

УДК 616.127-005.8-092.9

І.І. Щенявський\*, І.Ф. Коваленко, О.К. Гулевський

## Кардіопротекторна дія низькомолекулярної фракції до 5 кДа криогемолізату кордової крові корів

UDC 616.127-005.8-092.9

I.I. Shcheniavsky\*, I.F. Kovalenko, O.K. Gulevsky

### Cardioprotective Effect of Low Molecular Weight (Below 5 kDa) Fraction of Cattle Cord Blood Cryohemolysate

**Реферат:** У роботі вивчали кардіопротекторну дію низькомолекулярної фракції (до 5 кДа) кордової крові корів на моделі інфарктоподібної кардіовазопатії у щурів. Розвиток інфаркту міокарда у тварин, яких утримували на спеціальній електролітно-жировій дієті, ініціювали шляхом створення у них стану гіпоксії-гіперкапнії. Використання вказаної моделі дозволило викликати інфарктоподібну кардіовазопатію, яку за багатьма показниками можна співставити з клінічною картиною інфаркту міокарда, що було підтверджено методами електрокардіографії, імуноферментного та гістологічного аналізів. Попереднє введення низькомолекулярної фракції (до 5 кДа) кордової крові корів так само, як і препарату «Актовегін», не запобігло інфаркту, але підвищувало витривалість щурів до впливу гіпоксії-гіперкапнії та зменшувало ступінь ураження міокарда. Доведено, що профілактичне введення низькомолекулярної фракції кордової крові зменшує ризик виникнення пошкоджень міокарда внаслідок впливу гіпоксії.

**Ключові слова:** інфаркт міокарда, модель, гіперліпідемія, гіпоксія, низькомолекулярна фракція кордової крові, «Актовегін».

**Abstract:** In this report, we have studied a cardioprotective effect of low molecular weight (below 5 kDa) fraction derived from cattle cord blood in a rat model of infarction-like cardiovascular pathology. The myocardial infarction development was initiated in the animals, maintained for two months on a diet with excessive intake of fat, calcium and sodium salts, by making hypoxia-hypercapnia in them. The use of this model allowed inducing the infarction-like cardiovascular pathology, comparable by many respects with the clinical picture of myocardial infarction, which was confirmed by electrocardiography, enzyme-linked immunosorbent assay and histological analysis. Preliminary administration of low molecular weight (below 5 kDa) fraction of cattle cord blood, as well as Actovegin did not prevent the heart attack, but increased the endurance of rats to hypoxia-hypercapnia and reduced the damage rate to myocardium. A preventive administration of low molecular weight fraction of cord blood was proven to mitigate the risk of hypoxia-induced damages to myocardium.

**Key words:** myocardial infarction, model, hyperlipidemia, hypoxia, low molecular weight fraction of cord blood, Actovegin.

Однією з основних причин інфаркту міокарда є недостатнє забезпечення його потреб у кисні. Гіпоксія міокарда призводить до патологічного порушення внутрішньоклітинного метаболізму: зменшення продукції основного енергетичного субстрату — молекул АТФ і активації процесів вільнорадикального (неферментативного) окислення. Наслідком цього є пригнічення функціональної активності кардіоміоцитів і пошкодження міокарда. Таким чином, гіпоксія — типовий патологічний процес, який визначає тяжкість перебігу та наслідків ішемічного ураження серця [8]. Тому зусилля багатьох дослідників направлені на пошук терапевтичних методів та засобів, здатних підвищувати стійкість міокарда до гіпоксії, що важливо для пацієнтів з груп ризику (ішемічна хвороба серця, кардіосклероз). Особливу увагу привертає висока біологічна активність низько-

An insufficient supply of myocardial oxygen demand is one of the most common causes of myocardial infarction. Myocardial hypoxia leads to pathological disturbance of intracellular metabolism, *i. e.* reduced production of the main energy substrate: ATP molecules and activated free radical (non-enzymatic) oxidation. As a result, the functional activity of cardiomyocytes is suppressed and the myocardium is damaged. So, the hypoxia is a common pathological process, determining the severity of course and consequences of ischemic damage to the heart [7]. Therefore, the efforts of many researchers are focused on finding the therapeutic ways and means to increase the myocardium resistance to hypoxia, that is important for patients of the risk groups (ischemic heart disease, cardiosclerosis). Special attention is drawn to a high biological activity of low molecular weight substances present

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків, Україна

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

\*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:

вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61016;  
тел.: (+38 057) 373-74-35, факс: (+38 057) 373-59-52  
електронна пошта: ivanhou11@gmail.com

\*To whom correspondence should be addressed:

23, Pereyaslavka str., Kharkiv, Ukraine 61016;  
tel.: +380 57 373 7435, fax: +380 57 373 5952  
e-mail: ivanhou11@gmail.com

Надійшла 10.06. 2021

Прийнята до друку 07.09.2022

Received 10, June, 2021

Accepted 07, September, 2022

© 2022 I.I. Shcheniavsky, *et al.* Published by the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

молекулярних речовин, які містяться в крові та тканинах молодих тварин та тканинах фетоплацентарного комплексу [1, 7, 9, 12, 15, 18, 19, 21]. Сьогодні широким попитом на фармацевтичному ринку користуються препарати, створені на основі безбілкових гемолізатів крові молочних телят віком до трьох місяців. Добре відомим препаратом є «Актовегін» (TAKEDA AUSTRIA, GmbH, Австрія), до складу якого входять речовини з молекулярною масою до 5 кДа (вуглеводи, амінокислоти, низькомолекулярні пептиди, ліпополісахариди, деривати нуклеїнових кислот та ін.) [12, 14, 17]. Поряд з цим встановлено, що низькомолекулярна фракція (до 5 кДа) кордової крові також має високий вміст біологічно активних речовин, однак її якісний склад дещо відрізняється від препарату «Актовегін» [6, 16]. Як показують результати досліджень, терапевтичні ефекти даної фракції, як і препарату «Актовегін», визначаються здатністю їх компонентів стимулювати споживання клітинами кисню та глюкози, що має велике значення для корекції багатьох патологічних станів [10, 16].

У зв'язку з вищевикладеним метою даної роботи було вивчення кардіопротекторної дії фракції до 5 кДа, отриманої з криогемолізату кордової крові корів.

### Матеріали та методи

Експерименти на тваринах проводили відповідно до Закону України «Про захист тварин від жорсткого поводження (№3447-IV від 21.02.2006) з дотриманням вимог комітету з біоетики інституту, узгоджених із положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986).

Заготівлю кордової крові корів (*Bos taurus*) симентальської породи здійснювали під час фізіологічно нормального отелення на молочно-товарних фермах ТОВ «Агрохаус Схід» Валківського району Харківської області з залученням ветеринарних лікарів або фельдшерів. Фракцію до 5 кДа криогемолізату кордової крові корів отримували методом ультрафільтрації з використанням мембранного модуля «Vivaflow 200» (Sartorius, Німеччина) [6].

У даному дослідженні використовували власну модель інфарктоподібної кардіовазопатії [11]. Враховуючи, що етіологія інфаркту міокарда людини майже завжди включає склеротичні зміни в серцевому м'язі та судинах, щурів попередньо утримували на спеціальній електролітно-жировій дієті з надлишковим вмістом жирів та солей кальцію і натру до розвитку у них гіпер-

in blood and tissues of young animals and tissues of fetoplacental complex [1, 2, 8, 9, 14, 15, 17, 21]. To date, pharmaceutical market shows a great demand in drugs based on protein-free hemolysates derived from blood of dairy calves aged up to three months. The 'Actovegin' (Takeda Austria, GmbH, Austria) is a well-known drug, containing the substances with a molecular weight below 5 kDa (carbohydrates, amino acids, low molecular weight peptides, lipopolysaccharides, nucleic acid derivatives, etc.) [1, 6, 13]. In addition, the low-molecular (below 5 kDa) cord blood fraction was established to have a high content of biologically active substances, but its qualitative composition was somewhat different from 'Actovegin' [11, 12]. As the research results show, the therapeutic effects of this fraction and 'Actovegin' as well are determined by the ability of their components to stimulate the oxygen and glucose consumption by cells, that is of great importance for correcting many pathological states [12, 18].

Proceeding from the mentioned above, this research was aimed to study the cardioprotective effect of fraction below 5 kDa, derived from cattle cord blood cryohemolysate.

### Materials and methods

Experiments in animals were carried out in accordance with the Law of Ukraine 'On the Protection of Animals Against Cruelty (No. 3447-IV of February 21, 2006) in compliance with the requirements of the Bioethics Committee of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the NAS of Ukraine (IPCC of the NAS of Ukraine), agreed to the statements of the 'European Convention on the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes' (Strasbourg, 1986).

The cord blood of Simmental cows (*Bos taurus*) was collected during physiologically normal calving on the dairy farms of 'Agrohouse East' Ltd of Valki district, Kharkiv region with the involvement of veterinarians or veterinary assistants. The fraction below 5 kDa of bovine cord blood cryohemolysate was procured by ultrafiltration using 'Vivaflow 200' membrane module (Sartorius, Germany) [11].

In this study, we have used the own model of infarction-like cardiovascular pathology [19]. Bearing in mind the fact, that the etiology of human myocardial infarction quite always includes sclerotic changes in cardiac muscle and blood vessels, the rats were preliminary maintained on a special electrolyte-fat diet with an excessive intake of fat, calcium and sodium salts until the hyperlipidemia development and a critical increase in atherogenic factor occur-



ліпедемії та критичного підвищення коефіцієнта атерогенності. Експеримент проводили на 6-місячних щурах ( $n = 100$ ) лінії Вістар масою 240–270 г, яких попередньо розподіляли за резистентністю до гіпоксії [2], відбираючи для досліджень тварин з середніми значеннями резистентності до гіпоксії. До стандартного раціону щурів додавали тваринний жир, який становив 10% від загальної маси корму. Воду в поїлках заміняли на 0,9%-й розчин NaCl для провокації надмірного споживання натру, шкідливого для серцево-судинної системи. Щодня щурам перорально вводили по 20 мг глюконату кальцію («Київмедпрепарат», Україна) та 2 000 МО вітаміну Д2 («Вітаміни», Україна) на тварину. У нормі ергокальциферол сприяє засвоєнню кальцію кістковою тканиною, але за гіпервітамінозу викликає надмірне його накопичення в крові. Встановлено зв'язок між високим рівнем кальцію в сироватці крові та частотою серцево-судинних захворювань, у тому числі інфаркту міокарда [20]. За цих умов збільшується ризик кальцинозу коронарних артерій, що сприяє утворенню атеросклеротичної бляшки [13]. Крім того, однією з причин ініціації проатерогенної модифікації ліпопротеїдів крові може бути системне запалення [3]. Для моделювання системного запального процесу протягом восьмого тижня двічі з інтервалом в три дні тваринам внутрішньочеревинно вводили бактеріальний ліпополісахарид «Пірогенал» (НДІЕМ ім. Н.Ф. Гамалії, Росія) з розрахунку 5 мкг сухої маси препарату на тварину.

Щурів з 58-ї доби піддавали впливу нормобаричної гіпоксії з використанням моделі гіпоксії в замкнутому об'ємі [5]. Попередньо у тварин, які утримувалися на стандартній дієті (група 1,  $n = 10$ ), та у тварин, призначених для експерименту (група 2,  $n = 10$ ), з хвостової вени брали по 200 мкл крові для визначення рівня серцевого тропоніну I у сироватці крові. За 30 хв до початку експерименту тваринам вводили фізіологічний розчин (група 3,  $n = 10$ ), досліджувану фракцію (група 4,  $n = 5$ ) або препарат порівняння «Актовегін» (група 5,  $n = 5$ ) у дозі 4 мг (у перерахунку на суху речовину) на 1 кг маси тварини. Щурів поміщали в скляну прозору камеру об'ємом 1000 мл, яку щільно закривали. Після другого агонального вдиху щурів діставали з камери і проводили кардіографічне дослідження в трьох стандартних (I, II, III) та трьох посиленних (aVR, aVL, aVF) відведеннях. Кардіограми аналізували на наявність відхилень, які б свідчили про виникнення гострої серцево-судинної патології: поява від'ємного зубця Q; значне зниження або відсутність зубця R (комплекси QrS або QS);

red in them. The experiment was performed in 6-month-old Wistar rats ( $n = 100$ ) weighing 240–270 g, which were previously divided according to resistance to hypoxia [3], by selecting the animals for research with average values of this index. The standard diet of rats was supplemented with animal fat, which accounted for 10% of the total weight of feed. The water in drinking bowls was replaced with a 0.9% NaCl solution to provoke an excessive sodium intake, being harmful to cardiovascular system. The rats received orally 20 mg of calcium gluconate (Kyivmedpreparat, Ukraine) and 2,000 IU of vitamin D2 (Vitamins, Ukraine) daily. Normally, ergocalciferol contributes to calcium assimilation by bone tissue, but with hypervitaminosis it causes its excessive accumulation in blood. A relationship between a high level of calcium in blood serum and the frequency of cardiovascular diseases, including myocardial infarction, has been established [16]. Under these conditions, the risk of coronary artery calcification increases, thereby contributing to atherosclerotic plaque formation [4]. In addition, the systemic inflammation may be one of the reasons for initiation of proatherogenic modification of blood lipoproteins [5]. To simulate the systemic inflammation, during week 8, twice with an interval of three days, the animals were administered intraperitoneally with the bacterial lipopolysaccharide 'Pyrogenal' (Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Russia) in an amount of 5  $\mu$ g dry weight of drug per animal.

Starting from the day 58, the rats were exposed to normobaric hypoxia using the hypoxia model in a closed volume [10]. Previously, 200  $\mu$ l of blood were collected from the tail vein of animals kept on a standard diet (group 1,  $n = 10$ ) and those intended for the experiment (group 2,  $n = 10$ ) to measure the cardiac troponin I level in blood serum. Half an hour before the experiment onset, the animals were injected with physiological saline (group 3,  $n = 10$ ), the studied fraction (group 4,  $n = 5$ ) or the reference drug 'Actovegin' (group 5,  $n = 5$ ) in a dose of 4 mg (in terms of dry matter) per 1 kg of animal weight. Rats were placed into a tightly closed transparent glass chamber of 1000 ml volume. After the second agonal breath, the rats were removed from the chamber and electrocardiography was performed in three standard (I, II, III) and three augmented unipolar limb (aVR, aVL, aVF) leads. Cardiograms were analyzed for the presence of abnormalities that would indicate the occurrence of acute cardiovascular pathology: negative Q wave appearance; a significant reduction or absence of R wave (QrS or QS complexes); displacement



зміщення комплексу ST відносно ізолінії; високоамплітудні «коронарні» зубці T [11]. За відсутності патологічних змін тварин повертали до камери і починали наступний цикл нормобаричної гіпоксії. У разі виявлення вказаних відхилень у щурів попередньо діагностували інфаркт і припиняли стресуючий вплив на тварин. Через 18 годин після даних маніпуляцій у тварин з хвостової вени брали кров і з неї отримували сироватку, в якій визначали вміст серцевого тропоніну I методом імуноферментного аналізу з використанням набору «Rat Cardiac Troponin I» (cTn-I) ELISA kit (Cusabio Technology LLC, США). Підвищення вмісту серцевого тропоніну I у сироватці щурів порівнювали з визначеними раніше середніми показниками інтактних тварин та тих, яких утримували на патогенній дієті без впливу гіпоксії. У разі позитивного результату тесту вважали, що тварина перенесла інфаркт міокарда, і її виводили з експерименту шляхом декапітації під ефірним наркозом. Далі вилучали серце для виготовлення гістологічних препаратів та проводили його фіксацію в 10%-му нейтральному формаліні (pH 7,4) з подальшою проводкою та заливкою в парафін. Гістологічні зрізи товщиною 5–7 мкм забарвлювали гематоксилином і еозином [4]. Фотозйомку та аналіз зрізів проводили за допомогою мікроскопа «Axio Observer Z1» (Carl Zeiss, Німеччина) в світловому режимі. Для порівняння готували мікропрепарати з сердець тварин, яких після утримання на патогенній дієті стресуючому впливу не піддавали.

Статистичну обробку експериментальних даних проводили з використанням статистичного пакета програми «Excel» (Microsoft, США). Дані представляли у вигляді: Me (Q3–Q1). Відмінності між вибірками оцінювали за допомогою U-критерію Манна-Вітні, значущими вважали відмінності при  $p \leq 0,05$ .

### Результати та обговорення

Результати дослідження ліпідного профілю крові показали, що утримання щурів протягом двох місяців на дієті з надлишковим вмістом жирів та солей натру і кальцію призводить до розвитку гіперліпідемії, збільшення вмісту в крові холестерину ліпопротеїдів низької та наднизької щільності та до зниження вмісту холестерину ліпопротеїдів високої щільності, внаслідок чого індекс атерогенності підвищується вдвічі порівняно з показниками крові тварин, які утримувалися на стандартному збалансованому раціоні [11].

Згідно з дизайном експерименту причиною інфаркту міокарда у щурів мала стати гіпоксія-

of ST complex relative to the isoline; high-amplitude 'coronary' T waves [19]. When no pathological changes were present in animals, they were returned to the chamber and the next cycle of normobaric hypoxia began. When the mentioned abnormalities were found, a myocardial infarction was preliminary diagnosed in rats and a stress impact was stopped. In 18 hrs after these manipulations, the blood was collected from the tail vein of animals, and the serum was obtained, where the cardiac troponin I level was measured by enzyme-linked immunosorbent assay using the Rat Cardiac Troponin I (cTn-I) ELISA kit (Cusabio Technology LLC, USA). An increased level of cardiac troponin I in rat serum was compared with the previously measured average indices of the intact animals and those kept on a pathogenic diet without exposure to hypoxia. If the test result was positive, an animal was considered as suffered a myocardial infarction, and then sacrificed by decapitation under ether anesthesia. Next, the heart was removed for preparing histological samples and fixed in 10% neutral formalin (pH 7.4), followed by processing and paraffin embedding. Histological sections of 5–7  $\mu\text{m}$  thick were stained with hematoxylin and eosin [21]. The sections were photographed and analyzed using an Axio Observer Z1 microscope (Carl Zeiss, Germany) in the light mode. To compare, the micropreparations from the hearts of animals, not subjected to stress impact after being kept on a pathogenic diet, were made.

The experimental data were statistically processed using the Excel statistical package (Microsoft, USA). The data were presented as Me (Q3–Q1). Differences between samples were assessed using the Mann-Whitney U-test, differences at  $p \leq 0.05$  were considered significant.

### Results and discussion

The findings of blood lipid profile showed the maintenance of rats for two months on a diet with an excessive intake of fat, sodium and calcium salts to result in hyperlipidemia development, an increased content of low- and ultra-low-density lipoprotein cholesterol in blood, and a decreased one of high-density lipoprotein cholesterol, as a result of which the atherogenicity index augmented twice as compared to blood indices of animals, kept on a standard balanced diet [19].

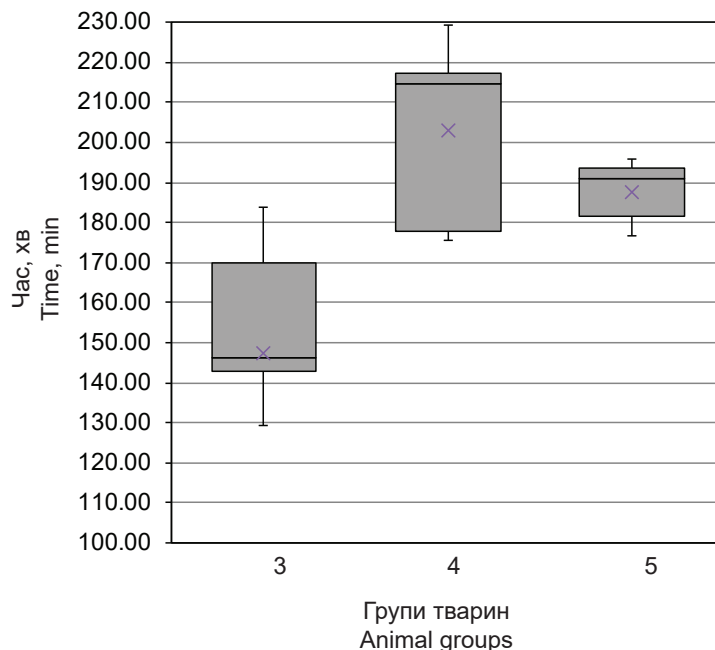
According to the experiment design, the hypoxia-hypercapnia, which would gradually increase after isolating animals in a hermetically sealed chamber was supposed to be the cause of myocardial infarction in rats. Before starting the hypoxia-



гіперкапнія, яка б поступово наростала після ізоляції тварин у герметично закритій камері. На кардіограмах тварин усіх експериментальних груп перед початком моделювання гіпоксії-гіперкапнії було діагностовано тахікардію. Загальний час перебування під впливом гіпоксії-гіперкапнії до моменту виявлення на кардіограмі відхилень, на підставі яких можна було б поставити попередній діагноз — «гострий коронарний синдром», у контрольній групі тварин (група 3) в середньому склав 146,25 (142,25–169,75) хв. У тварин, яким перед початком моделювання гіпоксії-гіперкапнії вводили низькомолекулярну фракцію кордової крові (група 4) або «Актовегін» (група 5), даний показник був значно вищим: 214,25 (178,00–217,25) та 191,00 (181,75–193,75) хв відповідно (рис. 1), що свідчить про підвищення стійкості міокарда до впливу гіпоксії.

Незалежно від встановлених на кардіограмах змін попередній діагноз «гострий коронарний синдром» у кожному випадку було підтверджено шляхом визначення вмісту в сироватці крові серцевого тропоніну I та за даними гістологічного аналізу. Зокрема, результати аналізу рівня серцевого тропоніну I (рис. 2) у сироватці крові щурів, яким було поставлено попередній діагноз «гострий коронарний синдром», показали його значуще підвищення у тварин усіх груп порівняно як з інтактними тваринами (група 1), так й з тими, яких після утримання на патогенній дієті не піддавали впливу гіпоксії (група 2). Слід зазначити, що у групі 2 також встановлено значуще ( $p \leq 0,01$ ) підвищення даного показника порівняно з інтактними тваринами, проте дані зміни були менш виражені: 16,80 (12,05–18,65) проти 6,78 (6,11–6,90) пг/мл. Як видно з рис. 2, вміст серцевого тропоніну I в крові щурів, у яких інфарктоподібну кардіовазопатію викликали після введення низькомолекулярної фракції кордової крові корів або препарату «Актовегін» був значуще нижче (в обох випадках  $p \leq 0,01$ ) порівняно з групою контролю: 39,33 (37,10–39,70) та 43,05 (35,80–44,70) пг/мл відповідно проти 60,85 (51,95–62,25) пг/мл. Це може свідчити про менші розміри зони інфаркту.

Гістологічний аналіз мікропрепаратів сердець показав, що утримання тварин на дієті з надлишковим вмістом жирів та солей кальцію і натру викликає в міокарді та його судинах зміни, які



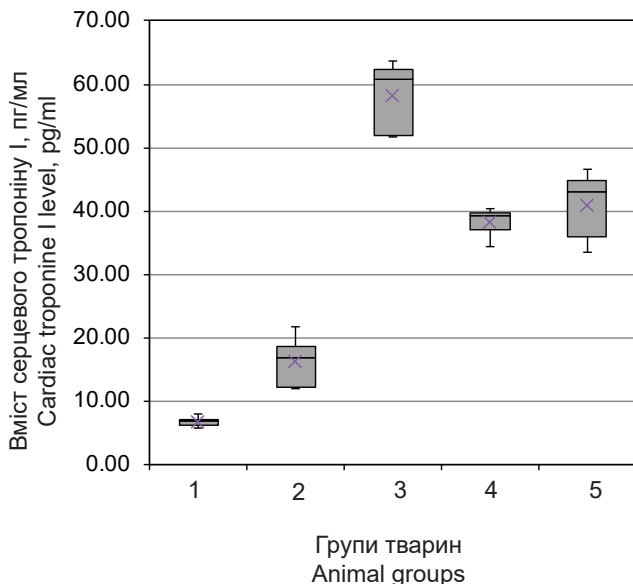
**Рис. 1.** Тривалість перебування щурів у стані гіпоксії-гіперкапнії до розвитку у них інфаркту міокарда; \* — відмінності між групами 3 і 4 та 3 і 5 значущі,  $p \leq 0,01$ .

**Fig. 1.** Stay duration of rats under hypoxia-hypercapnia until myocardial infarction development in them; \* — differences are significant between groups 3 and 4 and groups 3 and 5,  $p \leq 0.01$ .

hypercapnia simulation, the tachycardia was diagnosed on cardiograms of animals from all the experimental groups. The total duration of stay under hypoxia-hypercapnia until the moment of detecting the abnormalities on cardiogram, based on which a preliminary diagnosis of ‘acute coronary syndrome’ could be made, averaged 146.25 (142.25–169.75) min in the control group of animals (group 3). In the animals injected with the cord blood low-molecular fraction (group 4) or ‘Actovegin’ (group 5) before starting the hypoxia-hypercapnia simulation, this index was significantly higher, *i. e.* 214.25 (178.00–217.25) and 191.00 (181.75–193.75) min, respectively (Fig. 1), thus testifying to an increase in myocardium resistance to hypoxia impact.

Irrespective of the changes detected on cardiograms, a preliminary diagnosis of ‘acute coronary syndrome’ was confirmed in each case by measuring the cardiac troponin I level in blood serum and by histological examination. In particular, the analysis of cardiac troponin I level (Fig. 2) in blood serum of rats preliminarily diagnosed with ‘acute coronary syndrome’ showed its significant increase in the animals from all the groups if comparing with both intact animals (group 1) and those not exposed to hypoxia after being maintained on a pathogenic diet (group 2). Notably, that the index was signifi-





**Рис. 2.** Вміст серцевого тропоніну I у сироватці крові щурів; \* — відмінності між групами 1 і 2, 1 і 3, 1 і 4, 1 і 5, 2 і 3, 2 і 4, 2 і 5, 3 і 4, 3 і 5 значущі,  $p \leq 0,01$ .

**Fig. 2.** Cardiac troponine I level in rat blood serum; \* — differences are significant between the groups 1 and 2, 1 and 3, 1 and 4, 1 and 5, 2 and 3, 2 and 4, 2 and 5, 3 and 4, 3 and 5,  $p \leq 0,01$ .

підвищують ризик інфаркту. Так, на зрізах добре видно ознаки дистрофії міокарда — чергування невеликих груп кардіоміоцитів, для яких характерні слабо виражені гіпертрофія та атрофія. Пучки м'язових волокон міокарда стоншені за рахунок атрофії або перебувають в стані хвилеподібної деформації. Ділянки слабкого кровонаповнення чергуються з вогнищами венозно-капілярного повнокров'я. Видно великі й малі інтрамуральні коронарні артерії з нерівномірним потовщенням стінок внаслідок слабо вираженого коронаросклерозу та початкового периваскулярного кардіосклерозу. Очевидно мала місце як атеросклеротична, так і міокардична форма кардіосклерозу, оскільки у тварин викликали системне запалення шляхом ін'єкцій бактеріального ліпосахариду «Пірогенал». Гістологічне дослідження тканин міокарда щурів з моделлю інфарктоподібної кардіовазопатії виявило однакові патологічні зміни: вогнищеві крововиливи, повнокров'я судин, зникнення поперечної смугастості м'язових волокон (окремі м'язи мали вигляд «м'ясного фаршу»), тромбування судин. Некротизовані м'язові клітини в зоні інфаркту позбавлені ядер. Спостерігаються дрібно осередкова паренхіматозна дистрофія кардіоміоцитів і скупчення лімфоцитів. Для препаратів, отриманих із сердець тварин контрольної групи, характерні повна відсутність кровотоку в некротичній зоні та переповнення кров'ю вен і синусів пе-

cantly ( $p \leq 0.01$ ) increased in the group 2 if compared with the intact animals, however, these changes were less pronounced, *i. e.* 16.80 (12.05–18.65) vs. (6.11–6.90) pg/ml. The Fig. 2 demonstrated the cardiac troponine I level in blood of rats, wherein the infarction-like cardiovasopathy was induced after introducing the low molecular weight fraction of cattle cord blood or 'Actovegin' to be significantly lower (in both cases  $p \leq 0.01$ ) as compared with the control group, *i. e.* 39.33 (37.10–39.70) and 43.05 (35.80–44.70) pg/ml, respectively, vs. 60.85 (51.95–62.25) pg/ml. This may testify to a smaller size of infarction area.

Histological analysis of cardiac micropreparations showed the maintaining of animals on a diet with excessive intake of fat, calcium and sodium salts to induce the changes in myocardium and its vessels, that increased the risk of heart attack. For example, the sections clearly showed the signs of myocardial dystrophy, *i. e.* the alternation of small groups of cardiomyocytes, characterized by slightly expressed hypertrophy and atrophy. Bundles of muscle fibers of myocardium were thinned due to atrophy or underwent a wave-like deformation. The sites of weak blood supply alternated with the foci of venous-capillary full blood. Large and small intramural coronary arteries with uneven wall thickening due to slightly manifested coronary sclerosis and initial perivascular cardiosclerosis were visible. Apparently, both atherosclerotic and myocardial forms of cardiosclerosis occurred, since the systemic inflammation in animals was induced via injections of bacterial liposaccharide Pyrogenal. Histological examination of myocardial tissues of rats with a simulated infarction-like cardiovasopathy revealed the same pathological changes, *i. e.* the focal hemorrhages, vascular congestion, disappearance of striated muscle fibers (some muscles looked like 'minced meat'), blood vessel thrombosis. In the infarction area, the necrotic muscle cells were deprived of nuclei. Small focal parenchymal dystrophy of cardiomyocytes and accumulation of lymphocytes were observed. The preparations, procured from the hearts of control group animals revealed a complete absence of blood flow in necrotic area and blood overflow in veins and sinuses of peri-infarct zone, blood stasis in capillaries. In addition, the sites of intermuscular hemorrhage were found in many micropreparations. The state of myocardium in the animals, received either low-molecular fraction of cord blood (group 4) or 'Actovegin' (group 5) before hypoxia-hypercapnia was somewhat better vs. the control group. The thrombus resorption of epicardial coronary artery and recanalization of

риінфарктної зони, стаз крові в капілярах. Крім того, у багатьох препаратах було виявлено ділянки міжм'язового крововиливу. Дещо кращим порівняно з тваринами контрольної групи був стан міокарда у тварин, яким перед застосуванням гіпоксії-гіперкапнії вводили низькомолекулярну фракцію кордової крові (група 4) або «Актовегін» (група 5). На препаратах сердець тварин цих груп спостерігалися резорбція тромбу епікардальної вінцевої артерії та реканалізація окремих тромбів дрібних субендокардальних артерій, утворення колатералей в періінфарктній зоні. Під час візуального огляду препаратів суттєвих відмінностей між групами, яким перед моделюванням інфарктоподібної кардіовазопатії вводили низькомолекулярну фракцію кордової крові або «Актовегін», не виявлено.

### Висновки

Фракція до 5 кДа з кордової крові корів містить компоненти, які мають кардіопротекторною дією. Механізм дії даних чинників полягає, зокрема, в покращенні забезпечення кардіоміоцитів киснем та більш ефективному його використанні, чим може пояснюватися підвищення стійкості тварин до впливу гіпоксії-гіперкапнії. Профілактичне введення даної фракції знижує ризик виникнення пошкоджень міокарда внаслідок впливу гіпоксії та зменшує ступінь ураження міокарда, про що свідчить більш низький рівень серцевого тропоніну I.

*Автори висловлюють подяку завідувачу відділом експериментальної кріомедицини ІПКіК НАНУ, к. м. н. М.О. Чижу за консультативну допомогу в аналізі кардіограм, ст. н. с. відділу кріофізіології ІПКіК НАНУ, к. б. н. О.В. Шилу за допомогу в технічному забезпеченні експерименту та консультації під час проведення кардіографічних досліджень на лабораторних тваринах, завідувачці віварію ІПКіК НАНУ Л.В. Бацинській за забезпечення утримання тварин відповідно до методики проведення експерименту.*

### Література

1. Бабичук ЛВ, Сиротенко ЛА, Малова НГ, и др. Уровни липидов и глюкозы в сыворотке крови крыс на фоне стресс-индуцированной артериальной гипертензии и после введения криоконсервированной кордовой крови. Проблемы эндокринной патологии. 2014; 24(3): 89–96.
2. Березовский ВА, Бойко КА, Клименко КС, и др. Гипоксия и индивидуальные особенности резистентности. Киев: Наукова думка; 1978. 215 с.

certain thrombi of small subendocardial arteries, and the collaterals formation in peri-infarct zone were observed in cardiac preparations of animals from these groups. Visual examination of preparations revealed no significant differences between the groups received either the cord blood low-molecular fraction or 'Actovegin' before simulating the infarction-like cardiovascular pathology.

### Conclusions

The cattle cord blood-derived fraction below 5 kDa contains the components with cardioprotective effect. The action mechanism of these factors consists, in particular, in improving the cardiomyocyte supply with oxygen and its more efficient use, as evidenced by an increased resistance of animals to hypoxia-hypercapnia. Prophylactic administration of this fraction reduces the risk of myocardial damage, resulted from hypoxia impact and mitigates the myocardial damage rate, as proved by a lower cardiac troponin I level.

*The authors express their gratitude to Mykola O. Chizh, Ph.D., Head of the Department of Experimental Cryomedicine of the IPCC of the NAS of Ukraine for advisory assistance in ECG analysis, Oleksandr V. Shylo, senior research fellow of the Department of Cryophysiology of the IPCC of the NAS of Ukraine for help in technical support of the experiment and advise during cardiographic studies in laboratory animals, and Liudmyla V. Batsunova, Head of the Animal Facility of the IPCC of the NAS of Ukraine for ensuring the animal housing in accordance with the experiment procedure.*

### References

1. Astashkin EI, Glezer MG, Vinokurov MG, et al. Actovegin reduces the ROS level in blood samples of heart failure patients and diminishes necrosis of SK-N-SH human neuroblastoma cells. Dokl Biol Sci. 2013; 448(1): 57–60.
2. Babychuk LV, Sirotenko LA, Malova NG, et al. [Lipid and glucose levels in rat blood serum under stress-induced hypertension and after administration of cryopreserved cord blood]. Problemy Endokrynnoi Patolohii 2014; 24(3): 89–96. Russian.
3. Berезовskij VA, Boyko KA, Klimenko KS, et al. Hypoxia and the individual peculiarities of resistance. Kyiv: Naukova Dumka; 1978. 215 p. Russian.
4. Boström K. Insights into the mechanism of vascular calcification. Am J Cardiol. 2001; 88(2A):20E–22E.
5. Bratus' VV, Talaieva TV, Radalovs'ka NV, Tretiak IV. [Role of systemic inflammatory process in atherogenic modification of lipoproteins and hypercholesterolemia development]. Fiziol Zh. 1999;45(1–2): 40–9. Ukrainian.



3. Братусь ВВ, Талаева ТВ, Радаловська НВ, Третяк ІВ. Роль системного запального процесу в атерогенній модифікації ліпопротеїнів і розвитку гіперхолестеринемії. *Фізіологічний журнал*. 1999; 45(1–2): 40–9.
4. Волкова ОВ, Елецкий ЮК. *Основы гистологии с гистологической техникой*. Москва: Медицина; 1982. 304 с.
5. Газенко ОГ. *Экологическая физиология человека. Адаптация человека к экстремальным условиям среды*. Москва: Наука; 1979. 704 с.
6. Гулевський ОК, Абакумова ОС, Щенявський ІЙ. Біологічна активність низькомолекулярної фракції, отриманої з кордової та периферичної крові корів різного віку. *Фізіологічний журнал*. 2017; 63(2): 73–9.
7. Трифонов ВЮ, Прокопюк ВЮ, Зайченко АВ. Криоконсервированная сыворотка кордовой крови в восстановлении репродуктивной функции при антифосфолипидном синдроме. *Проблемы криобиологии*. 2011; 21(1): 75–84.
8. Чеснокова НП, Понукалина ЕВ, Бизенкова МН. Современные представления о патогенезе гипоксий. Классификация гипоксий и пусковые механизмы их развития. *Современные наукоемкие технологии*. 2006; 5: 23–7.
9. Чиж МО, Бабаева ГГ, Рогоза ЛА, Гальченко СЄ. Экстракт криоконсервированных фрагментов сердца поросят як регулятор стану серцевого м'яза щурів на моделі некрозу міокарда. *Вісник проблем біології і медицини*. 2020; (4): 78–83.
10. Щенявський ІЙ. Вплив фракції до 5 кДа з пуповинно-плацентарної крові великої рогатої худоби на вміст глюкози та лактату і пірувату в тканині опікових ран. *Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія*. 2010; (1): 50–3.
11. Щенявський ІЙ. Удосконалення моделі інфаркту міокарда у щурів. *Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія*. 2021; (1): 40–7.
12. Astashkin EI, Glezer MG, Vinokurov MG, et al. Actovegin reduces the ROS level in blood samples of heart failure patients and diminishes necrosis of SK-N-SH human neuroblastoma cells. *Dokl Biol Sci*. 2013; 448(1): 57–60.
13. Boström K. Insights into the mechanism of vascular calcification. *Am J Cardiol*. 2001; 88(2A): 20E–22E.
14. Buchmayer F, Pleiner J, Elmlinger MW, et al. Actovegin: a biological drug for more than 5 decades. *Wien Med Wochenschr*. 2011; 161(3–4): 80–8.
15. Erdem E, Yagmur M, Harbiyeli I, et al. Umbilical cord blood serum therapy for the management of persistent corneal epithelial defects. *Int J Ophthalmol*. 2014; 5(7): 807–10.
16. Gulevsky OK, Schenyavsky II. Antihypoxant activity of low molecular weight fraction bovine blood cryohemolysate at different stages of ontogenesis. *Probl Cryobiol Cryomed*. 2017; 27(1): 41–50.
17. Machicao F, Muresanu DF, Hundsburger H, et al. Pleiotropic neuroprotective and metabolic effects of Actovegin's mode of action. *J Neurol Sci*. 2012; 322(1–2): 222–7.
18. Rohoza LA. Biological effect of extract of cryopreserved piglet's heart fragments in ischemia and spontaneous myocardial infarction. *Probl Cryobiol Cryomed*. 2017; 27(2): 167.
19. Rohoza LA, Chizh MO, Galchenko SY, Sandomirsky BP. Effect of extracts of frozen-thawed heart fragments on rats. *Probl Cryobiol Cryomed*. 2013; 22(1): 91–8.
20. Rohrmann S, Garmo H, Malmström H, et al. Association between serum calcium concentration and risk of incident and fatal cardiovascular disease in the prospective AMORIS study. *Atherosclerosis*. 2016; 251: 85–93.
21. Seo TB, Han IS, Yoon JH, et al. Growth-promoting activity of Hominis Placenta extract on regenerating sciatic nerve. *Acta Pharmacol Sin*. 2006; 27(1): 50–8.
6. Buchmayer F, Pleiner J, Elmlinger MW, et al. Actovegin: a biological drug for more than 5 decades. *Wien Med Wochenschr*. 2011; 161(3–4): 80–8.
7. Chesnokova NP, Ponukalina EV, Bizenkova MN. [Modern concepts of hypoxia pathogenesis. Hypoxia classification and triggers for its development]. *Sovremennyye naukoemykiye tekhnologii*. 2006; 5: 23–7. Russian.
8. Chyzh MO, Babaieva GG, Rohoza LA, Halchenko SYe. [Extract of cryopreserved piglet heart fragments as a regulator of heart muscle state in rat model of myocardial necrosis]. *Bulletin of Problems in Biology and Medicine*. 2020; (4): 78–83. Russian.
9. Erdem E, Yagmur M, Harbiyeli I, et al. Umbilical cord blood serum therapy for the management of persistent corneal epithelial defects. *Int J Ophthalmol*. 2014; 5(7): 807–10.
10. Gazenko OG, editors. [Guide to the physiology. Ecological physiology of humans. Human adaptation to extreme environment conditions]. Moscow: Nauka; 1979. 704 p. Russian.
11. Gulevsky AK, Abakumowa ES, Shenyavsky II. [Biological activity of low molecular weight fraction obtained from cord and peripheral blood in cows of different ages]. *Fiziol Zh*. 2017; 63(2): 73–9. Ukrainian.
12. Gulevsky OK, Schenyavsky II. Antihypoxant activity of low molecular weight fraction bovine blood cryohemolysate at different stages of ontogenesis. *Probl Cryobiol Cryomed*. 2017; 27(1): 41–50.
13. Machicao F, Muresanu DF, Hundsburger H, et al. Pleiotropic neuroprotective and metabolic effects of Actovegin's mode of action. *J Neurol Sci*. 2012; 322(1–2): 222–7.
14. Rohoza LA. Biological effect of extract of cryopreserved piglet's heart fragments in ischemia and spontaneous myocardial infarction. *Probl Cryobiol Cryomed*. 2017; 27(2): 167.
15. Rohoza LA, Chizh MO, Galchenko SY, Sandomirsky BP. Effect of extracts of frozen-thawed heart fragments on rats. *Probl Cryobiol Cryomed*. 2013; 22(1): 91–8.
16. Rohrmann S, Garmo H, Malmström H, et al. Association between serum calcium concentration and risk of incident and fatal cardiovascular disease in the prospective AMORIS study. *Atherosclerosis*. 2016; 251: 8593.
17. Seo TB, Han IS, Yoon JH, et al. Growth-promoting activity of Hominis Placenta extract on regenerating sciatic nerve. *Acta Pharmacol Sin*. 2006; 27(1): 50–8.
18. Shchenyavsky I. [Impact of fraction below 5 kDa from the cattle cord blood on glucose, lactate and pyruvate contents in burn wound tissues]. *Experimental and Clinical Physiology and Biochemistry*. 2010; (1): 50–3. Russian.
19. Schenyavsky IJ. [Improving the model of myocardial infarction in rats]. *Experimental and Clinical Physiology and Biochemistry*. 2021, (1): 40–7. Ukrainian.
20. Trifonov VYu, Prokopyuk VYu, Zaychenko AV. Cryopreserved cord blood serum for reproductive function restoration during antiphospholipid syndrome. *Problems of Cryobiology*. 2011; 21(1): 75–84.
21. Volkova OV, Eletskiy YuK. [Fundamentals of histology with histological technique]. Moscow: Meditsina, 1982. 304 p. Russian.

