

УДК 611.018.5.088:618.48:57.086.13:616.5-001.17-08

А.К. Гулевский, Н.Н. Моисеева, О.Л. Горина*, А.Ю. Никольченко, И.И. Щенявский

Сравнительная оценка биологической активности фракции до 5 кДа из кордовой крови крупного рогатого скота после низкотемпературного хранения (при –80°C) или лиофилизации при лечении ожоговых ран у крыс

UDC 611.018.5.088:618.48:57.086.13:616.5-001.17-08

A.K. Gulevskyy, N.N. Moiseyeva, O.L. Gorina*, A.Yu. Nikolchenko, I.I. Schenyavsky

Comparative Evaluation of Biological Activity of Fraction Below 5 kDa from Cattle Cord Blood After Low-Temperature Storage (at –80°C) or Lyophilization to Treat Burn Wounds in Rats

Реферат: В работе исследовали биологическую активность низкомолекулярной (до 5 кДа) фракции из кордовой крови крупного рогатого скота после хранения в лиофилизированном состоянии при 4°C (ФККЛ) и при –80°C в виде раствора (ФКК) на модели термического ожога кожи крыс. В качестве препарата сравнения использовали «Актовегин», обладающий выраженной ранозаживляющей активностью. Установлено, что хранение низкомолекулярной фракции в течение 3-х месяцев в выбранных условиях не снижает ее биологическую активность. Введение экспериментальным животным ФКК и ФККЛ после моделирования термического ожога кожи способствовало уменьшению площади ожоговой раны, нормализации содержания лейкоцитов и фагоцитарной активности нейтрофилов в периферической крови. Полученные результаты позволяют рассматривать лиофилизацию низкомолекулярной фракции с последующим хранением при 4°C как практически и экономически более оправданный способ хранения и транспортировки биологически активного вещества.

Ключевые слова: низкомолекулярная фракция, кордовая кровь, низкотемпературное хранение, лиофилизация, биологическая активность, ожог.

Реферат: У роботі досліджували біологічну активність низькомолекулярної (до 5 кДа) фракції з кордової крові великої рогатої худоби після зберігання у ліофілізованому стані при температурі 4°C (ФККЛ) та при –80°C у вигляді розчину (ФКК) на моделі термічного опіку шкіри щурів. У якості препарату порівняння використовували «Актовегін», який володіє вираженою ранозагоюючою активністю. Встановлено, що зберігання низькомолекулярної фракції протягом 3-х місяців в обраних умовах не впливає на її біологічну активність. Введення експериментальним тваринам ФКК та ФККЛ після моделювання термічного опіку шкіри сприяло зменшенню площі опікової рани, нормалізації вмісту лейкоцитів і фагоцитарної активності нейтрофілів у периферичній крові. Отримані результати дозволяють розглядати ліофілізацію низькомолекулярної фракції з наступним зберіганням при 4°C як практично та економічно більш виправданий спосіб зберігання і транспортування біологічно активної речовини.

Ключові слова: низькомолекулярна фракція, кордова кров, низькотемпературне зберігання, ліофілізація, біологічна активність, опік.

Abstract: Biological activity of the low molecular weight (down to 5 kDa) fraction from cattle cord blood after storage in lyophilized state at 4°C and –80°C in the form of solution in a model of thermal burn of rats' skin was investigated. Actovegin with a pronounced wound healing activity was used as a comparator drug. The storage of low molecular weight fraction for 3 months under the chosen conditions was found not to reduce its biological activity. Introduced and lyophilized cord blood fraction to experimental animals after simulation of thermal skin burns contributed to a reduced burn wound area, normalization of leukocyte content and phagocytic activity of neutrophils in peripheral blood. The findings enable considering the lyophilization of the low molecular weight fraction followed by storage at 4°C as sensibly more expedient option of storing and transporting the biologically active substance.

Key words: low molecular weight fraction, cord blood, low temperature storage, lyophilization, biological activity, burn.

В настоящее время в клинической практике для лечения ряда патологий различного генеза применяют как синтетические препараты, так и препараты природного происхождения. Особое место среди них занимают лекарственные средства из цельной кордовой крови или ее отдельных

Currently, in clinical practice both synthetic and natural drugs are applied to treat a number of pathologies of various origins. A special place among them is occupied by medical products derived from whole cord blood or its individual components, which comprise a unique balanced

Відділ холодової адаптації, Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

Department of Cold Adaptation, 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: ogorina2603@gmail.com

*To whom correspondence should be addressed:

23, Pereyaslavska str., Kharkiv, Ukraine 61016;
tel.: +380 57 373 7435, fax: +380 57 373 5952
e-mail: ogorina2603@gmail.com

Надійшла 27.08.2018

Прийнята до друку 11.02.2020

Received 27, August, 2018

Accepted 11, February, 2020

© 2020 O.L. Gorina, 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.

компонентов, которые имеют в своем составе уникальный сбалансированный комплекс биологически активных веществ, воздействующий на отдельные системы организма и на метаболизм в целом [5, 15]. Ранее нами была показана эффективность действия фракции до 5 кДа, полученной из крови молочных телят и кордовой крови крупного рогатого скота, при лечении различных экспериментальных патологий у крыс (субхроническая язва желудка, механическое повреждение хряща коленного сустава), а также при исследовании динамики процессов сопряженного дыхания митохондрий после предварительного введения животным фракции кордовой крови до 5 кДа [3, 4].

Актуальными остаются вопрос длительности хранения и поиск оптимальной лекарственной формы с сохранением биологической активности препаратов из кордовой крови. Для продолжительного хранения компонентов крови с сохранением структуры и функциональных свойств применяют специальные протоколы замораживания с последующим хранением при ультранизких температурах [5, 13]. Однако в клинической практике в силу специфики жидкоазотной технологии, а также необходимости приобретения дорогостоящего оборудования и подготовки высококвалифицированного персонала данный метод требует значительных финансовых затрат. Более экономичным является использование электрорефрижераторных технологий с реализацией низкотемпературного консервирования (при -80°C) биологически активных субстанций [12]. Кроме того, существует такой способ консервирования биоматериала, как криосублимационное высушивание, которое предполагает удаление основной массы воды путем сублимации льда из замороженного материала с сохранением его первичной структуры и биологической активности [1, 9]. Для предупреждения сорбции влаги из окружающей среды лиофилизированные препараты приемлемо хранить при температуре от 0 до 4°C [1].

На основании вышеизложенного целью настоящей работы было сравнительное изучение на модели термического ожога кожи крыс биологической активности низкомолекулярной (до 5 кДа) фракции кордовой крови крупного рогатого скота после хранения в течение 3-х месяцев при 4°C в лиофилизированном состоянии и при -80°C в виде раствора.

Материалы и методы

Фракцию с компонентами м. м. до 5 кДа из цельной кордовой крови крупного рогатого скота

combination of biologically active substances, affecting individual body systems and metabolism as a whole [4, 11]. Earlier we have shown the effectiveness of below 5 kDa fraction obtained from the blood of vealers and cattle cord blood in treatment of various experimental pathologies in rats (subchronic gastric ulcer, mechanical damage to the cartilage of the knee joint), as well as in studying the dynamics of the processes of conjugated breathing mitochondria after preliminary administration of cord blood fractions below 5 kDa to animals [7, 10].

The issue of storage duration and search for an optimal medical form while preserving the biological activity of cord blood products has remained relevant. For a long-term storage of blood components while maintaining the structure and functional properties, the specific freezing protocols are used followed by storage at ultralow temperatures [6, 11]. However, in clinical practice, because of specificity of liquid nitrogen exploitation, as well as the need to purchase an expensive equipment and train highly qualified personnel, this method requires sound financial costs. More cost-efficient is the use of electrorefrigeratory techniques with the implementation of low-temperature preservation (at -80°C) of biologically active substances [20]. In addition, there is such a method of preserving biospecimen as freeze-drying, which involves the removal of the bulk of water by sublimation of ice from frozen material with keeping its primary structure and biological activity [2, 17]. To prevent sorption of moisture from an environment, it is tolerable to store lyophilized specimens at temperatures from 0 to 4°C [2].

Based on the foregoing, the goal of this work was a comparative study of biological activity of a low molecular weight (below 5 kDa) fraction of cattle cord blood in a thermal burn model of rat skin after storage for 3 months at 4°C in a lyophilized state and at -80°C in the form of a solution.

Materials and methods

A fraction with the components below 5 kDa derived from cattle whole cord blood (CWCB) was isolated by ultrafiltration [3] using a membrane module of the company (Sartorius, Germany). Cattle cord blood without an anticoagulant was previously subjected to cryodestruction by slow freezing in a plastic container down to -196°C and slow thawing. After ultrafiltration, the fraction was frozen in sterile vials down to -40°C and stored at -30°C for at least 12 h for 'quenching hardening' before loading into a sublimation unit. The samples were



(КРС) выделяли методом ультрафильтрации [2] с использованием мембранного модуля фирмы («Sartorius», Германия). Кордовую кровь КРС без антикоагулянта предварительно подвергали криодеструкции путем медленного замораживания в пластиковом контейнере до -196°C и медленного оттаивания. Фракцию после ультрафильтрации замораживали в стерильных флаконах до -40°C и хранили при -30°C не менее 12 ч для «закалки» перед загрузкой в сублимационную установку. Лиофилизацию образцов проводили на приборе «FreeZone» («Labconco», США) с общей продолжительностью высушивания 28–30 ч и температуре фракции при конечной фазе сушки не более 40°C . Часть лиофилизированной фракции растворяли в физиологическом растворе до концентрации 40 мг/мл и затем хранили при -80°C (далее ФКК). Фракцию в лиофилизированном состоянии хранили при 4°C (далее ФККЛ), перед введением экспериментальным животным ее разводили в физиологическом растворе.

Биологическую активность фракций после 3-х месяцев хранения изучали на модели термического ожога III степени у крыс [8]. В экспериментах использовали белых беспородных крыс трехмесячного возраста и массой тела 140–150 г. Ожог III степени (по клинической классификации ожогов) воспроизводили путем прикладывания к выбритой коже спины животного в области тазового отдела медного аппликатора площадью $6,25\text{ cm}^2$, разогретого до температуры 200°C , в течение 10 с. Степень ожога при использовании данной методики подтверждена гистологическими методами исследования, описанными ранее [8].

Экспериментальных животных после моделирования термического ожога распределяли на группы (в каждой $n = 7$), которым в течение 14 суток ежедневно, начиная со следующего дня после нанесения ожога, внутримышечно вводили: 1 (контроль) – физиологический раствор в эквивалентном объеме; 2 – низкомолекулярную фракцию кордовой крови КРС после хранения в лиофилизированном состоянии при 4°C ; 3 – низкомолекулярную фракцию кордовой крови КРС после хранения при -80°C ; 4 – фармакологический препарат сравнения «Актовегин» («Nicomed», Австрия). Дозировку препаратов рассчитывали в соответствии с терапевтической дозой «Актовегина», описанной в инструкции к препарату: 1,2 мг сухого веса вещества на 100 г массы животного. Также в эксперименте участвовали интактные животные, которые не подвергались никаким воздействиям (группа 5).

Площадь ран оценивали на 3, 7, 14 и 21-е сутки эксперимента. Для этого раны фотографирова-

лиophilized with a FreezeZone Triad freeze dryer (Labconco, USA) with a total drying time of 28–30 h and a fraction temperature at the final drying phase of not higher than 40°C . A part of the lyophilized cord blood fraction (hereinafter CBF) was dissolved in physiological saline to a concentration of 40 mg / ml and then stored at -80°C . The lyophilized fraction (hereinafter CBFL) was stored at 4°C , before administration to experimental animals, it was bred in physiological saline.

The biological activity of the fractions after 3 months of storage was studied in a model of 3rd-degree burns in rats [15]. Three-months aged white outbred rats of 140–150g body weight were used in the experiments. A 3rd-degree burn (according to clinical classification of burns) was reproduced by applying of a copper applicator with an area of 6.25 cm^2 , heated up to 200°C within 10 s to a shaved skin of the animal's back in pelvic region. The degree of burn when using this technique is confirmed by histology analysis described previously [15].

Experimental animals after a thermal burn simulation were divided into groups ($n = 7$ in each), which for 14 days daily, starting from the day after the burn application, were intramuscularly injected with: 1 (control) – physiological saline in an equivalent volume; 2 – low molecular weight fraction of cattle cord blood after storage in a lyophilized state at 4°C ; 3 – low molecular weight fraction of cattle cord blood after storage at -80°C ; 4 – pharmacological comparator Actovegin (Nicomed, Austria). The dosage of drugs was calculated in accordance with the therapeutic dose of Actovegin, specified in the instructions for this drug: 1.2 mg of dry matter per 100 g of animal weight. Also, the experiment involved intact animals, not exposed to any effects (group 5).

The area of the wounds was evaluated on days 3, 7, 14 and 21 of the experiment. With this aim the wounds were photographed with a digital camera and processed using the PaintShop Pro 2.0 software (Corel Corporation, Canada), which enables calculating an irregular surface area.

The number of leukocytes in peripheral blood of rats was counted in the Goryaev's chamber according to the unified method [13] within the established experiment time frames. The phagocytic activity of rat peripheral blood leukocytes was studied according to the method of O.E. Rozanova *et al.* [18]. An inactivated daily culture of *Staphylococcus aureus* strain N 209 in physiological saline at a concentration of 2 billion cells/ml was used as an object of phagocytosis. For the phagocytosis a 96-well plate was used (for



ли цифровой камерой и обрабатывали с использованием программного пакета «PaintShop Pro 2.0» («Corel Corporation», Канада), позволяющего рассчитать площадь поверхности неправильной формы.

Количество лейкоцитов в периферической крови крыс в установленные сроки эксперимента подсчитывали в камере Горяева согласно унифицированному методу [7]. Фагоцитарную активность лейкоцитов периферической крови крыс исследовали по методу О.Е. Розановой и соавт. [10]. В качестве объекта фагоцитоза использовали инактивированную суточную культуру *Staphylococcus aureus* штамм № 209 в физиологическом растворе в концентрации 2 млрд клеток/мл. Для постановки реакции фагоцитоза использовали 96-луночный планшет (для иммунологического тестирования), в необходимое количество лунок вносили по 100 мкл гепаринизированной крови и по 50 мкл микробной суспензии. После инкубации в воздушном термостате при температуре 37°C в течение 45 и 120 мин делали мазки, фиксировали раствором эозина и метиленового синего (по Май-Грюнвальду) и окрашивали раствором азура и эозина (по Романовскому). Окрашенные мазки анализировали с помощью светового микроскопа («PZO-Warszawa», Польша) под иммерсией (ок. 8, об. 100). Определяли количество фагоцитирующих нейтрофилов – фагоцитарный индекс (ФИ, %), среднее количество микробных тел на один нейтрофил – фагоцитарное число (ФЧ, абс. ед.) после 45 и 120 мин инкубации и индекс завершенности фагоцитоза (ИЗФ, отн. ед.) – отношение фагоцитарного числа после 45-минутной инкубации к фагоцитарному числу после 120-минутной инкубации, характеризующее перемаривающую активность нейтрофилов.

Эксперименты были проведены в соответствии с Законом Украины «О защите животных от жестокого обращения (№3447-IV от 21.02.2006) при соблюдении требований Комитета по биоэтике Института, согласованных с положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986).

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием программы «Statgraphics plus for Windows 2.1» («Manugistics Inc.», США) по непараметрическому критерию Манна-Уитни. Экспериментальные данные приведены как среднее арифметическое $\pm$ среднее квадратическое отклонение.

immunological testing), 100 μ l heparinized blood and 50 μ l microbial suspension were added to the required number of wells. After incubation in an air thermostat at a temperature of 37°C for 45 and 120 minutes, the smears were made, fixed with a solution of eosin and methylene blue (according to May-Grunwald) and stained with azur and eosin solution (according to Romanowsky). Stained smears were analyzed using a light microscope (PZO-Warszawa, Poland) with an immersion (eye piece 8, $\times$ 100). There were determined a number of phagocytic neutrophils, *i. e.* phagocytic index (PI,%), an average number of microbial bodies per neutrophil, *i. e.* phagocytic number (PN, abs. units) after 45 and 120 min of incubation and the index of phagocytosis completion (IPC, rel. units) the ratio of the phagocytic number after a 45-minute incubation to the phagocytic number after a 120-minute incubation, which characterizes the digesting activity of neutrophils.

The experiments were carried out in accordance with the Law of Ukraine 'On the Protection of Animals Against Cruelty (N 3447-IV dated of February 21st, 2006), subject to the requirements of the Institute's Bioethics Committee, consistent with the provisions of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other scientific purposes' (Strasbourg, 1986).

The results were statistically processed using the Statgraphics plus for Windows 2.1 (Manugistics Inc., USA) software according to the nonparametric Mann-Whitney criterion. The experimental data are presented as arithmetic mean $\pm$ standard deviation.

Results and discussion

The results of studying the healing dynamics for burn wounds in experimental animals with an introduced low molecular weight fraction of cord blood after storage are shown in Fig. 1. The data obtained indicate that in the groups of animals after the introduction of a lyophilized low molecular weight fraction, the fraction stored at -80°C , and Actovegin comparator, the wound healing rate was higher than in the control group. Thus on day 14 of the experiment the rats of groups 2–4 demonstrated a statistically significant decrease in the wound surface area if compared with the control by an average of 43.7–62.5%. However, no strong differences of this index between groups 2 and 3, injected with a lyophilized fraction or a low molecular weight fraction after storage at -80°C , were found during all observation periods (Fig. 1).



Результаты и обсуждение

Результаты исследования динамики заживления ожоговых ран у экспериментальных животных при введении низкомолекулярной фракции кордовой крови после хранения приведены на рис. 1. Полученные данные свидетельствуют о том, что в группах животных после введения лиофилизированной низкомолекулярной фракции, фракции, хранившейся при -80°C , и препарата сравнения «Актовегин» скорость заживления раны была выше, чем в контрольной группе. Так, к 14-м суткам эксперимента у крыс групп 2–4 отмечено статистически значимое уменьшение площади раневой поверхности по сравнению с контролем в среднем на 43,7–62,5%. Однако значимых отличий данного показателя между группами 2 и 3, которым вводили лиофилизированную фракцию или низкомолекулярную фракцию после хранения при -80°C , в течение всех сроков наблюдения не выявлено (рис. 1).

Ожоговая травма часто сопровождается развитием системного воспалительного ответа, что может проявляться в развитии лейкоцитоза и нарушении функций фагоцитарной системы организма [6, 14]. В наших исследованиях установлено значимое повышение содержания лейкоцитов после моделирования термического ожога, сохранявшееся на этом же уровне в течение 7-ми суток у животных всех групп (рис. 2). Введение ФККЛ, ФКК и «Актовегина» статистически значимо снижало данный показатель к 14-м суткам эксперимента по сравнению с контролем. Количество лейкоцитов в периферической крови крыс, которым вводили исследуемые фракции и препарат сравнения, достигало показателя нормы (группа интактных животных) на 21-е сутки после ожога. Анализ содержания лейкоцитов на всех сроках эксперимента не выявил значимых отличий в группах животных, которым вводили исследуемые фракции, по сравнению с «Актовегином». В контрольной группе этот показатель оставался выше нормы в течение всех сроков наблюдения.

Среди факторов неспецифической защиты, обеспечивающих адаптацию организма к пост-агрессивным состояниям, важная роль отводится фагоцитозу. Установлено, что под влиянием

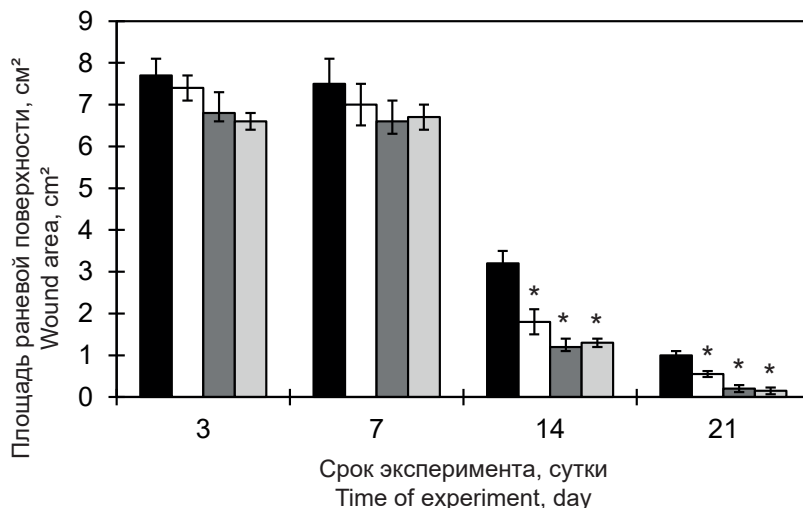


Рис. 1. Изменение площади ожоговых ран у экспериментальных животных после введения низкомолекулярной (до 5 кД) фракции кордовой крови крупного рогатого скота, подвергнутой разным режимам хранения, и препарата сравнения «Актовегин» в группах 1 (■); 2 (□); 3 (■); 4 (■). * – отличия статистически значимы по сравнению с контрольной группой, $p < 0,05$.

Fig. 1. Change in burn wound area in experimental animals after introduction of low molecular (below 5kDa) cattle cord blood fraction subjected to different storage regimens, as well as Actovegin comparator drug in groups 1 (■), 2 (□), 3 (■), 4 (■). * – differences are significant if compared with the control group, $p < 0.05$.

Burn injury is often accompanied with the appearance of a systemic inflammatory response, which can manifest itself in the development of leukocytosis and impaired functions of the body phagocytic system [1, 21]. In our studies, a significant increase in leukocyte count a thermal burn after modeling was found, which remained at the same level for 7 days in the animals of all groups (Fig. 2). The introduction of CBFL, CBF and Actovegin statistically and significantly reduced this index by day 14 of the experiment if compared with the control. The number of leukocytes in peripheral blood of rats, injected with the investigated fractions and the comparator drug, reached the norm (group of intact animals) on day 21 after the burn. Analysis of the content of leukocytes at all periods of the experiment did not reveal significant differences in the groups of animals injected with the studied fractions, if compared with Actovegin. In the control group, this index remained above the norm during all the periods of observation.

Among the factors of nonspecific protection, ensuring a body adaptation to post-aggressive conditions, the phagocytosis plays an important role. It was established that under the influence of burn injury, a marked disorder of the function of macrophages and polymorphonuclear leukocytes occurred with a predominant change in intracellu-

ожоговой травмы происходит выраженное нарушение функции макрофагов и полиморфоядерных лейкоцитов с преимущественным изменением процесса внутриклеточного лизиса бактерий, что приводит к развитию инфекции [6, 20]. Данный факт определяет практическую значимость тест-системы, используемой в настоящей работе.

Анализ фагоцитарной активности нейтрофилов периферической крови крыс показал, что после моделирования термического ожога снижалась поглотительная (ФЧ) и переваривающая (ИЗФ) активность клеток (таблица). Так, на 3-и сутки наблюдения ФЧ45 в контрольной группе (после 45 мин инкубации крови со стафилококком) снижалось на 38,4% по сравнению со значением интактных животных. Исследуемый показатель в контроле нормализовался к 21-м суткам эксперимента. В группах животных, которым вводили фракции после хранения в лиофилизированном состоянии или при -80°C и препарат сравнения, наблюдалась иная динамика ФЧ45 нейтрофилов. У крыс, получавших инъекции «Актовегина», уже на 3-и сутки значение ФЧ45 нейтрофилов было на уровне нормы ($26,2 \pm 1,1$) и ($27,6 \pm 1,3$) абс. ед. соответственно и не изменялось в течение эксперимента. В группе 2 на 7-е сутки этот показатель значимо повышался (30,8%) по сравнению с контролем и нормализовался на 14-е сутки наблюдения. В то же время значение ФЧ45 на 7-е сутки у животных группы 3 значимо не отличалось от контрольного, но к 14-м суткам достигало нормы.

Для наиболее полной характеристики функционального состояния лейкоцитов крови крыс определяли показатель, отражающий переваривающую активность клеток, – ИЗФ. Данный индекс характеризует отношение среднего числа фагоцитированных микробных тел (ФЧ45) к среднему числу неразрушенных микробных тел (ФЧ120). Завершенным в этом случае считается фагоцитоз при показателе более единицы [10]. Динамика ИЗФ, сниженного в ре-

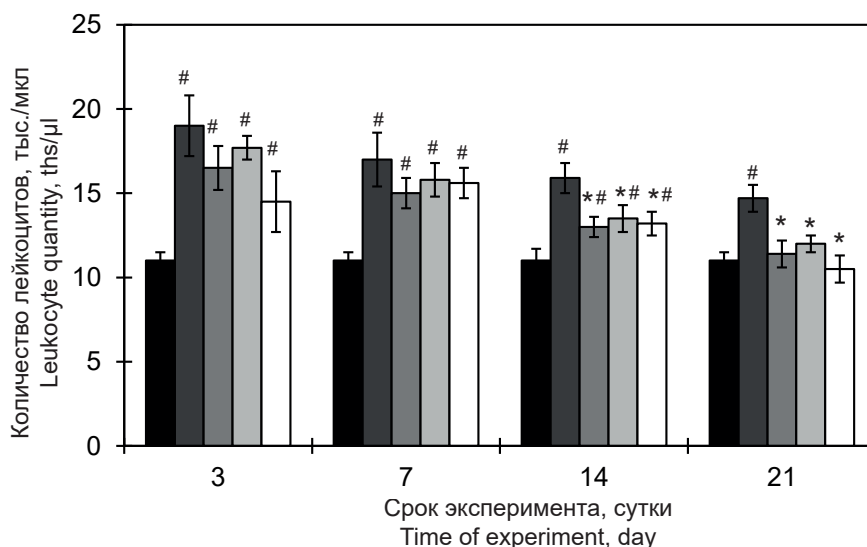


Рис. 2. Содержание лейкоцитов в периферической крови крыс после моделирования термического ожога III степени и введения низкомолекулярной (до 5 кД) фракции кордовой крови крупного рогатого скота, подвергнутой разным режимам хранения, и препарата сравнения «Актовегин» в группах 1 (■), 2 (□), 3 (■), 4 (■), 5 (■). * – отличия статистически значимы по сравнению с контрольной группой, # – отличия статистически значимы по сравнению с нормой; $p < 0,05$.

Fig. 2. Content of leukocytes in peripheral blood of rats after simulation of 3-degree burn and introduction of low molecular (below 5kDa) cattle cord blood fraction subjected to different storage regimens, as well as Actovegin comparator drug in groups 1 (■), 2 (□), 3 (■), 4 (■), 5 (■). * – differences are significant if compared with the control group, # – differences are significant if compared with the norm, $p < 0.05$.

lar lysis of bacteria, that led to the development of infection [14, 21]. This fact determines a practical significance of the test system used in this work.

An analysis of phagocytic activity of rat peripheral blood neutrophils showed that after modeling a thermal burn, the absorbing (PN) and digesting (IPC) cell activity decreased (Table). So, on day 3 of observation in the control group the value of PN45 (after 45 min of incubation of blood with staphylococcus) reduced by 38.4% if compared with the one for intact animals. The studied parameter in the control returned to the norm on day 21 of the experiment. In groups of animals, injected with the fractions after storage in a lyophilized state or at -80°C and the comparator drug, a different dynamics of neutrophil PN45 was observed. In rats treated with Actovegin injections, already on the 3rd day, the PS45 neutrophil value was at the normal level (26.2 ± 1.1) and (27.6 ± 1.3) abs. accordingly, it did not change during the experiment. In group 2, on day 7 this index was significantly increased (30.8%) if compared with the control and it normalized on day 14 of observation. At the same time, the value of PN45 on day 7 in animals of group 3 did not significantly differ from the control, but by day 14 it reached the norm.



Показатели фагоцитарной активности нейтрофилов периферической крови крыс после моделирования термического ожога III степени и введения низкомолекулярной (до 5 кД) фракции кордовой крови крупного рогатого скота, подвергнутой разным режимам хранения

Phagocyte activity of neutrophils of rat peripheral blood after simulation of 3-degree burn and introduction of low molecular (below 5 kDa) cattle cord blood fraction subjected to different storage regimens

Группа животных Group of animals	Сроки наблюдения, сутки Observation terms, days	Показатель фагоцитарной активности Phagocyte activity indices				
		ФИ45, % PI45, %	ФИ120, % PI120, %	ФЧ45, абс. ед. PN45, absolute units	ФЧ120, абс. ед. PN120, absolute units	ИЗФ (ФЧ45/ФЧ120) IPC (PN45/PN120)
Группа 5 Group 5	0	65,0 ± 1,3	70,3 ± 1,0	27,6 ± 1,3	25,0 ± 1,2	1,10 ± 0,03
Группа 1 Group 1	3	73,1 ± 1,0	65,0 ± 2,0	17,0 ± 1,0	19,1 ± 1,3	0,89 ± 0,05
Группа 2 Group 2		60,1 ± 0,7	65,0 ± 0,9	18,0 ± 1,1	20,1 ± 1,0	0,90 ± 0,05
Группа 3 Group 3		55,4 ± 1,5	61,2 ± 1,0	18,1 ± 0,9	18,8 ± 0,6	0,96 ± 0,06
Группа 4 Group 4		56,5 ± 1,5	60,2 ± 2,1	26,2 ± 1,1*	24,7 ± 1,0	1,06 ± 0,05*
Группа 1 Group 1	7	57,2 ± 1,5	52,8 ± 3,0	18,2 ± 1,3	22,0 ± 1,3	0,83 ± 0,02
Группа 2 Group 2		65,0 ± 0,9	68,2 ± 0,6	23,8 ± 1,5*	24,5 ± 0,7	0,97 ± 0,02
Группа 3 Group 3		60,3 ± 1,6	63,4 ± 1,6	20,0 ± 0,7	21,0 ± 0,9	0,95 ± 0,05
Группа 4 Group 4		69,0 ± 0,8	70,2 ± 0,5	27,1 ± 1,5*	26,5 ± 0,6	1,02 ± 0,02*
Группа 1 Group 1	14	65,3 ± 1,5	60,0 ± 0,9	19,4 ± 1,3	22,0 ± 0,9	0,88 ± 0,01
Группа 2 Group 2		70,1 ± 0,7	67,2 ± 0,6	25,1 ± 0,9*	22,8 ± 1,1	1,10 ± 0,03*
Группа 3 Group 3		62,9 ± 2,0	68,0 ± 1,6	26,0 ± 0,6*	24,9 ± 1,0	1,04 ± 0,05*
Группа 4 Group 4		70,7 ± 0,9	73,3 ± 2,5	29,0 ± 1,8*	24,2 ± 0,9	1,20 ± 0,04*
Группа 1 Group 1	21	63,2 ± 3,0	67,1 ± 2,0	25,2 ± 0,9	24,7 ± 1,1	1,02 ± 0,05
Группа 2 Group 2		68,8 ± 0,9	69,0 ± 1,2	27,9 ± 1,2	24,5 ± 0,6	1,14 ± 0,03
Группа 3 Group 3		66,1 ± 0,6	70,1 ± 2,6	26,0 ± 1,3	24,1 ± 1,03	1,08 ± 0,08
Группа 4 Group 4		69,8 ± 0,9	75,6 ± 2,0	27,5 ± 0,7	23,5 ± 1,1	1,17 ± 0,04

Примечание: * – отличия статистически значимы по сравнению с контрольной группой, $p < 0,05$.

Note: * – differences are statistically significant if compared with the control, $p < 0.05$.

результате нанесения ожоговой травмы, в контрольной группе животных прямо коррелировала с показателем поглотительной активности нейтрофилов (таблица). В контроле ИЗФ ((1,02 ± 0,05) отн. ед.) достигал значения нормы ((1,10 ± 0,03) отн. ед.) к 21-м суткам эксперимента. У крыс, которым вводили лиофилизированную низкомолекулярную фракцию и фракцию после хранения при -80°C, данный показатель имел тенденцию к нормализации уже на 7-е сутки и был

For the most profound assessment of a functional state of rat blood leukocytes, an index reflecting the digesting activity of the cells IPC was determined. It characterizes the ratio of the mean of phagocytized microbial bodies (PN45) to that of intact microbial bodies (PN120). In this case, phagocytosis is considered as complete when the index is more than unity [18]. The dynamics of IPC decreased as a result of applying a burn injury in the control group of animals directly correlated

значительно выше контрольного. На 14-е сутки после введения исследуемых фракций ИЗФ нормализовался. Необходимо отметить тот факт, что значимых отличий ИЗФ между группами 2 и 3 не выявлено. В группе 4 ИЗФ ($(1,06 \pm 0,05)$ отн. ед.) уже на 3-и сутки достигал значений интактных животных ($(1,10 \pm 0,03)$ отн. ед.).

Фагоцитарный индекс отображает процент активных нейтрофилов, фагоцитирующих микроорганизмы. Существенных изменений ФИ после моделирования термического ожога, а также в течение эксперимента во всех группах животных не установлено.

Таким образом, в проведенной нами работе после моделирования термического ожога III степени у крыс установлено значимое снижение фагоцитарной активности нейтрофилов периферической крови на фоне выраженного лейкоцитоза. Внутримышечное введение ФКК или ФККЛ, а также препарата сравнения «Актовегин» значимо влияло на исследуемые показатели. Низкомолекулярная фракция, подвергнутая лиофилизации и хранению при 4°C , обладала сходным действием с фракцией, находящейся в виде раствора и хранившейся при температуре -80°C . На 14-е сутки отмечено значимое снижение содержания лейкоцитов в крови животных экспериментальных групп по сравнению с контрольной. Однако значимых отличий после введения экспериментальным животным ФККЛ и ФКК в скорости заживления раневой поверхности и содержании лейкоцитов в крови на всех сроках эксперимента не выявлено. При этом установлено, что введение фракции, подвергнутой лиофилизации, нормализовало поглотительную активность нейтрофилов периферической крови в более ранние сроки по сравнению с показателем группы, получавшей инъекции низкомолекулярной фракции после хранения при -80°C .

Ранее нами было показано, что низкомолекулярная фракция кордовой крови крупного рогатого скота, являющаяся аналогом по молекулярной массе «Актовегину», обладает выраженным иммуномодулирующим действием *in vitro* [17]. На основании результатов ингибиторного анализа и исследования транспорта глюкозы, полученных А.К. Гулевским и соавт. [18], мы предполагаем, что стимулирующий эффект фракции в условиях *in vitro* обусловлен непосредственным участием ее компонентов в реакциях энергетического метаболизма клеток, что является одним из факторов повышения показателей их функционального состояния. На основании данных литературы и результатов собственных исследований [3, 4, 11, 18, 21], можно пред-

with the absorption activity of neutrophils (Table). In the control the IPC ((1.02 ± 0.05) rel. units) reached the norm ((1.10 ± 0.03) rel. units) by the 21st day of experiment. In rats, injected with a lyophilized low molecular weight fraction and the one after storage at -80°C , this index tended to normalize already on day 7 and was significantly higher than the control. On day 14 after the administration of the studied fractions, the IPC normalized. It should be noted that no significant differences in IPC between groups 2 and 3 were revealed. In group 4 the IPC ((1.06 ± 0.05) relative units) even on day 3 reached the values of intact animals ((1.10 ± 0.03) rel. units).

The phagocytic index reflects the percentage of active neutrophils that phagocytize microorganisms. Significant changes in PI after modeling a thermal burn, as well as during the experiment, were not found in all groups of animals.

Thus, in our work, after modeling a 3-degree thermal burn in rats, a significant decrease in phagocytic activity of peripheral blood neutrophils was found on one background of severe leukocytosis. Intramuscular administration of CBF or CBFL, as well as the comparator drug Actovegin strongly influenced the studied parameters. The low molecular weight fraction subjected to lyophilization and storage at 4°C had a similar effect with the fraction in the form of a solution and stored at a temperature of -80°C . On day 14 a significant decrease in the leukocyte content in blood of animals of experimental groups was noted if compared with the control. However no indicative differences after the introduction to experimental animals of CBFL and CBF as for healing rate of the wound surface and content of leukocytes in blood at all periods of the experiment were detected. Moreover, it was noted that the introduction of the fraction subjected to lyophilization normalized the absorption activity of peripheral blood neutrophils earlier than in the group, injected with low molecular weight fraction after storage at -80°C .

We have previously shown that the low molecular weight fraction of cattle cord blood, which is an analogue in molecular weight to Actovegin, has a pronounced immune modulating effect *in vitro* [8]. Based on the results of an inhibitory analysis and studies of glucose transport obtained by A.K. Gulevskyy *et al.* [9], we suggest that the stimulating effect of the fraction *in vitro* is explained by a direct involvement of its components into energy metabolism of cells, which is one of the factors that increase their functional state. Considering the published data and the results of



положить, что механизм действия низкомолекулярной фракции кордовой крови обусловлен как непосредственным влиянием компонентов фракции на клетки, так и опосредованным действием на характер воспалительной реакции в системе организма в целом за счет стабилизации энергетического потенциала путем стимуляции процессов потребления кислорода, транспорта и утилизации глюкозы, повышения уровня АТФ, АДФ, фосфокреатина.

Известно, что биологические структуры разной степени организации (клетки, органоиды, комплексы макромолекул и макромолекулы разной природы) могут повреждаться под влиянием низких температур и лиофилизации вследствие физико-химических факторов (обезвоживание, изменение рН среды, повышение концентрации электролитов) [13, 19]. Результатами такого влияния являются денатурация белков, повреждение мембран клеток и органоидов, разрыв межмолекулярных связей и т. д. К действию указанных факторов менее чувствительны низкомолекулярные вещества (пептиды, полисахариды, аминокислоты, нуклеотиды), поэтому они могут сохраняться определенное время в лиофилизированном состоянии или при умеренно низких температурах ($-80\ldots-130^{\circ}\text{C}$).

При температуре -80°C с биомолекулами еще остается прочносвязанная вода, что способствует их низкотемпературной стабилизации [13]. Выбранный способ лиофилизации с остаточной влажностью 1–2% в высушенном биопрепарате позволяет поддерживать конформацию биополимеров, которые после регидратации не утрачивают своих биологических свойств. Предварительное замораживание образца фиксирует его молекулярную структуру, а дальнейшая сушка в режиме криосублимации практически угнетает окислительные процессы, так как диффузия молекулярного кислорода крайне затруднена в замороженном состоянии, и образец постоянно находится в вакууме и не контактирует с кислородом [9, 16]. Это определяет перспективу хранения образцов в данных условиях.

Выводы

Результаты проведенных исследований показали, что хранение низкомолекулярной фракции кордовой крови в лиофилизированном состоянии или в виде раствора при -80°C не снижает ее ранозаживляющую активность. Указанные фракции после 90-суточного хранения сохраняли биологическую активность, сравнимую с действием препарата «Актовегин», по таким показателям, как сокращение площади ожого-

our own studies [7, 9, 10, 16, 19], it can be assumed that the mechanism of action of low molecular weight fraction of cord blood is explained with both a direct influence of the fraction components on cells, and an indirect effect on inflammation character in a body in a whole due to energy potential stabilization by means of stimulation of oxygen consumption, transport and utilization of glucose, increasing the level of ATP, ADP, phosphocreatine.

It is known that cells, organoids, complexes of macromolecules and macromolecules of different nature can be damaged under the influence of low temperatures and lyophilization due to physicochemical factors (dehydration, change in pH, increase in electrolyte concentration) [6, 12]. The results of these effects are protein denaturation, damage to cell membranes and organoids, breaking of molecule-to-molecule bonds, *etc.* Low molecular weight substances (peptides, polysaccharides, amino acids, nucleotides) are less sensitive to these factors; therefore, they can remain for a certain time in a lyophilized state or at moderately low temperatures ($-80\ldots-130^{\circ}\text{C}$).

At a temperature of -80°C , there is still a tight bond of water with the biomolecules, that contributes to their low temperature stabilization [6]. The selected method of lyophilization with a 1–2% residual moisture content in a dried biological sample allows maintaining the conformation of biopolymers, which after rehydration do not lose their biological properties. Preliminary freezing of the sample fixes its molecular structure, and further drying in a cryosublimation mode practically inhibits oxidative processes, since the diffusion of molecular oxygen is extremely complicated in a frozen state, and the sample is in vacuum constantly and does not contact with oxygen [5, 17]. This determines the prospect of storing the samples under these conditions.

Conclusions

The findings demonstrated that storage of a low molecular weight fraction of cord blood either in a lyophilized state or as a solution at -80°C did not reduce its wound healing activity. These fractions after 90 days of storage retained biological activity comparable to the one of Actovegin drug in such indices as a reduced burn wound area, level of leukocytes and phagocytic activity of neutrophils in peripheral blood after simulation of a 3-degree thermal burn. The results obtained suggest that storage of a low molecular weight fraction of cattle cord blood in a lyophilized state at 4°C is a practically expedient and cost-effective method.



вой раны, уровень лейкоцитов и фагоцитарной активности нейтрофилов в периферической крови после моделирования термического ожога III степени. Полученные результаты позволяют предположить, что хранение низкомолекулярной фракции кордовой крови крупного рогатого скота в лиофилизированном состоянии при 4°C является практически и экономически оправданным способом.

Литература

1. Белоус АМ, Цветков ЦД. Научные основы технологии сублимационного консервирования. Киев: Наукова Думка; 1985. 208 с.
2. Брок ТД. Мембранная фильтрация. Москва: Мир; 1987. 464 с.
3. Гулевский АК, Моисеева НН, Абакумова ЕС, и др. Исследование биологической активности фракции до 5 кДа из криогемолизата крови крупного рогатого скота. Проблемы криобиологии. 2008; 18(4): 531–4.
4. Гулевский АК, Никольченко АЮ, Сомов АЮ, и др. Влияние предварительного введения фракции до 5 кДа из кордовой крови на процессы сопряженного дыхания в митохондриях печени крыс. Вестник проблем биологии и медицины. 2012; 9(1): 104–6.
5. Гулевский АК, Щенявский ИИ, Никольченко АЮ. Кордовая кровь и ее компоненты: биологические особенности, клиническое применение, хранение в криобанках. Харьков: Издательский Дом «Райдер»; 2017. 344 с.
6. Єльський ВМ, Стрельченко ЮІ, Зябіцев СВ. Зміни фагоцитарної ланки імунітету у щурів, що зазнали дозованої опікової травми та подальшого впливу поляризованого світла. Травма. 2012; 13(4): 70–4.
7. Козинец ГИ, Макарова ВА. Исследование системы крови в клинической практике. Москва: Триада; 1998. 480 с.
8. Моисеева НН. Влияние низкомолекулярной фракции (до 5 кДа) кордовой крови на регенерацию ожоговых ран у крыс. Світ біології та медицини 2009; (3): 117–20.
9. Осецкий АИ, Грищенко ВИ, Снурников АС, и др. Криосублимационное фракционирование биологических материалов. Проблемы криобиологии. 2006; 16 (2): 230–40.
10. Розанова ОЕ, Серова ЛД, Шабалин ВН. Влияние цитостатических и гормональных препаратов на фагоцитарную активность нейтрофилов больных лейкозом. Гематология и трансфузиология. 1989; 34(4): 15–20.
11. Румянцева СА. Актовегин. Новые аспекты клинического применения. Москва; 2002. 280 с.
12. Сведенцов ЕП, Туманова ТВ, Худяков АН, и др. Сохранение биологических мембран ядерных клеток крови при температуре –80°C. Биологические мембраны. 2008; 25(1): 18–24.
13. Фуллер Б, Грин К, Грищенко ВИ. Криоконсервирование для создания банка клеток: современные концепции на рубеже XXI столетия. Проблемы криобиологии. 2003; 13(2): 62–83.
14. Agita A, Alsagaff MT. Inflammation, immunity, and hypertension. Acta Med Indones [Internet]. 2017; 49(2): 158–65 [Cited 18.08.2018]. Available from: <http://www.actamedindones.org/index.php/ijim/article/view/506/pdf>
15. Damien P, Allan DS. Regenerative therapy and immune modulation using umbilical cord blood-derived cells. Biol Blood Marrow Transplant [Internet]. 2015; 21(9): 1545–54 [Cited 18.08.2018]. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1083879115003791?via%3Dihub>
16. Emami F, Vatanara A, Park EJ, et al. Drying technologies for the stability and bioavailability of biopharmaceuticals. Phar-

References

1. Agita A, Alsagaff MT. Inflammation, immunity, and hypertension. Acta Med Indones [Internet]. 2017 [cited 2018 Aug 18]; 49(2): 158–65. Available from: <http://www.actamedindones.org/index.php/ijim/article/view/506/pdf>
2. Belous AM, Cvetkov DU. [Scientific grounds of the technology of sublimational preservation]. Kyiv: Naukova Dumka; 1985. 208 p. Russian.
3. Brock TD. Membrane filtration: a user's guide and reference manual. Berlin-New York: Springer-Verlag; 1983. 381 p.
4. Damien P, Allan DS. Regenerative therapy and immune modulation using umbilical cord blood-derived cells. Biol Blood Marrow Transplant [Internet]. 2015 [Cited 18.08.2018]; 21(9): 1545–54. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1083879115003791?via%3Dihub>
5. Emami F, Vatanara A, Park EJ, et al. Drying Technologies for the Stability and Bioavailability of Biopharmaceuticals. Pharmaceutics [Internet]. 2018 [cited 2018 Aug 18]; 10(3): E131. Available from: <https://www.mdpi.com/1999-4923/10/3/131/hm>
6. Fuller B, Green C, Grisichenko VI. Cryopreservation for cell banking: current concepts at the turn of the 21st century. Problems of Cryobiology. 2003; 13(2): 62–83.
7. Gulevsky AK, Moiseyeva NN, Abakumova YS, et al. [Studying of biological activity of fraction less than 5 kD from cattle cord blood cryohaemolizate]. Problems of Cryobiology. 2008; 18(4): 531–4. Russian.
8. Gulevsky AK, Moiseyeva NN, Gorina OL. Influence of low-molecular (below 5 kDa) fraction from cord blood and actovegin on phagocytic activity of frozen-thawed neutrophils. CryoLetters. 2011; 32(2): 131–40.
9. Gulevsky AK, Moiseyeva NN, Gorina OL, et al. The influence of low-molecular fraction from cord blood (below 5 kDa) on functional and biochemical parameters of cells *in vitro*. Ukr Biochem J. 2014; 86(6): 167–74.
10. Gulevsky AK, Nikolchenko AYU, Somov AYU, et al. [Influence of the fraction below 5 kDa from cattle cord blood on respiratory activity of rat liver homogenates]. Vestnik Problem Biologii i Medicyny. 2012; 9(1): 104–6. Russian.
11. Gulevsky AK, Shenyavsky II, Nikolchenko AYU. [Cord blood and its components: biological features, clinical application, storage at cryobanks]. Kharkiv: Rider; 2017. 344 p. Russian.
12. Jang TH, Park SC, Yang JH, et al. Cryopreservation and its clinical applications. Integr Med Res [Internet]. 2017 [cited 2018 Aug 18]; 6(1): 12–8. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S221342201630155X?via%3Dihub>
13. Kozinets GI, Makarova VA. [Study of the blood system in clinical practice]. Moscow: Triada; 1998. 480 p. Russian.
14. Mayadas TN, Cullere X, Lowell CA. The multifaceted functions of neutrophils. Annu Rev Pathol [Internet]. 2014 [cited 2018 Aug 18]; 9: 181–218. Available from: <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-pathol-020712-164023>
15. Moiseyeva NN. [The influence of a low molecular fraction (less than 5 kD) from cord blood on regeneration processes in burn wounds in rats]. World of Medicine and Biology. 2009; (3): 117–20. Russian.
16. Obermaier-Kusser B, Mühlbacher C, Mushack J, et al. Further evidence for a two-step model of glucose-transport regulation. Inositol phosphate-oligosaccharides regulate glucose-carrier activity. Biochem J. 1989; 261(3): 699–705.
17. Osetskiy AI, Grisichenko VI, Snurnikov AS, et al. Cryosublimation fractionating of biological material. Problems of Cryobiology. 2006; 16 (2): 230–40.
18. Rozanova OE, Serova LD, Shabalin VN. [The influence of cytotoxic and hormonal drugs on the phagocytic activity of neutrophils in patients with leukemia]. Gematologiya i Transfuziologiya. 1989; 34(4): 15–20. Russian.



- maceutics [Internet]. 2018; 10(3): E131 [Cited 18.08.2018]. Available from: <https://www.mdpi.com/1999-4923/10/3/131/htm>
17. Gulevsky AK, Moiseyeva NN, Gorina OL. Influence of low-molecular (below 5 kDa) fraction from cord blood and actovegin on phagocytic activity of frozen-thawed neutrophils. *CryoLetters*. 2011; 32(2): 131–40.
 18. Gulevsky AK, Moiseyeva NN, Gorina OL, et al. The influence of low-molecular fraction from cord blood (below 5 kDa) on functional and biochemical parameters of cells *in vitro*. *Ukr Biochem J*. 2014; 86(6): 167–74.
 19. Jang TH, Park SC, Yang JH, et al. Cryopreservation and its clinical applications. *Integr Med Res* [Internet]. 2017; 6(1): 12–8 [Cited 18.08.2018]. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S221342201630155X?via%3Dihub>
 20. Mayadas TN, Cullere X, Lowell CA. The multifaceted functions of neutrophils. *Annu Rev Pathol* [Internet]. 2014; (9): 181–218 [Cited 18.08.2018]. Available from: <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-pathol-020712-164023>
 21. Obermaier-Kusser B, Mühlbacher C, Mushack J, et al. Further evidence for a two-step model of glucose-transport regulation. Inositol phosphate-oligosaccharides regulate glucose-carrier activity. *Biochem J*. 1989; 261(3): 699–705.
 19. Rumyantseva SA. [Actovegin. New aspects of clinical application]. Moscow; 280 p. Russian.
 20. Svedentsov EP, Tumanova TV, Khudyakov AN, et al. [Cryopreservation of functionally active blood nuclear cell membranes at –80°C]. *Biochemistry (Moscow) Supplement: Membrane and Cell Biology*. 2008; 2(1): 19–25. Russian.
 21. Yelsky VN, Strelchenko Yul, Zyablitzev SV. [Changes in phagocytic immunity in rats with dosed burn injury and subsequent exposure to polarized light]. *Travma*. 2012; 13(4): 70–4. Ukrainian.