

Исследование биологической активности фракции до 5 кДа из криогемолизата крови крупного рогатого скота

UDC 615.387.361.014.47

A.K. GULEVSKIY*, N.N. MOISEYEVA, YE.S. ABAKUMOVA, A.YU. NIKOLCHENKO,
I.I. SHCHENYAVKIY, O.L. GORINA, A.V. TRIFONOVA, YE.G. IVANOV

Studying of Biological Activity of Fraction Less Than 5 kD From Cattle Cord Blood Cryohaemolizate

Показано ранозаживляющее, противовоспалительное и сахароснижающее действие фракции до 5 кДа, полученной из криогемолизата кордовой крови. В условиях *in vitro* выявлено стимулирующее действие данной фракции кордовой крови на фагоцитарную и пролиферативную активность клеток. С помощью гелепроникающей хроматографии и биохимических методов отмечено, что спектр низкомолекулярных веществ фракции из кордовой крови отличается от спектра компонентов препарата сравнения Актовегин как по качественному, так и количественному составу.

Ключевые слова: кордовая кровь, низкомолекулярная фракция до 5 кДа, термический ожог, субхроническая язва желудка, репарация, Актовегин.

Показана ранозагоююча, протівовиразкова та цукрознижуюча дія фракції до 5 кДа, отриманої із криогемолізату кордової крові. В умовах *in vitro* встановлено стимулюючий вплив цієї фракції кордової крові на фагоцитарну та проліферативну активність клітин. За допомогою гелепроникаючої хроматографії та біохімічних методів виявлено, що спектр низькомолекулярних речовин фракції із кордової крові відрізняється від спектра компонентів препарату порівняння Актовегін як за якісним, так і за кількісним складом.

Ключові слова: кордова кров, низькомолекулярна фракція до 5 кДа, термічний опік, субхронічна виразка шлунку, репарація, Актовегін.

The wound and ulcer healing and sugar-decreasing activities of the fraction less than 5 kD derived from the cord blood cryohaemolizate has been investigated. Stimulating effect of this cord blood fraction on phagocytic and proliferative activities of cells was discovered under *in vitro* conditions. By means of gel-penetrating chromatography and biochemical tests it has been shown that the pattern of cord blood fraction low molecular substances is different from the Actovegin pattern both qualitatively and quantitatively.

Key-words: cord blood, low molecular fraction less than 5 kD, subchronic stomach ulcer, thermal burn, reparation, Actovegin.

Исследовали биологическую активность лиофильно высушенной фракции до 5 кДа из криогемолизата кордовой крови. Препаратом сравнения служил препарат фирмы “Никомед” Актовегин, являющийся фракцией до 5 кДа из крови молочных телят [1].

Материалы и методы

Низкомолекулярную фракцию до 5 кДа получали из криогемолизата кордовой крови крупного рогатого скота методом ультрафильтрации с помощью ультрафильтрационного оборудования (“Sartorius”, Германия) [2].

Спектр низкомолекулярных веществ, содержащихся во фракции кордовой крови и Актовегине, оценивали с помощью гелепроникающей хроматографии по методу [3].

Експериментальних живих тварин після моделювання термічного ожога III В ступені [6] або аспіринової язви желудка [4] поділяли на групи і щодня внутрим'язково вводили: 1-й групі – фракцію кордової крові (ФКК); 2-й групі – препарат порівняння Актовегін, 3-й групі (контрольній) – фізіологічний розчин. Ранозаживляюче діє фракції вивчали на 3, 7, 14 і 21-е дні по площі ран, протівовиразкову активність – на 3, 7 і 12-е дні. Ступінь язвенного ураження проводили на основі макроскопічного вивчення слизової оболонки желудка (СОЖ) по таким показателям, як відсоток тварин з язвами, середня площа язв у тварин (в балах) [4]. Для морфологічного дослідження тканини в області язви готували гистологічні препарати по методі [7].

Институт проблем криобиологии и криомедицины
НАН Украины, г. Харьков

* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:
ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38
(057) 373-41-35, факс: +38 (057) 373-30-84, электронная почта:
cryo@online.kharkov.ua

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

* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 373 4135, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

О развитии воспалительных и регенеративных процессов при данных патологиях судили по активности щелочной фосфатазы (ЩФ) (КФ 3.1.3.1.) в сыворотке периферической крови крыс [10]. Один из маркеров состояния ПОЛ (содержание ТБК-активных продуктов в сыворотке крови крыс) изучали по методу М. Mihara [13].

Сахароснижающую активность исследовали по тесту толерантности к глюкозе при глюкозной нагрузке у крыс [4].

Действие ФКК *in vitro* изучали при ее добавлении в ростовые среды диплоидной культуры фибробластов человека [11], перевиваемых линий РК-15-IECVM и ВНК-21 clone 13 по следующим параметрам: скорость расплывания клеток, их способность к адгезии [12], прирост клеток на 4-е сутки роста культуры и митотический режим культур [8]. Фагоцитарную активность лейкоцитов оценивали по методу [5, 9].

При статистической обработке экспериментальных данных использовали программный пакет "Statgraphic plus for Windows", версии 2.1 по тестам t-критерия Стьюдента и Манна-Уитни.

Результаты и обсуждение

С помощью гелепроникающей хроматографии было показано, что спектр низкомолекулярных веществ, содержащихся в ФКК, отличается от спектра компонентов Актовегина по качественному и количественному составу. Основную часть низкомолекулярных компонентов ФКК составляет фракция 5, содержание которой в Актовегине незначительное. В ФКК отсутствуют фракции 1 и

7 и появляются новые – 2.1, 3.1 и 6.1. Имеются количественные различия в содержании фракций 2, 3, 4, 6 (рис. 1).

При анализе состава ФКК и препарата сравнения Актовегина отмечается повышенное содержание в них ионов кальция, натрия и калия. Различия в составе ФКК и Актовегина обнаружены при анализе содержания гормонов. Концентрация кортизола и эстрадиола в ФКК существенно выше, чем в Актовегине, хотя содержание соматотропного гормона и тестостерона незначительно как в ФКК, так и в Актовегине. Анализ белково-липидных компонентов показал нормальное содержание гликопротеинов в исследуемых объектах. Следует отметить более высокое содержание сиаловых кислот в ФКК по сравнению с Актовегином.

Было установлено, что в терапевтической дозе ФКК сокращает сроки заживления ран на коже экспериментальных животных после термокоагуляции и на всех сроках заживления действует более эффективно, чем препарат сравнения (рис. 2). Это подтверждается достоверными данными динамики активности ЩФ, перекисного окисления и клинических показателей крови.

Аналогичные результаты были получены при исследовании влияния ФКК на динамику заживления субхронической язвы желудка у крыс. При макроскопическом исследовании СОЖ в группах животных, которым вводили ФКК и Актовегин, на 12-е сутки наблюдалось практически полное отсутствие язвенных дефектов, отмечалась незначительная гиперемия. Средняя площадь язв к этому сроку соответствовала в контроле 1,8 балла, при

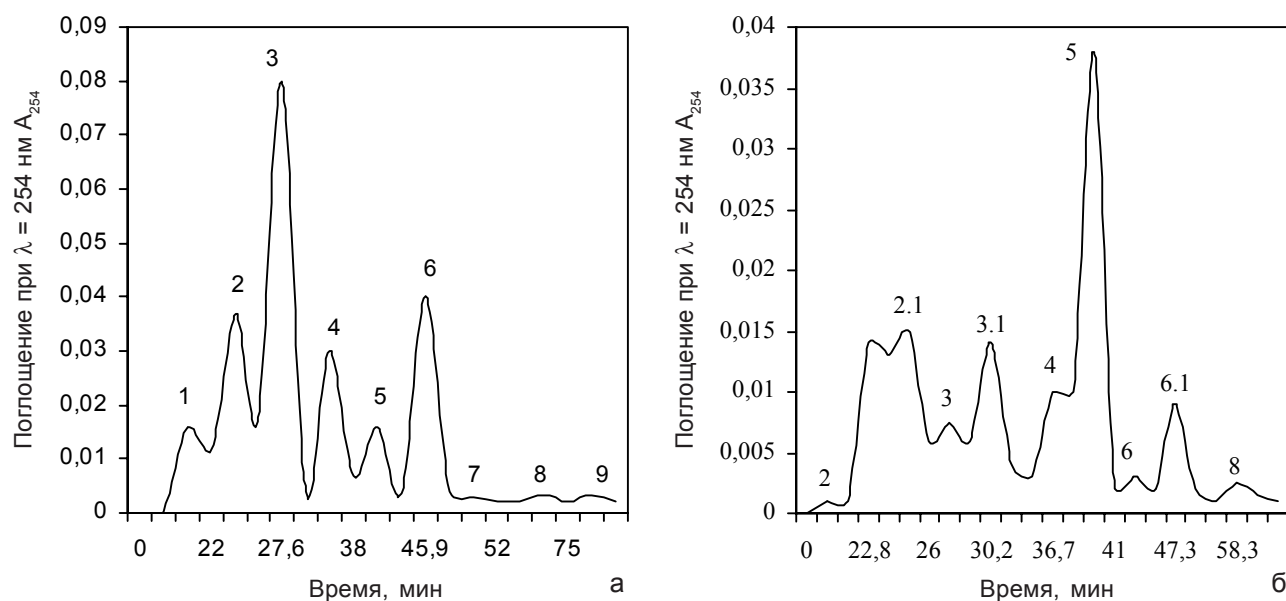


Рис. 1. Гельпроникающая хроматография Актовегина (а) и фракции из кордовой крови (б) на колонке, заполненной поливиниловым гелем Toyopear 1HW-40 Fine (Toyo Soda, Japan) в фосфатно-солевом буфере, содержащем натрий-фосфат 30 мМ, NaCl 200 мМ, рН 7,6. 1–9 – фракции.

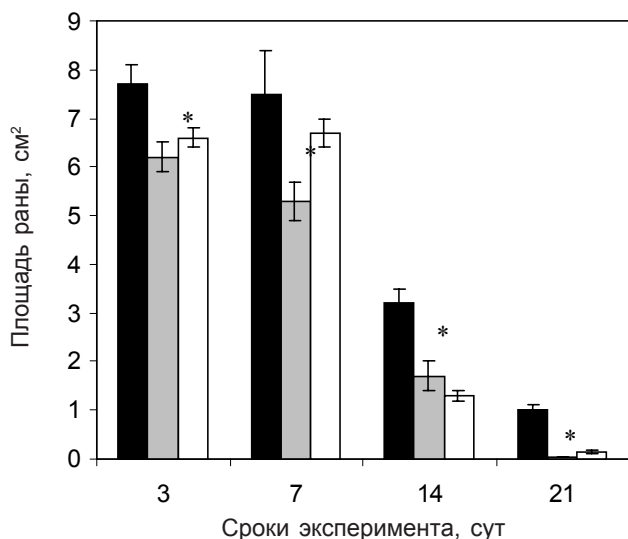


Рис. 2. Динамика изменения площади ожоговых ран у экспериментальных животных после введения фракции до 5 кДа кордовой крови: ■ – контроль; ▨ – ФКК; □ – Актовегин; * – $p < 0,01$ в сравнении с контролем.

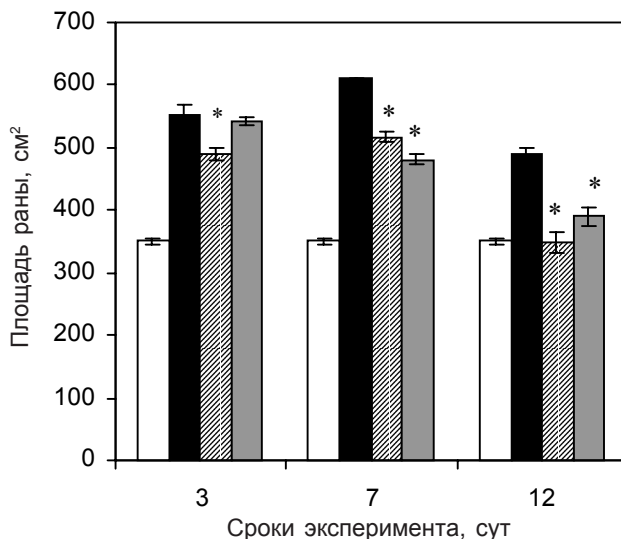


Рис. 3. Активность щелочной фосфатазы в периферической крови крыс на модели аспириновой язвы желудка: □ – норма; ■ – контроль; ▨ – Актовегин; □ – ФКК; * – $p < 0,05$ в сравнении с контролем.

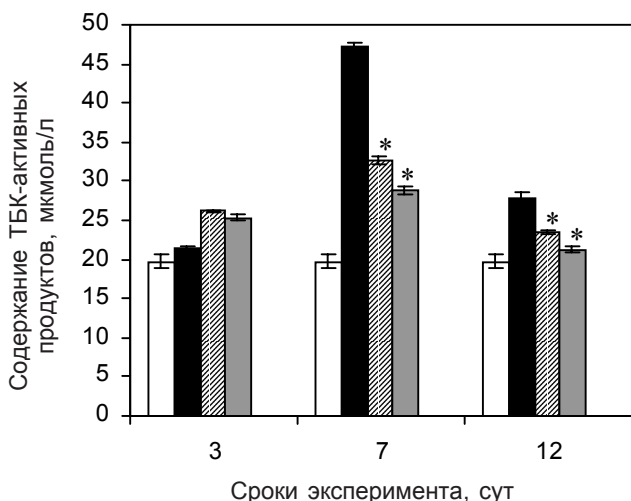


Рис. 4. Содержание ТБК-активных продуктов в периферической крови крыс на модели аспириновой язвы желудка: □ – норма; ■ – контроль; ▨ – Актовегин; □ – ФКК; * – $p < 0,05$ в сравнении с контролем.

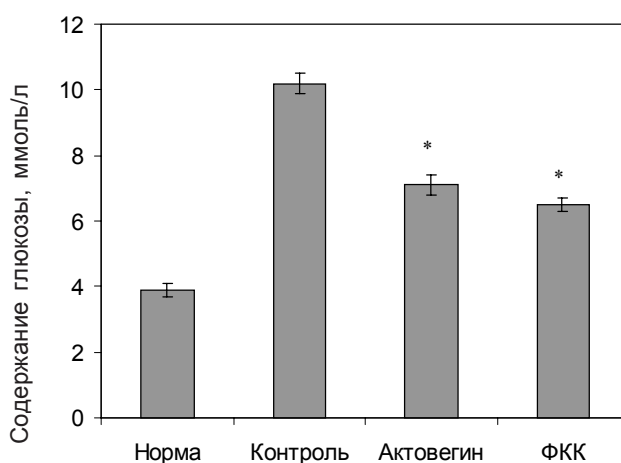


Рис. 5. Содержание глюкозы в периферической крови крыс на 20-й минуте проведения теста толерантности к глюкозе: * – $p < 0,01$ в сравнении с контролем.

использовании Актовегина – 0,5, а ФКК – 0,3 балла (таблица).

На 12-е сутки эксперимента морфологическая картина в гистологических срезах СОЖ в контроле характеризовалась значительной протяженностью язвенной поверхности, отеком, кровоизлияниями, лимфоидно-клеточной инфильтрацией. Регенерация эпителия ограничивалась краевыми участками и не имела значительной протяженности. После введения ФКК и Актовегина наблюдали восстановление толщины и структуры железистого слоя, пролиферацию эпителия большей части поверхности язвенных поражений, слабо выраженный лимфоидно-клеточный инфильтрат в поверхностных отделах СОЖ. Однако следует отметить, что только при лечении ФКК наблюдалась полноценная регенерация эпителия в более ранние сроки эксперимента.

После введения ФКК и Актовегина в крови животных нормализовались показатели активности ЩФ (рис. 3) и содержания ТБК-реагирующих продуктов (рис. 4), что свидетельствует о снижении воспалительных процессов в организме опытных крыс.

Изучение сахароснижающего действия ФКК позволило установить, что, как и Актовегин, фракция достоверно снижает содержание глюкозы в крови экспериментальных животных (рис. 5), что указывает на способность повышать энергетический потенциал клеток [1].

Важно в понимании противовоспалительного действия также то, что, как и Актовегин, ФКК *in vivo* и *in vitro* активизирует фагоцитарную функцию

Противоязвенная активность фракции до 5 кДа из кордовой крови на модели аспириновой язвы желудка у крыс

Условия опыта (n = 6)	Количество животных с язвами в группе на 12-е сутки, %	Средняя площадь язв, баллы
Контроль	75	1,8
Актовегин	0	0,5
Фракция из кордовой крови	0	0,3

лейкоцитов, которую оценивали по показателям фагоцитарного индекса, фагоцитарного числа и индекса завершенности фагоцитоза.

В экспериментах *in vitro* также было показано, что ФКК способствует увеличению скорости распластывания клеток и их приросту к 4 суткам роста культуры, изменяет митотический режим культур в сторону скорейшего вступления клеток в митоз и достоверно не меняет их способность к адгезии. Несмотря на различия в действии на разные клеточные культуры, в целом ФКК показала себя более эффективно, чем Актовегин.

Выводы

Полученные результаты свидетельствуют о высокой терапевтической активности фракции до 5 кДа из кордовой крови, которая проявляется в ранозаживляющем, противоязвенном и сахароснижающем действии в условиях *in vivo*. Данные экспериментальных исследований *in vitro* доказывают активность фракции ФКК на клеточном уровне, что проявляется в усилении митотической и функциональной активности клеток.

Литература

1. *Актовегин*. Новые аспекты клинического применения / Под ред. С.А. Румянцевой. – М., 2002. – 280 с.
2. Брок Т. Мембранная фильтрация. – М.: Мир, 1987. – 464 с.
3. Гулевский А.К., Абакумова Е.С., Моисеева Н.Н., Долгих О.Л. Влияние фракции кордовой крови (до 5 кДа) крупного рогатого скота на биохимические показатели крови при экспериментальной субхронической язве желудка у крыс // Укр. биохим. журнал. – 2008. – Т. 80, №2. – С. 92–99.
4. *Доклінічні дослідження лікарських засобів: Метод. рекомендації* / За ред. О.В. Стефанова. – Київ, 2001. – 528 с.
5. Кудрявицкий А.И. Оценка киллерной бактерицидности нейтрофилов периферической крови здоровых и больных в прямом и визуальном тесте // Лаб. дело. – 1985. – №1. – С. 45–47.
6. *Лабораторные методы* исследования в клинике. Справочник / Под ред. В.В. Миньшикова. – М.: Медицина, 1987. – 368 с.
7. Лилли Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия. – М.: Мир, 1969. – 624 с.
8. *Методические рекомендации* по криоконсервированию и цитологическому контролю качества культур клеток и фрагментов ткани. – Харьков, 1993. – 20 с.
9. Подопрігора Г.И., Андреев В.Н. Современные методы изучения фагоцитарной активности лейкоцитов *in vitro* // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 1976. – №1. – С. 19–25.
10. *Энциклопедия* клинических лабораторных тестов. – М., 1997. – 526 с.
11. Пат. №6521, МПК⁷ А61К35/54, Україна. Препарат “Культура диплоїдних клітин людини” для клітинної терапії / О.І. Гончарук, Т.П. Петренко, Н.О. Волкова, В.І. Грищенко. Заявлено 20.09.04. Опубл. 16.05.05. Бюл. №5.
12. *Basic Cell Culture*. Practical approach. Second edition / Ed. by J.M. Davis. – Oxford, 2001. – 381 p.
13. Mihara M., Uchiyama M., Fukuzawa K. Thiobarbituric acid value on fresh homogenate of rat as a parameter of lipid peroxidation in aging, CCl₄ intoxication, and vitamin E deficiency // Biochem. Med. – 1980. – Vol. 23, N3. – P. 302–311.

Поступила 17.07.2008