances of peptide nature with the same molecular mass. This distribution depends on biological material, but peaks: P, E, F and G common for all extracts are observed.

To the second day after trauma initiation in extract chromatogram of mechanically traumatized skin three external peaks, like A, B and E are recorded (Fig. 2). Maximal number of peaks is seen at cold trauma and after ultraviolet radiation of skin.

So, molecular-mass distribution in skin extracts depends on trauma type that may represent the specificity of development and regulation of inflammation processes at different trauma types. It has been established that after trauma initiation the molecular-mass distribution of peptides also changes in blood serum.

Herewith the spectral characteristics of either skin extracts, or blood serum also change. It means that in response to trauma the regulatory mechanisms are triggered with peptide regulation not only at local level, but also at organism one.

During healing of cold wounds (14 days observation term) the normalization of peptide composition and

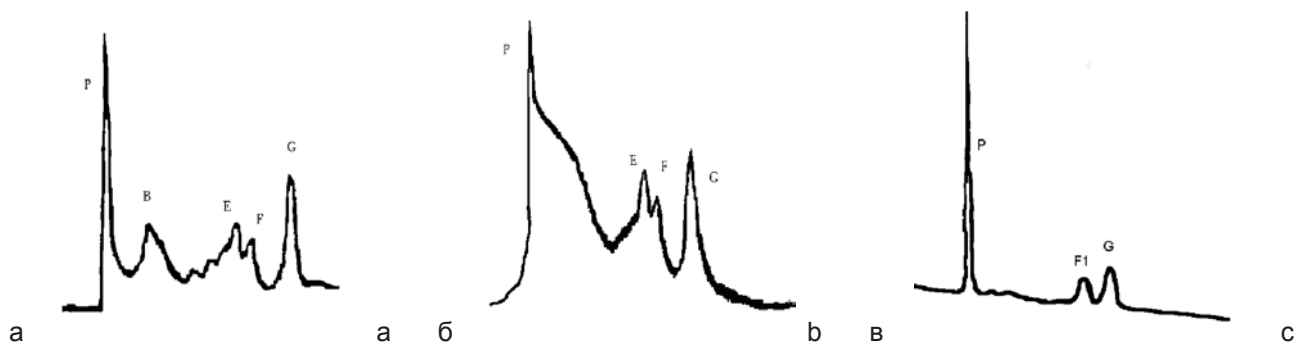
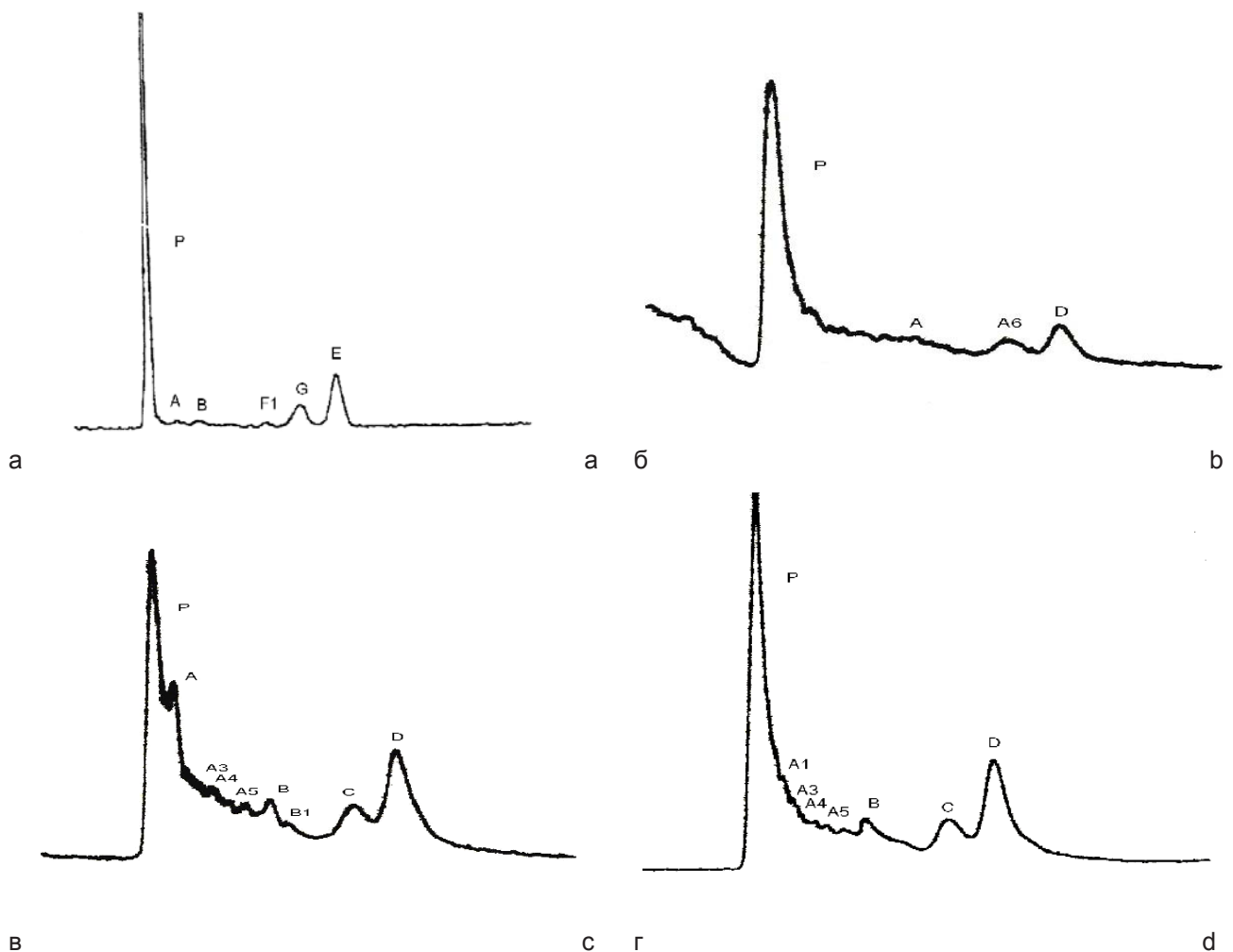


Рис. 1. Хроматограми ЕШНП (а), ЕСС (б) і нативної шкіри щурів (в).

Fig. 1. ESNP chromatograms (a), ESP (b), native skin of rats (c).



**Рис. 2.** Хроматограма екстракту шкіри шурів на 2-у добу після нанесення різаної (а), опікової (б), холодової (в) та УФ травм.

**Fig. 2.** Chromatograms of skin extracts of rats to the second day after initiation of slash (a), thermal (b), cold (c) and UV traumas (d).

крові. Це може свідчити, що у відповідь на травму включаються регуляторні механізми з залученням пептидної регуляції не тільки на місцевому, але і на рівні організму. У процесі загоєння холодних ран (строк спостереження 14 діб) спостерігається нормалізація пептидного складу та спектрів флуоресценції як екстрактів шкіри, так і сироватки крові. Але при уведенні ЕШНП або ЕСС така нормалізація відбувається в більш ранні строки. При цьому темпи загоєння ран також були більшими, ніж в контролі (уведення фізіологічного розчину). Одержані дані можуть бути використані при з'ясуванні механізмів пептидної регуляції процесу загоєння ран.

### Висновки

Молекулярно-масовий розподіл речовин пептидної природи в екстрактах шкіри і сироватці крові та їх спектральні характеристики залежать від виду травми. При введенні дослідним тваринам в черевну порожнину ЕШНП або ЕСС прискоро-

fluorescence spectra for either skin extracts or blood serum are observed. But at injection of either ESNP or ESP this normalization proceeds at earlier terms. Herewith healing rates of wounds were also higher than in the control (injection of physiologic solution). Obtained data may be used for determining of mechanisms of peptide regulation for healing wounds process.

### Conclusions

Molecular-mass distribution of the substances peptide origin in skin extracts and blood serum and their spectral characteristics depends on trauma type. During injection of either ESNP or ESP into abdominal cavity of investigated animals, healing of wounds accelerates and investigated indices normalize at earlier terms.

### References

1. Galchenko S.E. Extracts of cryopreserved fragments of xenorgans: deriving and biological activity// Problems of Cryobiology.– 2005.– Vol.15, N3.– P. 403–406.

рюється загоєння ран, а досліджені показники нормалізуються в більш ранні строки.

### Література

1. Гальченко С.Є. Екстракти кріоконсервованих фрагментів ксеноорганів: одержання та біологічна дія // Пробл. криобиології.– 2005.– Т.15, № 3.– С. 403–406.
2. Хавинсон В.Х., Малинин В.В., Чалисова Н.И., Григорьев Е.И. Тканеспецифическое действие пептидов в культуре тканей крыс разного возраста // Успехи геронтологии.– 2002.– Вып. 9.– С. 278–285.
3. Пат. 64381А Україна, МПК<sup>7</sup> А61К35/12. Спосіб отримання екстрактів ксеногенних органів / С.Є. Гальченко, Н.Ю. Шкодовська, Б.П. Сандомирський, В.І. Грищенко. Заявлено 22.05.2003; Опубл. 16.02.2004, Бюл. №2.
2. Khavinson V.Kh., Malinin V.V., Chalisova N.I., Grigoryev E.I. Tissue-specific activity of peptides in tissues culture of rats of different age // Uspekhi Gerontologii.– 2002.– Issue 9.– P. 278–285.
3. Patent 64381 A Ukraine, IPC<sup>7</sup> A61K35/12. Deriving method of xenogen organs extracts / S.E Galchenko, N.Yu. Shkodovskaya, B.P Sandomirskiy., V.I. Grischenko. Applied 22.05.2003; Publ. 16.02.2004. Bul. N2.

*Accepted in 13.05.2008*

*Надійшла 13.05.2008*