

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І КРІОМЕДИЦИНИ**

БЕСПАЛОВА ІРИНА ГЕННАДІЇВНА

УДК:615.361.41.014.41+615.361.77.014.41]612.015.21.085.2:543.645.6

**ПЕПТИДНИЙ СКЛАД ТА БІОЛОГІЧНА ДІЯ ЕКСТРАКТІВ
КРІОКОНСЕРВОВАНИХ ФРАГМЕНТІВ СЕЛЕЗІНКИ СВИНЕЙ І ШКІРИ
ПОРΟΣЯТ**

03.00.19 – кріобіологія

**Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук**

Харків – 2016

Дисертацією є рукопис

Робота виконана в Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України

Науковий керівник: доктор біологічних наук, старший науковий співробітник Гальченко Сергій Євгенович, Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, провідний науковий співробітник відділу експериментальної кріомедицини, м. Харків.

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор Жегунов Геннадій Федорович, Харківська державна зооветеринарна академія, завідувач кафедри хімії та біохімії ім. проф. О.В. Чечоткіна факультету ветеринарної медицини, Харківська обл., Дергачівський р-н, смт Мала Данилівка;

доктор медичних наук, професор Олійник Григорій Анатолійович, Харківська медична академія післядипломної освіти, завідувач кафедри комбустіології, реконструктивної та пластичної хірургії, м. Харків.

Захист дисертації відбудеться «25» жовтня 2016 р о 13.30 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д. 64.242.01 при Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України за адресою 61015, Харків, вул. Переяславська, 23.

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України за адресою 61015, Харків-15, вул. Переяславська, 23.

Автореферат розісланий «___» _____ 2016 р.

Вчений секретар спеціалізованої
вченої ради, докт. біол. наук,
професор

Л.Ф. Розанов

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Відмороження – один із різновидів термічної травми, що виникає в результаті впливу негативних температур на тканини. Не дивлячись на те, що відмороження носять сезонний характер і зустрічаються значно рідше, ніж опіки, проблема їх лікування залишається актуальною як у мирний, так і воєнний час (Слесаренко С.В. и др., 2007; Скворцов Ю.Р. и др., 2002). Відмороження являють собою спектр пошкоджень від незворотного руйнування до зворотніх змін клітин, які спостерігаються після зігрівання (Лазаренко В.А. и др., 2013; Сандомирский Б.П. и др., 1981; Чадаев А.П. и др., 2005). Крім того, в даний час широко використовується кріохірургічний метод видалення новоутворень шкіри, кількість захворювань якими неухильно зростає (Пачес А.И., 2000; Kuflik E.G. et al., 1997). Отже, актуальною є також задача оптимізації процесу загоєння ран шкіри, які утворюються після кріодеструкції пухлин (Шенталь В.В. и др., 2001; Теплінська Т.В., 2005; Mac Auley D.C., 2001).

Можна констатувати, що багато питань, які стосуються патогенезу холодових ран, на даний момент не вирішені та потребують подальших досліджень (Емельянов А.Ю. и др., 2002; Бойко В.В. и др., 2010; Arford S., 2008). Розширення знань про патогенез травми сприяє покращенню результатів її лікування.

Загально визнано, що першочерговим завданням лікування термічної травми є найбільш повне та швидке відновлення пошкодженого шкірного покриву для попередження токсичних впливів, інфекційних ускладнень і зневоднення організму (Козинец Г.П. и др., 2005; Белоус А.М., 1992). Це може бути досягнуто, зокрема, за рахунок введення до складу комплексної терапії імунобіологічних препаратів (Арефьева Т.И. и др., 2012; Субота Н.П. та ін., 2005; Смирнов С.В. и др., 2003; Kinoshita M. et al., 2004).

Останнім часом у комбустіології все більше уваги приділяється дослідженням можливості використання клітинної терапії для оптимізації процесу лікування. Так, на доклінічному етапі була проведена експериментальна оцінка доцільності використання мезенхімальних стовбурових клітин для лікування ран в експерименті (Третьяк С.И. и др., 2012). Також у клінічній практиці використовується трансплантація ауто- або алогенних кератиноцитів і фібробластів із метою лікування опікових ран (Смирнов С.В. и др., 2003; Шумаков В.И. и др., 2002).

В останні десятиліття спостерігається бурхливий розвиток пептидоміки – одного з нових напрямів фізико-хімічної біології, у межах якого вивчають склад, функції, механізми утворення та елімінації біологічно активних фрагментів білків – пептидів. Вагомим результатом таких досліджень стала запропонована концепція «пептидних пулів» відповідно до якої, окрім добре досліджених пептидних гормонів, нейрорегуляторів, антибіотиків білкової природи, біологічні рідини та тканини організму містять набір пептидів, які утворюються з функціонально активних високомолекулярних білків шляхом тканинспецифічного ферментативного гідролізу (Говорун В.М., 2011).

Відомо, що тканиноспефічні пептиди беруть участь у підтриманні гомеостазу, зокрема, встановлена їх здатність регулювати процеси проліферації, диференціювання та загибелі клітин (Хавинсон В.Х., 2005). Компоненти пептидому здійснюють модулюючий вплив на функціонування всіх систем організму. Характерно, що даний вплив реалізується всім комплексом пептидів.

За даними літератури великий інтерес викликає перспектива використання в комбустіології препаратів, із такими пептидами, тому що вони мають унікальну сукупність фізіологічних властивостей (Аскарів Т.А. и др., 2003; Чорна І.О. та ін., 2002; Eming S.A. et al., 1999). Також показано, що екстракти кріоконсервованих фрагментів органів свиней і поросят стимулюють процеси репаративної регенерації при експериментальних патологічних станах (Гальченко С.Є., 2005).

Зв'язок роботи з науковими програмами. Робота виконана у відділі експериментальної кріомедицини ІПКіК НАН України в рамках науково-дослідних тем Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України: "Одержання екстрактів з кріоконсервованого ксеногенного матеріалу, їх склад та біологічна дія" (№ держреєстрації 0107U000539) та "Вплив низьких температур та екстрактів серця і селезінки на процеси некротизації і регенерації міокарду, судин та хряща" (№ держреєстрації 0112U003133).

Мета і задачі дослідження. Встановити вплив умов кріоконсервування фрагментів селезінки свиней та шкіри поросят на склад одержаних із них екстрактів і біологічну дію екстрактів у культурі фібробластів та на організм щурів із холодовою травмою шкіри.

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити такі задачі:

1. Визначити вміст та молекулярно-масовий розподіл пептидів в екстрактах кріоконсервованих фрагментів селезінки свиней (ЕСС) та шкіри новонароджених поросят (ЕШНП) в залежності від умов кріоконсервування.
2. Встановити роль ендогенних протеїназ в утворенні пептидів при інкубуванні фрагментів селезінки та шкіри.
3. Встановити вплив одержаних екстрактів на метаболічну та проліферативну активність фібробластів шкіри щурів у культурі.
4. Дослідити динаміку загоєння холодкових ран при уведенні тваринам ЕСС або ЕШНП.
5. Встановити вплив ЕСС або ЕШНП на молекулярно-масовий розподіл пептидів у екстрактах шкіри, лейкоцитарну формулу крові та інтенсивність вільнорадикального окислення ліпідів у щурів із холодовою травмою шкіри.

Об'єкт дослідження – склад та біологічна дія екстрактів кріоконсервованих фрагментів селезінки свиней та шкіри поросят.

Предмет дослідження – екстракти кріоконсервованих фрагментів селезінки свиней та шкіри поросят, а також їх вплив на метаболічну та

проліферативну активність фібробластів шкіри щурів та організм щурів із холодовою травмою.

Методи дослідження. При виконанні роботи використовували такі методи: спектрофотометричний для визначення концентрацій протеїнів та пептидів; спектрофлуориметричний для вивчення взаємодії складових екстрактів з альбуміном, в т.ч. з використанням флуоресцентних зондів; високоефективної гельпроникної хроматографії та матрично-активованої лазерної десорбції/іонізації для визначення молекулярно-масового розподілу пептидів в екстрактах; світлової мікроскопії; планіметричний, хемілномінесцентний, метод культивування фібробластів шкіри та визначення їх метаболічної та проліферативної активності, а також методи статистичної обробки результатів досліджень.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше досліджено вплив умов кріоконсервування фрагментів органів селезінки свиней та шкіри поросят на вихід пептидів у супернатант. Показано, що вихід пептидів із фрагментів, кріоконсервованих під захистом кріопротекторів ПЕО-1500 або ПЕО-400, був більший, ніж із некріоконсервованих або кріоконсервованих під захистом гліцерину. Показано, що молекулярно-масовий розподіл пептидів, які входять до складу екстрактів, є тканиноспецифічними. Вперше встановлено, що ендогенні протеїнази відіграють значну роль в утворенні пептидів при інкубації фрагментів органів. При внесенні до середовища інкубації інгібіторів протеїназ зменшується як загальна кількість, так і кількість низькомолекулярних пептидів, які виходять в супернатант.

На мас-спектрах екстрактів селезінки та шкіри, одержаних методом матрично-активованої лазерної десорбції/іонізації (МАЛДІ) з час-прольотним аналізатором, зареєстровано як спільні (м.м. 919 та 3391), так і характерні для кожного із екстрактів піки. При співставленні отриманих даних з пептидами, представленими в базі даних Protein Knowledgebase (UniProtKB) встановлено, що в екстрактах виявляються пептиди з відповідною біологічною активністю.

Показано, що пептиди екстрактів зв'язуються з альбуміном сироватки крові.

Встановлено, що при додаванні екстрактів кріоконсервованих фрагментів селезінки свиней або шкіри поросят в середовище культивування фібробластів шкіри щурів збільшується їх метаболічна та проліферативна активність. При цьому спостерігається дозозалежний ефект. При концентрації ембріональної телячої сироватки (ЕТС) 2% у середовищі культивування додавання ЕШНП дозволяє зберегти метаболічну активність клітин на рівні, який спостерігається в контрольних пробах з 10% сироватки. Додавання цього екстракту сприяє збільшенню метаболічної активності фібробластів після впливу гіпотермічної температури на клітини в культурі.

Вперше, в порівняльному плані, досліджено вплив уведення тваринам у черевну порожнину ЕСС або ЕШНП на процес загоєння холодкових ран. Показано, що обидва екстракти прискорюють загоєння холодкових ран, зменшують рівень вільнорадикального окислення ліпідів в організмі тварин із

холодовою травмою, рівень ТБКАП у сироватці крові і нормалізують реакцію імунної системи організму на холододову травму.

Практичне значення одержаних результатів. Проведені дослідження показують перспективність застосування ЕСС або ЕШНП у середовищах для культивування фібробластів шкіри, що зменшує ризик контамінації клітин вірусами від тварин та забруднення їх високомолекулярними білками сироватки крові, які можуть викликати імунну відповідь при введенні фібробластів в організм.

Ці екстракти можуть знайти використання при розробці імунобіологічних препаратів для застосування в комбустіології, та, можливо, в хірургічній практиці для лікування ран різного генезу.

Одержані результати можуть бути основою для подальшого визначення механізмів дії таких екстрактів, та більш детальних досліджень термінів та методів їх застосування при холододових та інших травмах шкіри.

Особистий внесок здобувача. Основні результати досліджень, які наведені в дисертації, одержані здобувачем особисто. Автором дисертаційної роботи, спільно з науковим керівником, визначені тема, мета, задачі роботи та методи досліджень. Основні результати досліджень, які наведені в дисертації, одержані здобувачем особисто. Статистична обробка, аналіз, інтерпретація та узагальнення одержаних результатів, а також формулювання основних положень і висновків проведені автором самостійно.

В опублікованих разом із співавторами роботах особистий внесок здобувача полягав у наступному:

у роботах [1, 2, 5, 21, 22, 25, 26, 27, 29] – планування та проведення експериментів по кріоконсервуванню фрагментів органів, одержання екстрактів, визначення концентрації та молекулярно-масового розподілу пептидів.

у роботах [7, 23, 28] – дослідження екстрактів спектрофлуориметричним методом;

у роботах [3, 8, 12, 14, 15, 16, 17, 19, 20] – одержання та культивування фібробластів шкіри щурів. Дослідження впливу екстрактів на метаболічну та проліферативну активність фібробластів у культурі;

у роботах [6, 9, 10, 11, 14, 24] – Дослідження динаміки загоєння холододових ран шкіри при введенні тваринам екстрактів, та їх вплив на молекулярно-масовий розподіл пептидів у екстрактах шкіри щурів, лейкоцитарну формулу крові та інтенсивність вільнорадикального окислення ліпідів у щурів із холодовою травмою шкіри;

у роботах [6, 9, 10, 11, 14, 24] – одержання та культивування фібробластів шкіри щурів. Дослідження впливу екстрактів на метаболічну та проліферативну активність фібробластів у культурі та на організм щурів з холодовою травмою.

При виконанні окремих розділів було отримано методичну та консультативну допомогу від канд. біол. наук, ст. наук. співр. О. Ю. Семенченка, канд. біол. наук, ст. наук. співр. Т. С. Дюбка (Інститут проблем кріобіології і кріомедицини), канд. хім. наук, ст. наук. співр. Т. Ю. Громова

(Інститут хімії поверхні імені О. О. Чуйка НАН України) і канд. хім. наук, ст. наук. спів. Л. Д. Паценкера (ДНУ «НТК Інститут монокристалів НАН України», м. Харків).

Мас-спектрометричні дослідження були проведені за підтримки центру колективного користування коштовними приладами «Мас-спектрометричний комплекс із лазерною десорбцією та іонізацією Autoflex II» на базі Інституту хімії поверхні імені О. О. Чуйка НАН України, Київ.

Апробація результатів дисертації. Матеріали роботи доповідались та обговорювались на 47 щорічній зустрічі спілки кріобіологів Cryo-2010 (Брістоль, Велика Британія, 2010); Конференції молодих вчених «Холод в біології і медицині – 2011» (Харків, 2011); Науково-практичній конференції «Биологические активные вещества: фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения» (Новий світ, АР Крим, 2011); Конференції молодих вчених «Холод в біології і медицині – 2012» (Харків, 2012); Міждисциплінарній науковій конференції «Адаптаційні стратегії живих систем» (Новий Світ, АР Крим, 2012); VII міжнародній конференції молодих науковців «Біологія: від молекули до біосфери» (Харків, 2012); Міжнародній конференції «Тиждень клітинних технологій» (м. Київ, 2013); Конференції молодих вчених «Холод в біології і медицині – 2013» (Харків, 2013); Міжнародній конференції «3 Конгрес хорватської фізіологічної спілки та 1 Регіональний конгрес фізіологічних спілок» (Рієка, Хорватія, 2013); Науково-практичній конференції з міжнародною участю «Актуальные вопросы биологии, экологии, медицины и фармакологии» (Дніпропетровськ, 2013); 25 Конференції Міжнародної спілки медичних інновацій та технологій. iSMET 2013 (Баден-Баден, Германія, 2013); Конференції молодих вчених «Холод в биологии и медицине – 2014: Актуальные вопросы криобиологии, трансплантологии и биотехнологии» (Харків, 2014); Конференції-конкурсі молодих вчених «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології – 2014» (Київ, 2014), 4 з'їзд Українського товариства клітинної біології з міжнародним представництвом (Ужгород, 2014); Школі-семінарі «Сцинтилляционные процессы и материалы для регистрации ионизирующего излучения» (Харьков, 2014); 50 щорічній науковій конференції SLTB-2014 (Лондон, Велика Британія, 2014), Конференції-конкурсі молодих вчених «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології – 2014», (Київ, 2014); Конференції молодих вчених «Холод в біології і медицині – 2015» (Харків, 2015); X Міжнародній конференції молодих науковців "Біологія: від молекули до біосфери" (Харків, 2015); 42 щорічному конгресі ESAO (Лювен, Бельгія, 2015).

Публікації. Основні положення дисертації викладені в 29 роботах: 7 статтях, опублікованих в фахових наукових виданнях, 21 тезах доповідей та 1 патенті.

Структура дисертації. Робота викладена на 129 сторінках. Вона має вступ, основну частину, яка складається з трьох розділів (огляд літератури, матеріали і методи дослідження, отримані результати та їх обговорення),

заклучення, висновки. Список використаної літератури складає 243 джерела і викладений на 31 сторінці. Дисертація містить 22 рисунки та 23 таблиці.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Дослідження проводились в Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України. Експерименти проводили за регламентом, затвердженим Комітетом з біоетики ІПКіК НАН України, який було розроблено відповідно до «Загальних принципів експериментів на тваринах», схвалених ІІІ Національним конгресом з біоетики (Київ, Україна, 2007) і узгоджених з положеннями «Європейської конвенції з захисту хребетних тварин, що використовуються в експериментальних та інших наукових цілях» (Страсбург, Франція, 1986).

При виконанні роботи використовували методи кріоконсервування фрагментів органів. Для цього до фрагментів селезінки та шкіри масою 2 – 5 мг по краплях додавали 20 або 40% розчин гліцерину, ПЕО-400 або ПЕО-1500 у фізіологічному розчині в співвідношенні 1:1, ретельно і обережно перемішуючи завись.

Завись фрагментів розфасовували в поліетиленові ампули об'ємом 20 мл. Заморожували за допомогою програмного заморожувача УОП-6 виробництва СКТБ з ДВ ІПКіК НАН України зі швидкістю охолодження 1°C/хв до температури –70°C з наступним перенесенням в рідкий азот. Матеріал відігрівали на водяній бані з температурою 37–40°C. Від гліцерину та ПЕО-400 фрагменти відмивали сахарозними середовищами тієї ж молярної концентрації, що і кінцева концентрація кріопротектора, а від ПЕО-1500 – фізіологічним розчином. Для одержання екстрактів розморожені фрагменти селезінки свиней та шкіри поросят інкубували в фізіологічному розчині 30, 60 та 90 хв. Фрагменти шкіри щурів інкубували в фізіологічному розчині 60 хв. Для видалення термолабільних протеїнів супернатант прогрівали на киплячій водяній бані 15 хв і очищували, пропускаючи через фільтрувальний папір. Загальну концентрацію протеїнів в екстрактах визначали модифікованим методом Лоурі. Концентрацію пептидів і нуклеотидів визначали спектрофотометричним методом при довжинах хвиль 280 нм і 260 нм відповідно. Для визначення молекулярно-масового розподілу низькомолекулярних фракцій пептидної природи використовували метод високоефективної геліпроникної хроматографії. Склад пептидів в екстрактах визначали методом МАЛДІ. Для інгібування протеїназ використовували суміш інгібіторів Protease Inhibitor Cocktail (Sigma–Aldrich, США). Проводили вивчення екстрактів та взаємодії їх компонентів з альбуміном та сироваткою крові спектрофлуориметричним методом. Первинну культуру фібробластів шкіри новонароджених щурів отримували шляхом вільного виселення клітин з фрагментів шкіри і наступного пересівання фібробластів. Клітини культивували в CO₂-інкубаторі при 37°C і 5% CO₂. В експериментах з екстрактами використовували клітини третього пасажу. Контроль метаболічної активності

клітин при культивуванні проводили за допомогою редокс-індикатора AlamarBlue (AbD Serotec, Велика Британія). Холодову рану шкіри моделювали мідним аплікатором діаметром 10 мм і температурою -196°C , експозиція – двічі по 30 сек. Екстракти тваринам вводили з розрахунку 500 мкг пептидів/кг маси в черевну порожнину 1 раз на добу. Площу ран визначали по цифрових зображеннях за допомогою програми Bio Vision. Для дослідження молекулярно-масового розподілу пептидів в шкірі щурів її клапоть розміром 10x10 мм забирали на відстані 50 мм від центра рани.

Аналіз лейкоцитарної формули проводили на мазках, забарвлених азур II – еозином за Романовським-Гімза, підраховуючи по 500 клітин у світловому мікроскопі (ЛОМО, об. x90, ок. x10). Кров для досліджень брали з хвостової вени тварин. Розраховували лейкоцитарний індекс інтоксикації модифікований (ЛІМ) та індекс зсуву лейкоцитів крові (ІЗЛК) (Островский В.К., 2006).

Рівень перекисного окислення ліпідів визначали за рівнем ТБКАП в сироватці крові. Визначали також світлосуму хемілюмінесценції, індукованої H_2O_2 та Fe^{2+} . Аналіз лейкоцитарної формули проводили на мазках, забарвлених азур II – еозином за Романовським-Гімза. Статистичну обробку результатів проводили непараметричним методом MANOVA.

РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

Дослідження складу екстрактів фрагментів шкіри новонароджених поросят та селезінки свиней. Концентрацію пептидів визначали у екстрактах, які одержували з некріоконсервованих фрагментів селезінки свиней та шкіри поросят (контроль) і кріоконсервованих під захистом кріопротекторів гліцерин, ПЕО-400 та ПЕО-1500.

Після 30 хв інкубації кріоконсервованих фрагментів органів концентрація пептидів у супернатанті була статистично значимо більшою порівняно з контролем, за винятком фрагментів шкіри поросят, кріоконсервованих у присутності гліцерину. Після інкубації протягом 60 хв концентрація пептидів збільшувалася у всіх випадках. Вихід пептидів із фрагментів селезінки свиней та шкіри поросят, кріоконсервованих із ПЕО-1500, був більший, ніж із некріоконсервованих або кріоконсервованих під захистом гліцерину. Не спостерігалось відмінностей у концентрації пептидів при інкубації фрагментів, кріоконсервованих у присутності ПЕО-400 або ПЕО-1500. При цьому статистично значимо збільшувалася концентрація пептидів порівняно з 30 хвилинами інкубації. Після 90 хвилин інкубації збільшення концентрації пептидів не спостерігалось в жодному з випадків порівняно з попереднім строком інкубації.

При інкубації, як контрольних, так і кріоконсервованих (кріопротектор ПЕО-1500) в присутності інгібіторів протеїназ (ІП) фрагментів органів, концентрація пептидів у супернатанті статистично достовірно менша, ніж коли інкубація проводилася без їх додавання. Це свідчить про значну роль ендогенних протеїназ в утворенні пептидів. При інкубуванні кріоконсервованих фрагментів кількість низькомолекулярних пептидів в

екстрактах більша, ніж при інкубуванні некріоконсервованих. Це може бути пов'язано з активацією протеїназ у кріоконсервованих фрагментах. Було встановлено, що в ЕСС та ЕШНП при інкубації фрагментів у присутності ІІ зменшується відносна кількість низькомолекулярних пептидів і збільшується кількість високомолекулярних (табл. 2).

Таблиця 1

Концентрація пептидів (мкг/мл) у супернатанті залежно від кріопротектора та часу інкубації контрольних і кріоконсервованих фрагментів органів

Орган	Кріо-протектор	Час інкубації, хв		
		30	60	90
Селезінка свиней	Контроль	18,1±1,2	42,7±3,5 ²	54,4±4,9
	Гліцерин	27,4±2,3	60,6±5,1 ²	66,5±6,1 ¹
	ПЕО-400	34,5±3,2	71,6±6,8 ²	91,3±7,2 ³
	ПЕО-1500	39,4±3,3 ³	92,8±7,4 ^{2,3}	111,6±9,8 ³
Шкіра поросят	Контроль	10,8±1,2	25,4±2,1 ²	29,5±2,2
	Гліцерин	13,6±1,1 ¹	30,6±2,5 ^{1,2}	44,2±3,8 ¹
	ПЕО-400	20,8±1,7 ³	42,3±3,7 ²	54,7±4,6
	ПЕО-1500	29,5±2,4 ^{3,4}	55,2±4,5 ^{2,3}	66,9±6,1 ³

Примітки: 1 – відмінності статистично недостовірні порівняно з контролем, $p > 0,05$; 2 – відмінності статистично достовірні порівняно з попереднім часом інкубації, $p < 0,05$; 3 – відмінності статистично достовірні порівняно з таким же часом інкубації фрагментів, кріоконсервованих із гліцерином, $p < 0,05$; 4 – відмінності статистично достовірні порівняно з таким же часом інкубації фрагментів, кріоконсервованих із ПЕО-400, $p < 0,05$.

Для подальшого дослідження нами були вибрані екстракти, отримані з кріоконсервованих після додавання до фрагментів шкіри поросят та селезінки свиней 20% розчину ПЕО-1500 найбільшу кількість пептидів і не потребують відмивання від кріопротектора сахарозним розчином. Характерними особливостями молекулярно-масового розподілу пептидів в цих екстрактах, поперше, є різна кількість піків на хроматограмах, а саме 5 піків в екстракті шкіри поросят і 4 піки – в екстрактах селезінки свиней (табл.3).

Таблиця 2

Вміст пептидів (%) у різних діапазонах молекулярних мас в екстрактах залежно від умов експерименту

Орган	Діапазон молекулярних мас	Умови експерименту			
		Контроль	Контроль+ ІІ	Кріоконсервовані фрагменти	Кріоконсервовані фрагменти +ІІ
Селезінка	> 10000	30,2±2,2	41,2±4,0	23,1±2,0	39,1±3,6
	> 2000–7000	3,4±2,8	1,8±0,1	–	0,9±0,1

свиней	> 1100–2000	26,0±2,3	41,1±3,5	22,5±2,1	37,4±3,2
	< 1100	40,4±3,6	15,9±1,2	54,3±5,3	22,6±2,2
Шкіра поросят	> 10000	49,4±4,1	53,2±5,3	37,2±3,2	50,3±5,7
	> 2000–7000	19,4±1,4	33,1±3,2	19,5±1,6	27,9±2,4
	> 1100–2000	10,8±1,0	6,2±0,5	14,6±1,2	9,3±0,7
	< 1100	20,4±1,9	7,5±0,8	28,3±2,4	12,5±1,2

Слід відмітити, що на хроматограмах екстракту шкіри поросят реєструється пік A₅, котрий відповідає середній молекулярній масі речовин пептидної природи 4800. Цей пік відсутній на хроматограмах екстрактів селезінки свиней.

Таблиця 3

Питома площа фракцій пептидів (%) різної молекулярної маси в екстрактах шкіри поросят та селезінки свиней

Пік	Молекулярна маса	Питома площа	
		Шкіра поросят	Селезінка свиней
P	> 10000	37,2±2,9	23,1±1,6
A ₅	4800	19,5±1,5	–
F ₁	1300	6,7±0,5	22,5±1,8
G	1100	8,3±0,6	8,1±0,6
H	800	28,3±2,2	46,2±3,6

Методом МАЛДІ встановлено, що в ЕСС та ЕШНП реєструється два піки пептидів, спільних для обох екстрактів, з відношенням маси до заряду (m/z) 919 та 3391. Інші піки є індивідуальними для кожного з екстрактів. Значна кількість зареєстрованих в екстрактах пептидів може проявляти відповідну біологічну активність. Так, з отриманих даних можна припустити, що пептид з m/z 4966 зареєстрований в ЕСС відповідає Myocyte enhancer factor 2D. Він відіграє роль в контролі клітинного росту та апоптозу. Cathepsin B (зареєстроване m/z 3720) відноситься до ферментативних білків–протеїназ. Таким чином в екстрактах виявляються пептиди з різноманітною біологічною активністю. Крім наведених, в екстрактах виявляються інші пептиди з різноманітною біологічною активністю. Були також зареєстровані пептиди, які не вдалося співставити з якимись пептидами, тому що на даний час у базі даних відсутні пептиди з такими молекулярними масами.

Таким чином, отримані дані можуть бути використані для ідентифікації або стандартизації екстрактів при наступних дослідженнях та для з'ясування структури пептидів, що входять до складу екстрактів, за їх молекулярними масами. Дані по наявності відповідних пептидів і їх біологічній активності можуть знайти використання при з'ясуванні механізму стимуляції процесу регенерації екстрактами при відповідних патологічних станах.

Спектрофлуориметричне дослідження ЕСС та ЕШНП і взаємодії їх компонентів з альбуміном сироватки крові. Вважається, що використання

препаратів, які містять вільні пептиди, в клінічній практиці утруднене перш за все через їх швидке розщеплювання протеїназами 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 (Грызлов Ю.А., 1994). Для дослідження такого зв'язування широко використовуються методи спектрофлуориметричного дослідження, зокрема і з використанням флуоресцентних зондів.

Відмінності, які спостерігаються в спектрах флуоресценції екстрактів, підтверджують дані, що в їх склад входять пептиди, що розрізняються як по своєму кількісному співвідношенню, так і по амінокислотному складу. Одержані дані підтверджують можливість ідентифікації екстрактів по топограмах їх синхронних спектрів.

Додавання екстрактів до розчину альбуміну суттєво впливало на спектральні характеристики протеїну, зокрема викликало гасіння його власної флуоресценції ($\lambda_{\text{збудж}} = 280$ нм), та впливало на стан триптофанових залишків протеїну ($\lambda_{\text{збудж}} = 296$ нм). Встановлено, що флуоресцентні зонди (К-35, Е-176, К8-3000 і К8-1300) і компоненти екстрактів мають на молекулі сироваткового альбуміну спільні центри зв'язування. Таким чином, наведені результати свідчать про безпосередню взаємодію складових екстрактів з альбуміном сироватки крові, що призводить до зміни сорбційної здатності цього протеїну.

Дослідження впливу екстрактів кріоконсервованих фрагментів селезінки свиней і шкіри поросят на метаболічну та проліферативну активність фібробластів шкіри щурів у культурі. При додаванні ЕШНП або ЕСС у середовище культивування фібробластів шкіри щурів збільшується їх метаболічна активність. Крім того, додавання ЕШНП у середовище культивування фібробластів забезпечує можливість знизити концентрацію ЕТС без втрати метаболічної активності клітин. При концентрації ЕТС 2% додавання ЕШНП дозволяє зберегти метаболічну активність клітин на рівні, який спостерігається в контрольних пробах із 10% ЕТС (табл. 4).

Додавання ЕШНП сприяє збільшенню метаболічної активності фібробластів після впливу гіпотермічної температури на клітини.

Дослідження впливу екстрактів кріоконсервованих фрагментів селезінки свиней та шкіри поросят на динаміку загоєння холодних ран.

Нами були проведені дослідження по визначенню швидкості загоєння холодних ран у щурів, яким вводили ЕШНП, ЕСС або фізіологічний розчин. На 3 добу експерименту статистично достовірних відмінностей в площі ран контрольної та дослідних груп не спостерігалось (табл. 5).

Таблиця 4

Кількість клітин ($\times 10^3$) на лунку залежно від умов експерименту

Концентрація ЕТС та пептидів в	Доба інкубування
--------------------------------	------------------

середовищі інкубування	2	5	7
10% ЕТС	10,1 ± 0,6	15,9 ± 0,8	21 ± 1,4
2% ЕТС	10,4 ± 0,7	11,8 ± 0,6*	13,1 ± 1,1*
2% ЕТС+1 мкг/мл пептидів ЕШНП	10,2 ± 0,6	14,2 ± 0,7	18,3 ± 1,2
2% ЕТС+1 мкг/мл пептидів ЕСС	10,1 ± 0,4	11,5 ± 0,8*	12,4 ± 0,9*

Примітки: * – відмінності статистично достовірні порівняно з 10% ЕТС, $p < 0,05$; кількість внесених в лунку клітин – $10,0 \times 10^3$.

Таблиця 5

Площа холодкових ран (см^2) у щурів залежно від умов експерименту

Термін спостереження, доба	Умови експерименту		
	Контроль	Введення ЕСС	Введення ЕШНП
3	4,5 ± 0,4	3,8 ± 0,3	3,7 ± 0,4
7	3,4 ± 0,3	2,8 ± 0,2*	2,3 ± 0,2*
14	2,3 ± 0,3	0,8 ± 0,1*	0,6 ± 0,1*
21	1,5 ± 0,1	0,5 ± 0,1*	Загоєння

Примітка. * – відмінності статистично достовірні порівняно з контролем, $p < 0,05$.

На 7 добу площа ран у тварин із введенням ЕСС та ЕШНП в 1,2 та 1,5 рази менша ніж у контрольних тварин. А на 14 добу вже в 2,9 та 3,8 рази відповідно менше ніж в контролі. Отже, починаючи з 7 доби площа ран у тварин, яким вводили ЕШНП або ЕСС, статистично достовірно менша, ніж у контрольних щурів. Таким чином, досліджувані екстракти прискорюють загоєння холодкових ран в експерименті.

Також нами був вивчений молекулярно-масовий розподіл пептидів в екстрактах шкіри щурів в нормі та при холодковій травмі і уведенні екстрактів. Через 1 добу після нанесення холодкової рани, кількість піків на хроматограмах екстрактів шкіри збільшується з 3 в нормі до 9. На 3 добу експерименту в контролі кількість піків на хроматограмах зменшується до 6, при введенні тваринам ЕСС кількість піків також становить 6, але відсутній пік A_3 , при наявності піка А. У тварин, яким вводили ЕШНП, кількість піків – 4. На 14 добу у тварин, яким вводили екстракти, спектр пептидів практично нормалізувався, а в контролі ще спостерігається пік A_3 .

Дослідження лейкоцитарної формули має велике значення для визначення вираженості процесу запалення, оцінки стану організму та ефективності терапії. На 3 добу після нанесення холодкової травми лейкоцитарний індекс інтоксикації модифікований (ЛІІМ) перевищував норму в 4,6–5,1 рази. При цьому, відмінності в величині цього індекса між контрольною та дослідними групами були незначними. Найбільш виражені

відмінності ЛПМ були на 7 добу експерименту. У щурів контрольної групи спостерігалось подальше його збільшення з 0,66 до 1,02; у тварин, яким вводили екстракти – спостерігалось зменшення ЛПМ порівняно із 3 добою. При введенні тваринам з холодовою травмою ЕСС індекс інтоксикації склав 41%, а при введенні ЕШНП – 46% від значень у контролі. На 14 добу цей індекс зменшувався в усіх групах тварин. На 21 добу у тварин, яким вводили ЕСС цей показник повертався до норми. Виходячи з приведених даних, можна зробити висновок, що екстракти зменшують вираженість деструктивних процесів у шкірі при холодовій травмі (табл. 6).

На 3 добу після нанесення холодової травми індекс зсуву лейкоцитів крові (ІЗЛК) перевищував норму в 3,6 – 4,2 рази. Найбільш виражені відмінності ІЗЛК були на 7 добу експерименту. У щурів контрольної групи спостерігалось подальше його збільшення з 1,01 до 1,49; у тварин, яким вводили екстракти, відбувалося зменшення величини ІЗЛК порівняно з 3 добою.

Таблиця 6

Величина ЛПМ у щурів залежно від умов експерименту та строку спостереження.

Умови експерименту	Строк спостереження, доба			
	3	7	14	21
Норма	0.15			
Контроль	0,66	1,02	0,42	0,29
Введення ЕСС	0,58	0,42	0,34	0,15
Введення ЕШНП	0,77	0,47	0,40	0,21

При введенні тваринам з холодовою травмою ЕСС величина ІЗЛК склала 34%, а при введенні ЕШНП – 46% від значень у контролі. На 14 добу цей індекс зменшувався в усіх групах тварин. На 21 добу у тварин, яким вводили ЕСС та ЕШНП цей показник повертався до норми. Це може свідчити про те, що введення екстрактів тваринам з травмою зменшує вираженість запального процесу.

Реакції перекисного окислення ліпідів є вільнорадикальними та постійно відбуваються в організмі і активуються при багатьох патологічних станах. На 3 добу експерименту рівень ТБКАП в усіх групах перевищував норму в 1,3 – 1,7 рази. Рівень ТБКАП у контрольній групі на 7 добу продовжував зростати з 7,1 до 8,9 мкмоль/л, а в групах з введенням ЕСС та ЕШНП зменшувався. Так при додаванні ЕСС рівень ТБКАП склав 51%, а при додаванні ЕШНП – 64% від контролю. Вже на 14 добу експерименту в групах з введенням ЕСС та ЕШНП рівень ТБКАП нормалізувався, а в контрольній групі нормалізація відбулась лише на 21 добу.

Флуоресцентні зонди використовуються для діагностики та прогнозу розвитку захворювань, виявлення факторів ризику та контролю ефективності лікування. На здатності низькомолекулярних лігандів витіснити флуоресцентний зонд К-35 з центрів зв'язування на молекулі сироваткового альбуміну заснований метод визначення ступеня інтоксикації організму.

Відомо, що К-35 практично не флуоресцює у воді. У сироватці крові цей зонд зв'язується з активними центрами альбуміну, тобто переходить з води в альбумін, і такі зв'язані молекули зонда флуоресцюють. На 3 добу в усіх експериментальних групах інтенсивність флуоресценції цього зонда в 1,5 – 1,7 рази нижча ніж в нормі. На 14 добу в групах з введенням екстрактів цей показник досягає норми, тоді як в контрольній групі нормалізація інтенсивності флуоресценції відбувається лише на 21 добу експерименту. Отже у тварин, яким вводили екстракти, зменшується навантаженість альбуміна сироватки крові лігандами.

Висновки

Як показує аналіз літературних даних, значна увага приділяється проблемі одержання пептидних біорегуляторів та вивченню їхньої біологічної активності. Це обумовлено тим, що таку пептиди можуть впливати на проліферативну активність клітин, і таким чином прискорювати процес репаративної регенерації.

В роботі наведені експериментальні дані по впливу кріоконсервування фрагментів селезінки свиней та шкіри поросят в присутності різних типів кріопротекторів на склад одержуваних з них екстрактів та по їх біологічній дії при додаванні в культуру фібробластів і при уведенні щурам з холодовою травмою шкіри.

1. Концентрація пептидів в супернатанті на 60 хв інкубації фрагментів селезінки свиней та шкіри поросят, кріоконсервованих під захистом ПЕО-1500, становила $92,8 \pm 7,4$ та $55,2 \pm 4,5$ мкг/мл відповідно. При інкубації контрольних фрагментів цих органів концентрація пептидів була $42,7 \pm 3,5$ та $25,4 \pm 4,5$ мкг/мл. Не спостерігалось достовірних відмінностей у концентрації пептидів при інкубації фрагментів, кріоконсервованих у присутності ПЕО-400 або ПЕО-1500. При цьому статистично достовірно збільшувалась концентрація пептидів на 60 хв порівняно з 30 хвилиною інкубацією. На 90 хвилину інкубації збільшення концентрації пептидів не спостерігалось в жодному з випадків порівняно з попереднім строком інкубації.

2. Встановлено, що спектри молекулярних мас пептидів, які входять до складу екстрактів кріоконсервованих фрагментів селезінки та шкіри, залежать від органа, з якого вони отримані. Характерними особливостями молекулярно-масового розподілу пептидів в цих екстрактах, по перше, є різна кількість піків, а саме 5 піків в екстрактах шкіри поросят і 4 піки – в екстрактах селезінки свиней. На хроматограмах екстракту шкіри поросят реєструється пік, котрий відповідає середній молекулярній масі речовин пептидної природи 4800. Цей пік відсутній на хроматограмах екстрактів селезінки свиней.

3. Встановлена значна роль ендогенних протеїназ в утворенні пептидів при інкубації фрагментів органів. При внесенні інгібіторів протеїназ до середовища інкубації нативних фрагментів селезінки свиней або шкіри поросят концентрація пептидів в супернатанті зменшується 2,9 та 3,6 рази відповідно. Для кріоконсервованих фрагментів таке зменшення становить 2,0 та 2,2 рази. При інкубуванні фрагментів в присутності інгібіторів протеїназ також зменшується відносна кількість низькомолекулярних пептидів.

4. На мас-спектрах екстрактів селезінки та шкіри, одержаних методом МАЛДІ, зареєстровано як спільні (м.м. 919 та 3391), так і характерні для кожного із екстрактів піки. При співставленні отриманих даних з пептидами, представленими в базі даних Protein Knowledgebase встановлено, що в екстрактах виявляються пептиди з різноманітною біологічною активністю.

5. Одержані дані свідчать про можливість ідентифікації екстрактів по топограмах їх синхронних спектрів та про зв'язування складових екстрактів з альбуміном сироватки крові, що проявляється зміною спектру флуоресценції цього протеїну, зокрема викликало гасіння власної флуоресценції альбуміну. Флуоресцентні зонди K-35, E-176, K8-3000 і K8-1300 проявляють високу чутливість до взаємодії компонентів екстрактів з альбуміном сироватки крові.

6. Вперше показано, що при додаванні екстракту шкіри або селезінки в середовище культивування фібробластів шкіри щурів збільшується їх метаболічна активність. При цьому спостерігається дозозалежний ефект. При концентрації ембріональної телячої сироватки 2% додавання екстракту шкіри дозволяє зберегти метаболічну активність клітин на рівні, який спостерігається в контрольних пробах з 10% сироватки. Додавання екстракту шкіри в середовище культивування сприяє статистично достовірному збільшенню метаболічної активності фібробластів після впливу гіпотермічної температури на клітини.

7. Уведення тваринам в черевну порожнину екстрактів прискорює загоєння холодових ран. Так, на 14 добу експерименту площа ран шкіри в контролі становила $2,3 \pm 0,3 \text{ см}^2$, при уведенні екстракту селезінки $2,8 \pm 0,2 \text{ см}^2$, а при уведенні екстракту шкіри – $0,8 \pm 0,1 \text{ см}^2$. У щурів, яким вводили екстракти зменшувався рівень вільнорадикального окислення ліпідів, а також рівень ТБКАП в сироватці крові. В більш ранні строки нормалізувалась реакція імунної системи організму на холодову травму.

ПЕРЕЛІК РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Молекулярно–масовий розподіл пептидів і їх спектральні характеристики в екстрактах шкіри щурів та сироватці крові в залежності від виду травми / Л.А. Рогоза, І.Г. Беспалова, І.А. Салієнко // Проблемы криобиологии – 2008. – Т. 18., №1. – С. 44–47.
2. Концентрація пептидів у екстрактах кріоконсервованих фрагментів органів свиней та поросят і роль ендогенних протеаз в їх утворенні / Л.А. Рогоза, І.Г. Беспалова, С.Є. Гальченко, О.Ю. Семенченко,

- Б.П. Сандомирский // Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2014. – Т. 24, № 2. – С. 132–139.
3. Organospecific influence of the extract of cryopreserved piglet's skin fragments / I. Bepalova, I. Belochkina, S. Galchenko, B. Sandomirsky // *Periodicum Biologorum*. – 2014. – V. 116, №1. – P. 99–103.
 4. Биологическая активность экстрактов животного происхождения при холодовых травмах кожи и в культуре фибробластов / И.Г. Беспалова, Е.О. Богатырева, А.В. Шиндер, И.В. Белочкина, С.Е. Гальченко, Б.П. Сандомирский // Научные ведомости Белгородского гос. ун-та. серия Естественные науки. – 2014. – № 10 (181), Вып. 27. – С. 107–113.
 5. MALDI–TOF study of peptides from cryopreserved tissue fragments / L. Rohoza, I. Bepalova, S. Galchenko, B. Sandomirsky // *CryoLetters*. – 2014. – Vol. 35, № 6. – P. 501 – 506.
 6. Вплив екстрактів кріоконсервованих фрагментів селезінки свиней та шкіри поросят на процес загоєння холодових ран у щурів / І.Г. Беспалова, Л.А. Рогоза, С.Є. Гальченко, Б.П. Сандомирський // Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2015. – Т. 25, № 2. – С.151–161.
 7. Використання флуоресцентних зондів для дослідження речовин пептидної природи в екстрактах кріоконсервованих фрагментів органів / І.Г.Беспалова, Л.А.Рогоза, Т.С.Дюбко А.Л.Татарець, І.Г.Єрмоленко, С.Є.Гальченко, Б.П.Сандомирський // Вісник Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна. Серія Біологія. – 2015. – № 1153. – С. 117–124.
 8. Пат. 81429 Україна, МПК С12N 5/00 Спосіб культивування фібробластів шкіри щурів / І.Г. Борисенко, І.В. Белочкина, С.Є. Гальченко, Б.П. Сандомирський; ІПКіК НАН України. – № u201301542; Заявлено 11.02.2013; Опубл. 25.06.2013. Бюл. № 12.
 9. Peptide regulation in cold wound healing / O.O. Bogatyryova, A.V. Shinder, N.Yu. Yermakova, I.G. Bepalova, S.E. Galchenko, J.E. Shevchenko, B.P. Sandomirsky // 47th Ann. Meeting of Soc. For Cryobiol. Cryo-2010 “Programme and Abstracts. 17–20 July 2010. Bristol.UK – P. 68 (P031).
 10. Пептидный состав кожи крыс при холодовой травме / Е.О. Богатырьова, И.Г. Беспалова, С.Е. Гальченко, Б.П. Сандомирский // Биологические активные вещества: фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения. Научно-практическая конференция. Тез. Докл. – Новый Свет, Крым 23–28 мая 2011. – Новый Свет. 2011. – С. 437.
 11. Пептидный состав кожи крыс при холодовой травме / И.Г. Беспалова, Е.О. Богатырева // Пробл. криобиологии. – 2011 – Т. 21. №2. – С. 230. (Тезисы конференции молодых ученых “Холод в биологии и медицине 2011” 18–19 мая 2011, г. Харьков.
 12. Вплив пептидного комплексу шкіри поросят на метаболічну активність фібробластів в культурі / І.Г. Борисенко // Проблемы криобиологии – 2012. – Т. 22, №2 – С. 206.

13. Вплив екстракту селезінки на пептидний склад шкіри щурів та процес загоєння холодкових ран / О.О. Богатирьова, І.Г. Борисенко, А.В. Шиндер, Н.Ю. Шкодовська, С.Є. Гальченко, Б.П. Сандомирський // Проблеми кріобіології – 2012. – Т. 22, № 3. – С. 349.
14. Органоспецифічний адаптивний вплив пептидного комплексу шкіри / О.О. Богатирьова, І.Г. Борисенко, І.В. Белочкіна, Т.С. Дюбко, С.Є. Гальченко, Б.П. Сандомирський. // Тезиси докладов Научно-практической конференции «Адаптационные стратегии живых систем», 11–16 июня, 2012, Новый свет, Украина – С. 141–142.
15. Органоспецифічний адаптивний вплив пептидного комплексу шкіри поросят на метаболічну активність фібробластів у культурі / І.Г. Борисенко // «Біологія: від молекули до біосфери». Матеріали VII Міжнародної конференції молодих учених (20–23 листопада 2012 р., м. Харків, Україна) – 2012. – С. 193–194.
16. Metabolic activity of fibroblasts in culture with adding the extract of cryopreserved skin fragments of newborn piglets and the extract of cryopreserved spleen fragment of pigs / I.G. Besspalova, I.V. Belochkina, S.E. Galchenko, B.P. Sandomirsky // Cell Technology Week, 2013, 14–17 may 2013, Conference Proceeding. K., 2013 – P. 29.
17. Дозозалежний вплив екстракту кріоконсервованих фрагментів шкіри поросят на метаболічну активність фібробластів шкіри в культурі / І.Г. Беспалова // Пробл. Кріобіології и криомедицины. – 2013. – Т. 23, № 2. – С. 181.
18. Biological effect of extract of cryoreserved newborn piglets' skin fragments in cold injury and when added to fibroblast culture / O.O. Bogatyryova, I.G. Besspalova, I.V. Belochkina, S.Ye. Galchenko, B.P. Sandomirsky // Minimally Invasive Therapy & Allied Technologies – 2013. – Vol. 22, № 1. – P. 54 (Abst. From the 25th Conf. Intern. Soc. For Medical Innovation and Technology. iSMET 2013, Baden-Baden, Germany).
19. Organospecific influence of the extract of cryopreserved piglets' skin fragments / Iryna Besspalova, Olena Bogatyryova, Alina Shynder, Iryna Belochkina, Sergiy Galchenko, Boris Sandomirsky // Abstract book of “3 Congress of Croatin Physiological Society and 1 Regional Congress of the Physiological Societies”, Zagreb, September, 2013, Period. biol., Vol. 115, № 2. – P. 17.
20. Склад та біологічна дія екстракту кріоконсервованих фрагментів шкіри поросят при додаванні в культуру фібробластів / І.Г. Беспалова, І.В. Белочкіна, С.Є. Гальченко, Б.П. Сандомирський // Матеріали Науково-практичної конференції з міжнародною участю «Актуальні питання біології, екології, медицини та фармакології» 26–27 вересня 2013, м. Дніпропетровськ, Україна, – С. 142.
21. Роль ендогенних протеаз в утворенні пептидів селезінки, серця, шкіри / Л.А. Рогоза, І.Г. Беспалова, С.Є. Гальченко, Б.П. Сандомирський // Матеріали конференції-конкурсу молодих вчених «Актуальні проблеми

- біохімії та біотехнології – 2014» 29–30 травня 2014, м. Київ, Україна, – С. 42.
22. Молекулярно-масовий розподіл пептидів у екстрактах кріоконсервованих фрагментів селезінки свиней та шкіри поросят / І.Г. Беспалова, Л.А. Рогоза // Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2014. – Т. 24, № 2. – С. 167.
 23. Использование флуоресцентных зондов для изучения взаимодействия пептидов из экстрактов кріоконсервированных фрагментов органов с альбумином. / Л.А. Рогоза, И.Г. Беспалова, А.Л. Татарец, И.Г. Ермоленко // Материалы школы–семинара «Сцинтиляционные процессы и материалы для регистрации ионизирующего излучения» 18–19 сентября 2014. – Харьков, Украина. – С. 26.
 24. Biological activity of extracts of pigs and piglets organs cryopreserved fragments/ I.G. Bepalova, L.A. Rohoza, A.G. Babaieva, I.V. Belochkina, S.Ye. Galchenko, B.P. Sandomirsky // Freezing biological time: 50th Anniversary Celebration, Annual Scientific Conference &AGM 8th–10th October 2014, London. – London, 2014. – P. 88.
 25. Connection of biological activity of piglets' skin and pigs' spleen extracts with their peptide composition / I. Bepalova, L. Rohoza, S. Galchenko, B. Sandomirsky // International Symposium on Cell Biology jointly with 4rd Ukrainian Congress for Cell Biology, 17th – 20th September 2014.: abstracts. – Uzhhorod, Ukraine, 2014. – P. 13.
 26. Роль ендогенних протеїназ в утворенні пептидів селезінки, серця, шкіри / Л.А. Рогоза, І.Г. Беспалова, С.Є. Гальченко, Б.П. Сандомирський // Укр. Вісн. Біохім. Ж. – 2014. – Vol. 86, №4. – P. 216 (Матер. конф.-конк. молод. вчених «Актуальні проблеми біохімії та біотехнології – 2014», 29–30 травня 2014 р., м. Київ).
 27. Дослідження складу екстрактів кріоконсервованих фрагментів шкіри та серця новонароджених поросят методом електрофорезу у трицин-ДСН-ПААГ/ І.Г. Беспалова, Л.А. Рогоза, М.С. Гірич // Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2015. – Т. 25, № 2. – С.180.
 28. Дослідження речовин пептидної природи в екстрактах кріоконсервованих фрагментів органів з використанням флуоресцентних зондів / І.Г. Беспалова, Л.А. Рогоза // X Міжнародна конференція молодих науковців "Біологія: від молекули до біосфери" (2–4 грудня 2015 року, м. Харків) – С. 123.
 29. Peptidic composition and biological action of extracts of cryopreserved fragments of piglets' heart and skin / L. Rohoza, I. Bepalova, N. Chizh, [et al.] // Abstracts from the XLII Annual ESAO Congress, 2 – 5 September 2015, Leuven, Belgium. The International Journal of Artificial Organs. – 2015. – Vol. 38, № 7. – P. 411.

АНОТАЦІЯ

Беспалова І.Г. Пептидний склад та біологічна дія екстрактів кріоконсервованих фрагментів селезінки свиней та шкіри поросят. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.19 – кріобіологія. – Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків – 2016.

В роботі наведені експериментальні дані по впливу кріоконсервування фрагментів селезінки свиней та шкіри поросят в присутності різних типів кріопротекторів на склад одержуваних з них екстрактів та по їх біологічній дії при додаванні в культуру фібробластів і при уведенні щурам з холодовою травмою шкіри.

Встановлено, що вихід речовин пептидної природи в розчин більший з фрагментів органів, кріоконсервованих під захистом поліетиленоксиду з м. м. 1500. Молекулярно–масовий розподіл пептидів в екстрактах залежить від органу, з якого вони отримані. Встановлена значна роль ендогенних протеїназ в утворенні пептидів при інкубації фрагментів органів.

Одержані дані свідчать, що при додаванні екстрактів кріоконсервованих фрагментів селезінки свиней або шкіри поросят в середовище культивування фібробластів шкіри щурів збільшується їх метаболічна та проліферативна активність.

Уведення тваринам в черевну порожнину екстрактів прискорює загоєння холодових ран. Досліджені екстракти зменшують рівень вільнорадикального окислення ліпідів в організмі тварин з холодовою травмою, а також рівень ТБКАП в сироватці крові і нормалізують реакцію імунної системи організму на холодову травму.

Ключові слова: кріоконсервування, фрагменти, селезінка, шкіра, екстракт, пептиди, холодові рани, культивування.

АННОТАЦИЯ

Беспалова И.Г. Пептидный состав и биологическое действие экстрактов креноксервированных фрагментов селезенки свиней и кожи поросят. – Рукопись.

Диссертация на соискание научной степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.19 – кробиология. – Институт проблем кробиологии и кримицины НАН Украины, Харьков – 2016.

В работе было изучено влияние креноксервирования в присутствии разных типов кривопротекторов на состав экстрактов креноксервированных фрагментов селезенки свиней (ЭСС) и кожи поросят (ЭКНП). Установлено, что выход веществ пептидной природы в раствор больше из фрагментов органов, креноксервированных под защитой полиетиленоксида с м. м. 1500. Молекулярно-массовое распределение пептидов в экстрактах зависит от органа, из которого они получены.

Установлена значительная роль эндогенных протеиназ в образовании пептидов при инкубации фрагментов органов. При внесении в среду инкубации ингибиторов протеиназ уменьшается как общее количество, так и количество низкомолекулярных пептидов.

На масс-спектрах ЭСС и ЭКНП, полученных методом МАЛДИ-ТоФ, зарегистрированы как общие (м.м. 919 та 3391), так и характерные для каждого из экстрактов пики. При сопоставлении полученных данных с пептидами, представленными в базе данных Protein Knowledgebase (UniProtKB) установлено, что в экстрактах обнаруживаются пептиды с разнообразной биологической активностью.

Полученные результаты свидетельствуют о непосредственном взаимодействии составляющих экстрактов с альбумином сыворотки крови. Исследованные флуоресцентные зонды (E-176, K8-3000 и K8-1300) проявляют высокую чувствительность к взаимодействию с альбумином сыворотки крови веществ пептидной природы, которые входят в состав экстрактов.

В работе было показано, что при добавлении экстракта кожи или селезенки в среду культивирования фибробластов кожи крыс увеличивается их метаболическая активность. При этом наблюдается дозозависимый эффект. При концентрации в среде инкубирования фибробластов 2% эмбриональной телячьей сыворотки добавление ЭКНП позволяет сохранить метаболическую активность клеток на уровне, который наблюдается в контрольных пробах с 10% сыворотки. Добавление ЭКНП способствует увеличению метаболической активности фибробластов после влияния гипотермической температуры на клетки.

Показано, что введение животным в брюшную полость исследованных экстрактов ускоряет заживление холодовых ран, снижает уровень свободно-радикального окисления липидов в организме животных с холодовой травмой, а также уровень ТБКАП в сыворотке крови и нормализует реакцию иммунной системы организма на холодовую травму.

Ключевые слова: криоконсервирование, фрагменты, селезенка, кожа, экстракт, пептиды, холодовые раны, культивирование.

SUMMARY

Bespalova I.G. Peptidic composition and biological action of extracts of cryopreserved fragments of pigs' spleen and piglets' skin. – Manuscript.

Dissertation for the candidate of biological sciences degree (PhD equivalent) in speciality 03.00.19 – cryobiology. – Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv – 2016.

The experimental data on the effect of cryopreservation of pigs' spleen and piglets' skin fragments in the presence of various types of cryoprotectants on the composition of the extracts derived from them and for their biological action when added to a culture of fibroblasts and when entering to rats with cold injury skin are presented in this work.

It was found that yielding of the substances of peptidic nature into solution was higher from the fragments of organs cryopreserved under protection of polyethylene oxide with m. w. 1,500. Molecular–mass distribution of peptides in extracts depended on the organ from which they are derived. There was established a significant role of endogenous proteases in the formation of peptides upon incubation of organ fragments.

The obtained data show that the addition of extracts from cryopreserved fragments of pigs' spleen and piglets' skin to the culture medium of rat skin fibroblasts increased their metabolic and proliferative activity.

The introduction of the studied extracts into the animals' abdominal cavity accelerates the healing of cold wounds. The investigated extracts reduce the level of free radical oxidation of lipids in animal organism with cold injury and TBAAP level in serum and they normalize the immune system reaction to cold wound.

Keywords: cryopreservation, fragments, spleen, skin, extract, peptides, cold wounds, culturing.

Підписано до друку _____ р. Формат 60.84/16
Наклад 100 прим. Авт. арк. 0,9. Замовлення №
Надруковано з макету замовника у

Свідоцтво про внесення суб'єкта до Державного реєстру
видавців та виготовників видавничої продукції