

## Взаємодія екстрактів кріоконсервованих фрагментів шкіри та селезінки з альбуміном та їх вплив на молекулярно-масовий розподіл пептидів в екстрактах шкіри шурів

UDC 612.015.21:543.41.5

YU.M. SAFRANCHUK<sup>1</sup>, E.O. LEBEDA<sup>1</sup>, I.A. SALIENKO<sup>2\*</sup>

### Interaction of Extracts of Cryopreserved Skin and Spleen Fragments with Albumin and Their Effect on Molecular Mass Distribution of Peptides in Rat Skin Extracts

Розроблено спосіб одержання водно-солевих екстрактів ксеногенних органів з використанням кріобіологічних технологій [1]. Їх висока біологічна активність при різних патологічних станах може бути пов'язана з наявністю в них регуляторних пептидів [1, 4, 5]. Показано, що екстракти шкіри та селезінки нормалізують процес загоєння опікових та холодкових ран. При цьому препарати вводилися безпосередньо в зону рани [1].

Вважається, що використання препаратів, які містять вільні пептиди, в клінічній практиці утруднене перш за все через їх швидке розщеплювання протеазами крові. Проте в зв'язаному стані, в першу чергу з альбуміном сироватки крові, такі пептиди не піддаються деградації і можуть, після введення в організм, поступати в незміненому вигляді до відповідних органів і клітин [2].

Метою роботи було дослідити взаємодію складових екстрактів кріоконсервованих фрагментів шкіри новонароджених поросят і селезінки свиней з альбуміном сироватки крові методом спектрофлуориметрії та їх вплив на пептидний спектр шкіри шурів при введенні в черевну порожнину.

#### 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).

Екстракти отримували з фрагментів шкіри новонароджених поросят і селезінки свиней, кріоконсервованих зі швидкістю охолодження 1°C/хв

The method of obtaining of aqueous-saline extracts of xenogeneic organs using cryobiological technologies has been developed [1]. Their high biological activity under various pathological states may be related to the presence in them of regulatory peptides [1, 4, 5]. It has been shown that skin and spleen extracts normalize the process of healing of burns and cold wounds. Herewith the preparations were introduced directly into the wound zone [1].

It is considered that the use of preparations comprising free peptides in clinical practice is more difficult because of their rapid cleavage by blood proteases. However in a bound state firstly with albumin of blood serum these peptides are not subjected to degradation and after being introduced into organism may enter as unchanged ones to corresponded organs and cells [2].

The research aim is to investigate the interaction of the extract components of cryopreserved fragments of newborn piglets' skin and pig's spleen with albumin of blood serum by spectrofluorimetry and their effect on peptide spectrum of rats' skin when being introduced into peritoneal cavity.

#### Materials and methods

The experiments were performed according to "General principles of experiments in animals", approved by the 2<sup>nd</sup> National Congress on Bioethics (Kyiv, Ukraine, 2004) and conformed with the statements of "European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes" (Strasbourg, 1985).

The extracts were derived from skin fragments of newborn piglets and pigs' spleen, cryopreserved with cooling rate of 1°C/min by means of their incubation in physiological solution [3]. PEO-1500 under 10% concentration was used as a cryoprotectant. The

<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 57 372 7435, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

шляхом їх інкубації в фізіологічному розчині [3]. Як кріопротектор був використаний ПЕО-1500 в концентрації 10%. Екстракти вводили в черевну порожнину щурів з розрахунку 500 мкг пептидів на кілограм маси тварини. Для отримання екстракту шкіри щурів її подрібнювали та інкубували в фізіологічному розчині протягом 60 хв.

Для визначення молекулярно-масового розподілу низькомолекулярних фракцій речовин пептидної природи використовували метод вискоефективної гельпроникаючої хроматографії. Спектри флуоресценції (СФ) отримували на спектрофлуориметрі Varian Cary Eclipse. Обробку спектрів проводили в програмі Microcal Origin 6.0.

Результати статистично обробляли за допомогою пакета програм Statistica for Windows 5.1.

### Результати та обговорення

При дослідженні екстрактів шкіри та селезінки спектрофлуориметричним методом було встановлено, що їх СФ знаходяться в межах 290–450 нм. При збудженні світлом з довжиною хвилі 280 нм максимум СФ знаходиться у межах 340–354 нм, що може свідчити про наявність в екстрактах залишків триптофану, або доступних розчиннику, або таких, що знаходяться у вільному стані.

Враховуючи, що основним транспортним білком плазми крові є сироватковий альбумін [2], нами було досліджено взаємодію складових екстрактів з альбуміном. Додавання екстрактів шкіри та селезінки до розчину альбуміну призводило до гасіння власної флуоресценції альбуміну ( $\lambda_{\text{збудж}} = 280$  нм) і впливали на стан триптофанових залишків білка ( $\lambda_{\text{збудж}} = 296$  нм).

Подібний вплив, який спостерігається, зокрема, при зв'язуванні деяких низькомолекулярних лігандів з альбуміном, може розглядатися як доказ зв'язування компонентів екстрактів з цим білком. У цьому випадку спалах триптофанової флуоресценції може відобразити зменшення полярності мікрооточення залишків триптофану або їх переміщення на більшу відстань відносно тирозинів, внаслідок чого знижується гасящий вплив тирозинів на флуоресценцію триптофану [6].

Такі спектральні зміни відбивають, мабуть, процес перенесення енергії між хромофорними групами білків і екстракту, в першу чергу, з тирозинових залишків білків на триптофанові залишки пептидів екстракту. Оскільки ефективність перенесення енергії прямо пропорційна відстані між хромофорами, можна припустити, що між молекулами досліджуваних білків і компонентами екстракту здійснюється близька взаємодія, яка може свідчити про утворення комплексу білок-пептиди екстракту.

Отже, проведені дослідження показують факт прямої взаємодії компонентів екстрактів з альбу-

extracts were introduced into peritoneal cavity of rats at 500  $\mu\text{g}$  of peptides per kilogram of animal's mass. To obtain the extract of rat's skin it was disintegrated and incubated in physiological solution for 60 mins.

To reveal molecular-mass distribution of low molecular fractions of the substance of peptide origin the method of highly effective gel-penetrating chromatography was used. Fluorescence spectra (FS) were obtained with Varian Cary Eclipse spectro-fluorimeter. The spectra were processed by means of Microcal Origin 6.0 program.

The results were statistically processed using the Statistica for Windows 5.1 software.

### Results and discussion

When examining the skin and spleen extracts with spectrofluorimetric method there was found that their FS were within the range of 290–450 nm. At the light-excitation with wavelength of 280 nm the maximum of FS is within the range of 340–354 nm, that may testify to the presence of tryptophan rests in extracts, either available to solvent or those been in a free state.

Taking into account that the main transport protein of blood plasm is serum albumin [2] there was studied the interaction of the components of extracts with albumin. Adding of skin and spleen extracts to the albumin solution resulted in the quenching of own albumin fluorescence ( $\lambda_{\text{exc}} = 280$  nm) and affected the state of tryptophan rests of protein ( $\lambda_{\text{exc}} = 296$  nm).

The similar effect which is observed, in particular, during binding of some low molecular ligands with albumin may be considered as a proof of binding the extract's components with this protein. In this case the burst of tryptophan fluorescence testifies to the reduction of the microenvironment polarity of tryptophan rests on their relocation to bigger distance in respect of tyrosines, leading to the decrease of the effect of tyrosines on tryptophan fluorescence [6].

These spectral changes likely reflect the process of energy transfer between chromophore groups of proteins and the extract primarily, from tyrosine rests of proteins to tryptophan ones of extract's peptides. Since the efficiency of energy transfer is directly proportional to the distance between chromophores, one may admit that between molecules of albumin and extract's components there is a close interaction which may testify to the creation of the protein-extract's peptides complex.

Thus, the performed research demonstrates the fact of a direct interaction of extract components with blood serum albumin, resulting in albumin conformational changes, but additional studies are necessary to specify the mechanisms of this interaction.

One of the approaches to estimate the composition of the extracts may be the analysis of their synchronous spectra which are sensitive to the change in microenvironment state of tryptophan and tyrosine rests in

міном сироватки крові, що призводить до конформаційних змін альбуміну, проте для конкретизації механізмів цієї взаємодії необхідні додаткові дослідження.

Одним з підходів до оцінки складу екстрактів може бути аналіз їх синхронних спектрів, які чутливі до зміни стану мікрооточення триптофанових і тирозинових залишків в білках та пептидах. Встановлено, що синхронні спектри дають можливість виявити не тільки розбіжності в складі екстрактів, що досліджуються, але й отримати їх індивідуальні спектральні топограми, які являють собою, по суті, спектральні характеристики відповідних екстрактів.

Також було встановлено, що при уведенні екстракту шкіри в черевну порожнину щурів на 3-ю добу спостерігається збільшення кількості піків на хроматограмі екстракту шкіри з 3 до 8 і зменшення їх кількості на 7-у добу. При введенні екстракту селезінки на 3-ю добу також збільшується кількість піків на хроматограмі, але на 7-у добу їхня кількість стає ще більшою. Це може свідчити про різний механізм впливу цих екстрактів на фізіологічний стан клітин шкіри, що відбивається на пептидному складі екстрактів шкіри.

## Висновки

Одержані результати показують факт прямої взаємодії компонентів екстрактів шкіри та селезінки з альбуміном сироватки крові. Встановлена можливість ідентифікувати екстракти по топограмах їх синхронних спектрів. Уведення екстрактів у черевну порожнину щурів призводить до зміни молекулярно-масового розподілу речовин пептидної природи в екстрактах шкіри тварин.

## Література

1. Гальченко С.Є. Екстракти кріоконсервованих фрагментів ксеноорганів: одержання та біологічна дія // Пробл. кріобіології.– 2005.– Т. 15, №3.– С. 403–406.
2. Демченко А.П. Люминесценція и динамика структуры белков.– Киев.: Наук. думка, 1988.– 277 с.
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.
4. Obminska-Mrukowicz B., Piekarska J., Szczyпка M. et al. Modulatory effects of calf thymus extract on the subset of T lymphocytes in Trichinella spiralis-infected mice // Pol. J. Vet. Sci.– 2002.– Vol. 5, N4.– P. 243–249.
5. Kaufman S., Deng Y. Effect of splenic extract on plasma volume and renal function in the rat // Life Sci.– 1999.– Vol. 65, N24.– P. 2653–2662.
6. Reshetnyak Y.K., Burstein E.A. Decomposition of protein tryptophan fluorescence spectra into log-normal components. II. The statistical proof of discreteness of tryptophan classes in proteins // Biophys. J.– 2001.– Vol. 81, N3.– P. 1710–1734.

Надійшла 13.05.2008

proteins and peptides. It has been established that synchronous spectra enable the revealing of not only the difference in the composition of the extracts under investigation, but also the obtaining of their individual spectral characteristics of corresponded extracts.

It has been also found that during introduction of skin extract into rat's peritoneal cavity to the 3<sup>rd</sup> day an increase of the number of peaks on chromatogram of skin extract from 3 to 8 and decrease of their number to the 7<sup>th</sup> day were observed. During introduction of the spleen extract to the 3<sup>rd</sup> day the number of peaks on chromatogram is also increased and to the 7<sup>th</sup> day their quantity increases more. This may testify to a different mechanism of effect of these extracts on physiological state of skin cells that is reflected on peptide composition of skin extracts.

## Conclusions

The obtained results testify to a direct interaction of the components of skin and spleen extracts with albumin of blood serum. The possibility of identifying the extracts on topograms of their synchronous spectra was established. Introduction of extracts into peritoneal cavity of rats results in the change of molecular-mass distribution of peptide origin in skin extracts of animals.

## References

1. Galchenko S.E. Extracts of cryopreserved fragments of xenoorgans: obtaining and biological effect // Problems of cryobiology.– 2005.– Vol. 15, N3.– P. 403–406.
2. Demchenko A.P. Luminescence and dynamics of protein structure.– Kiev: Naukova dumka, 1988.– 277 p.
3. Patent 64381 A Ukraine, IPC<sup>7</sup> A61K35/12. Method of obtaining the extracts of xenogeneic organs/ S.Ye. Galchenko, N.Yu. Shkodovska, B.P. Sandomirsky, V.I. Grischenko; Applied in 22.05.2003; Publ. 16.02.2004. Bul. N2.
4. Obminska-Mrukowicz B., Piekarska J., Szczyпка M. et al. Modulatory effects of calf thymus extract on the subset of T lymphocytes in Trichinella spiralis-infected mice // Pol. J. Vet. Sci.– 2002.– Vol. 5, N4.– P. 243–249.
5. Kaufman S., Deng Y. Effect of splenic extract on plasma volume and renal function in the rat // Life Sci.– 1999.– Vol. 65, N24.– P. 2653–2662.
6. Reshetnyak Y.K., Burstein E.A. Decomposition of protein tryptophan fluorescence spectra into log-normal components. II. The statistical proof of discreteness of tryptophan classes in proteins // Biophys. J.– 2001.– Vol. 81, N3.– P. 1710–1734.

Accepted in 13.05.2008