

УДК 615.361.12.014.41

Л.А. Рогоза*, М.О. Чиж, С.Є. Гальченко, Б.П. Сандомирський

Вплив екстрактів кріоконсервованих фрагментів серця на організм щурів

UDC 615.361.12.014.41

L.A. Rohoza*, M.O. Chizh, S.Ye. Galchenko, B.P. Sandomirsky

Effect of Extracts of Frozen-Thawed Heart Fragments on Rats

Реферат. В роботі вивчено вплив екстрактів кріоконсервованих фрагментів серця свиней та новонароджених поросят на організм в цілому та серце молодих і статевозрілих щурів. Встановлено, що введення екстрактів протягом 28 діб призводить до збільшення щільності ядер в м'язі серця у молодих тварин, на відміну від статевозрілих, але не впливає на швидкість зміни маси тварин та їх серцець. Показано, що екстракти не впливають на морфологічну картину крові та електрофізіологічні показники роботи серця тварин.

Ключові слова: екстракти, пептиди, серце, організм, свині, поросята, щури.

Реферат. В работе изучено влияние экстрактов креноксервированных фрагментов сердца свиней и новорожденных поросят на организм в целом и сердце молодых и половозрелых крыс. Установлено, что введение экстрактов в течение 28 суток приводит к повышению плотности ядер в мышце сердца молодых животных, в отличие от половозрелых, но не влияет на скорость изменения массы животных и их сердец. Показано, что экстракты не влияют на морфологическую картину крови и электрофизиологические показатели работы сердца.

Ключевые слова: экстракты, пептиды, сердце, организм, свиньи, поросята, крысы.

Abstract. The investigation was performed to reveal the influence of the extracts of frozen-thawed heart fragments of pigs and newborn piglets administered to young and aged rats on an organism in general and heart in particular. Administration of the extracts to young animals during 28 days was shown to increase the number of nuclei in the heart muscle unlike the mature rats, but did not affect the rate of changes in the weight of animals and their hearts. No effect of extracts on blood morphology and heart electrophysiological parameters was found.

Key words: extracts, peptides, heart, organism, pigs, piglets, rats.

Вивчення механізмів фізіологічної та репаративної регенерації, а також пошук методів їх нормалізації залишаються актуальними. На даний час досліджуються можливості застосування з цією метою різноманітних фізичних і біологічних чинників [3, 7, 11, 21]. На наш погляд, найбільш перспективне використання тканинспецифічних пептидних комплексів, одержаних з відповідних органів тварин, оскільки вони містять спектр регуляторних пептидів, що регулюють проліферативну активність усіх клітин, з яких складається орган [9, 19].

Викладене вище в повній мірі стосується проблеми нормалізації процесу регенерації серця при інфаркті міокарда та постінфарктному рубцюванні тканини із застосуванням тканинспецифічних пептидів.

Нами було показано, що використання кріобіологічних технологій дозволяє отримати екстракти

Investigation of the mechanisms underlying physiological and reparative regeneration as well as search for the methods of their normalization remain actual. Nowadays, the possibilities to apply for this purposes various physical and biological factors are of interest of the investigators [3, 7, 11, 21]. To our opinion, the most perspective approach is an application of tissue-specific peptide complexes, derived from appropriate organs of animals, whereas they contain the spectrum of regulatory peptides, regulating proliferative activity of all the cells, constituting the organ [9,19].

The stated above fully concerns the issue of normalization of heart regeneration process after myocardial infarction and postinfarction sclerostenosis when the tissue specific peptides could find their application.

We have shown previously that the application of cryobiological technologies enabled to obtain the extracts of porcine and piglet organ fragments possessing

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

*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:
вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61015;
тел.: (+38 057) 372-74-35, факс: (+38 057) 373-30-84,
електронна пошта: liliyarogoza@mail.ru

Надійшла 9.10.2012
Прийнята до друку 30.01.2013

Проблемы кробиологии и кримицины. – 2013. – Т. 23, №1. – С. 91–98.
© 2013, Институт проблем кробиологии и кримицины НАН Украины

Department of Experimental Cryomedicine, 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 7435, fax: +380 57 373 3084,
e-mail: liliyarogoza@mail.ru

Received October, 9, 2012
Accepted January, 30, 2013

Problems of Cryobiology and Cryomedicine. – 2013. – Vol. 23, Nr. 1. – P. 91–98.
© 2013 Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

фрагментів органів свиней і поросят з високою біологічною активністю пептидів [1]. Показана залежність від віку тварин молекулярно-масового розподілу пептидів в таких екстрактах [2]. Тому доцільно вивчити біологічну активність екстрактів серця в залежності від віку тварин.

Мета роботи – дослідити вплив екстрактів кріоконсервованих фрагментів серця статевозрілих свиней (ЕСцС) та новонароджених поросят (ЕСцП) на організм і серце шурів різного віку.

Матеріали та методи

Експерименти проводили відповідно до «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», схвалених III Національним конгресом з біоетики (Київ, 2007) і погоджених з положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986).

Серця свиней та поросят подрібнювали на фрагменти масою 2–5 мг і тричі відмивали фізіологічним розчином (рН 7,4). До фрагментів органів по краплях додавали в співвідношенні 1:1 розчин кріопротектора ПЕО-1500 з концентрацією 20%, ретельно і обережно перемішуючи суміш, яку розфасовували в поліетиленові ампули об'ємом 20 мл та заморожували зі швидкістю охолодження 1 град/хв. Фрагменти заморожували за допомогою програмного заморозувача УОП-6 (СКТБ з ДВ ІПКіК НАН України) до температури -70°C з наступним перенесенням у рідкий азот. Матеріал відігрівали на водяній бані з температурою $37\text{...}40^{\circ}\text{C}$. Від кріопротектора фрагменти відмивали фізіологічним розчином. У цьому ж розчині фрагменти інкубували протягом 60 хв. Супернатант прогрівали на водяній бані 15 хв та фільтрували через паперовий фільтр [13].

Концентрацію пептидів в екстрактах визначали спектрофотометричним методом при довжині хвилі 280 нм. Для встановлення впливу екстрактів на здорових тварин в експерименті використовували шурів віком 1 (молоді) і 4 (статевозрілі) місяці. Екстракти з концентрацією пептидів 100 мкг/мл вводили в черевну порожнину шурів 1 раз на добу впродовж усього експерименту. Доза пептидів становила 50 мкг/на 100 г маси тварини.

Аналіз лейкоцитарної формули проводили на мазках, забарвлених азур II-еозином за Романовським-Гімза, підраховуючи по 500 клітин у світловому мікроскопі (ЛМО, Росія). Кров для досліджень брали з хвостової вени тварин.

Електрокардіограми (ЕКГ) тварин реєстрували на апаратно-програмному комплексі «Полі-Спектр» (Нейрософт, Росія). Результати ЕКГ використовували для визначення частоти серцевих скорочень

high biological activity manifested by peptides [1]. We also have shown how molecular and mass distribution of peptides in these extracts depended on animal age [2]. Therefore it is expedient to study the biological activity of heart extracts depending on animals' age.

The research aim was to study the effect of extracts of frozen-thawed heart fragments procured from mature pigs (PHEs) and newborn piglets (PIHEs) on organism and heart of rats of different ages.

Materials and methods

The experiments were performed according to the General Principles of Experiments in Animals, approved by the 3rd National Congress in Bioethics (Kiev, 2007) and agreed to the statements of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986).

Porcine and piglet hearts were cut into 2–5 mg fragments and thrice washed with physiological solution (pH 7.4). Cryoprotectant PEO-1500 of 20% in 1:1 ratio was dropwise added to organ fragments and carefully mixed, then the fragments were packed into 20 ml polyethylene tubes and frozen with the cooling rate of 1 deg/min. The fragments were frozen in a programmable freezer UOP-6 (Special Designing and Technical Bureau with Experimental Unit of the IPC&C) down to -70°C with the following plunging into liquid nitrogen. The specimens were thawed in water bath at $37\text{...}40^{\circ}\text{C}$. The fragments were washed free of cryoprotectant with physiological solution. Thereafter the fragments were incubated for 1 hr in the same solution. Supernatant was warmed in water bath for 15 min and filtered through the paper filter [13].

Concentration of peptides in the extracts was assessed spectrophotometrically at 280 nm. To establish the effect of the extracts on healthy animals experimentally, we have used 1-month-old (young) and 4-month-old (mature) rats. The extracts with peptide concentration of 100 $\mu\text{g/ml}$ were administrated into abdominal cavity of rats once per a day during the experiment. Peptide dose was 50 μg per 100 g of animal mass.

Leukogram was analyzed in the smears, stained with azur II-eosine according to Romanovsky-Gimza, 500 cells was calculated in each preparation in light microscope (LOMO, Russia). Blood for investigations was from tail vein of the animals.

Electrocardiograms (ECG) of the animals were recorded with Poly-Spectrum complex (Neurosoft, Russia). ECG data were used to determine heart rate (HR) per minute and indices of cardiac rhythm: VLF, LF, HF, the spectral intensity in the range of extremely low (0.0033–0.04 Hz), low (0.04–0.15 Hz) and high frequency (0.15–0.40 Hz), correspondingly, as well as



(ЧСС) в хвилину і показників серцевого ритму: VLF, LF, HF – потужність спектра в діапазоні дуже низьких (0,0033–0,04 Гц), низьких (0,04–0,15 Гц) та високих частот (0,15–0,40 Гц) відповідно і SDNN – стандартне відхилення (SD) нормальних RR-інтервалів.

Тварин виводили з експерименту шляхом декапітації. Серця зважували, поміщали в 10%-й розчин нейтрального формаліну і виготовляли парафінові блоки за стандартною методикою для проведення морфологічних досліджень. Мікропрепарати забарвлювали гематоксилином і еозином та досліджували на мікроскопі Meiji-Techno (Японія). Для обробки зображень використовували програму AxioVision Rel.4.8. Під час морфометричного аналізу підраховували кількість ядерних структур на площі тканини 1 мм².

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою непараметричного методу MANOVA, використовуючи програму SPSS Statistics 17.0.

Результати та обговорення

Уведення екстрактів щурів протягом 28 днів не викликало яких-небудь змін у загальному стані і поведінці тварин: вони залишалися активними, корм з'їдали повністю, пили за потребою, нормально реагували на дотик. При спостереженні за тваринами не відмічено змін в розмірів зіниць, порушень тону м'язів, положенні хвоста і координації рухів. Введення екстрактів також не впливало на частоту і глибину дихання, фізіологічні відправлення, швидкість зміни маси тварин та їх сердець у порівнянні з нормою (табл. 1).

Після введення екстрактів у тварин не змінювалися концентрація лейкоцитів та морфологічний склад крові (табл. 2 і 3). Отже, пептиди, які входять до складу екстрактів, не викликають імунної відповіді організму на чужорідний матеріал.

Комплекси тканиноспецифічних пептидів, які виявляють біологічну активність, обумовлену наявністю в них регуляторних пептидів (РП), виділені з багатьох органів. Ефективність їх впливу максимальна відносно того органа, з якого вони виділені [8]. Для реалізації ефектів таких комплексів та індивідуальних РП необхідною умовою є наявність специфічних рецепторів на поверхні клітин-мішеней [15, 20, 22, 23]. Наприклад, клітини тільки в фазі G1 мають відповідні рецептори,

and SDNN, the standard deviation (SD) of normal RR intervals.

The animals were withdrawn from the experiment by decapitation. The hearts were weighted, placed into 10% solution of neutral formalin, thereafter the paraffin blocks were produced for morphological research by standard method. Microsections were stained with haematoxylin and eosin and examined with microscope Meiji-Techno (Japan). The images were processed in AxioVision Rel. 4.8 software. Morphometric analysis involved the assessment of a number of nuclei per 1 mm² of tissue.

Statistical processing of the results was performed with MANOVA non-parametric method using SPSS Statistics 17.0 software.

Results and discussion

Introduction of the extracts to rats for 28 days did not cause any changes in general state and behavior of animals. They remained active, ate all food, drank when needed and normally responded to touch. Observation did not reveal any changes in size of pupils, disorders of muscle tonus, the position of tail and motor coordination. Introduction of the extracts did not also affect the frequency and depth of breath, physiological functions, rate of change of animal mass and their hearts if compared with the control (Tab. 1).

After introduction of the extracts to animals the concentration of leukocytes and morphological com-

Таблиця 1. Маса молодих і статевозрілих щурів (г) та їх сердець (мг) в нормі та при введенні ЕСцС або ЕСцП на відповідну добу експерименту
Table 1. Mass of young and mature rats (g) and their hearts (mg) in norm and after introducing PHEs or PIHEs to the certain experimental day

Умови експерименту Experimental groups	Тварини Animals			
	молоді non-mature		статевозрілі mature	
	Маса тварин Weight of animals	Маса сердець Weight of hearts	Маса тварин Weight of animals	Маса сердець Weight of hearts
Норма, 14-а доба Norm, day 14	62 ± 4	461 ± 32	179 ± 11	710 ± 55
Норма, 28-а доба Norm, day 28	84 ± 6	475 ± 27	205 ± 17	823 ± 68
Введення ЕСцС, 14-а доба Introduction of PHE, day 14	61 ± 4	472 ± 41	188 ± 14	721 ± 56
Введення ЕСцП, 14-а доба Introduction of PIHE, day 14	68 ± 5	450 ± 39	175 ± 13	713 ± 52
Введення ЕСцС, 28-а доба Introduction of PHE, day 28	88 ± 6	481 ± 44	207 ± 14	839 ± 69
Введення ЕСцП, 28-а доба Introduction of PIHE, day 28	82 ± 7	468 ± 38	211 ± 16	835 ± 64

Примітка: відмінності статистично недостовірні в порівнянні з нормою на відповідну добу при всіх умовах експерименту, $p > 0,05$.

Note: differences are statistically insignificant if compared with the norm to the corresponding day under all the experimental conditions, $p > 0.05$

Таблиця 2. Лейкоцитарний профіль крові молодих щурів при різних умовах експерименту**Table 2.** Leukocyte profile of blood of young rats under different experimental conditions

Умови експерименту Experimental groups	Вміст клітин, % Cell content, %				
	Нейтрофіли Neutrophils		Еозинофіли Eosinophils	Моноцити Monocytes	Лімфоцити Lymphocytes
	паличкоядерні rod	сегментоядерні segmented			
Норма Norm	0,3 ± 0,1	19,3 ± 1,6	2,1 ± 0,2	2,8 ± 0,3	75,5 ± 5,6
Введення ЕСцС, 14-а доба Introduction of PHE, day 14	0,2 ± 0,1	23,4 ± 1,9	2,6 ± 0,2	2,4 ± 0,2	71,4 ± 7,1
Введення ЕСцП, 14-а доба Introduction of PIHE, day 14	0,6 ± 0,2	20,0 ± 2,1	3,0 ± 0,3	1,7 ± 0,1	74,7 ± 6,1
Введення ЕСцС, 28-а доба Introduction of PHE, day 28	0,4 ± 0,2	22,9 ± 1,7	1,5 ± 0,2	1,8 ± 0,2	73,9 ± 6,9
Введення ЕСцП, 28-а доба Introduction of PIHE, day 28	0,3 ± 0,1	22,1 ± 2,0	1,8 ± 0,2	2,2 ± 0,2	73,6 ± 6,5

Примітка: відмінності статистично недостовірні в порівнянні з нормою на відповідну добу при всіх умовах експерименту, $p > 0,05$.

Note: Differences are statistically insignificant if compared with the norm under all the experimental conditions, $p > 0.05$.

Таблиця 3. Лейкоцитарний профіль крові статевозрілих щурів при різних умовах експерименту**Table 3.** Leukocyte profile of blood of mature rats under different experimental conditions

Умови експерименту Experimental groups	Вміст клітин, % Cell content, %				
	Нейтрофіли Neutrophils		Еозинофіли Eosinophils	Моноцити Monocytes	Лімфоцити Lymphocytes
	паличкоядерні rod	сегментоядерні segmented			
Норма Norm	0,2 ± 0,1	13,3 ± 1,5	3,1 ± 0,3	3,2 ± 0,2	80,2 ± 8,1
Введення ЕСцС, 14-а доба Introduction of PHE, day 14	0,2 ± 0,1	10,0 ± 1,8	2,4 ± 0,3	3,5 ± 0,2	83,9 ± 8,2
Введення ЕСцП, 14-а доба Introduction of PIHE, day 14	0,3 ± 0,2	15,6 ± 1,9	2,2 ± 0,2	2,5 ± 0,2	79,4 ± 7,3
Введення ЕСцС, 28-а доба Introduction of PHE, day 28	0,4 ± 0,1	16,3 ± 1,7	3,0 ± 0,3	2,8 ± 0,3	77,5 ± 6,4
Введення ЕСцП, 28-а доба Introduction of PIHE, day 28	0,5 ± 0,2	16,8 ± 1,9	2,0 ± 0,2	2,8 ± 0,2	77,9 ± 7,2

Примітка: відмінності статистично недостовірні в порівнянні з нормою на відповідну добу при всіх умовах експерименту, $p > 0,05$.

Note: Differences are statistically insignificant if compared with the norm under all the experimental conditions, $p > 0.05$.

впливаючи на які РП можуть запустити цикл проліферації. Якщо такий сигнал не надійде протягом відповідного часу, клітини повертаються до фази G0 [17]. Слід мати на увазі, що тригерна реакція, яка виникла, може залучити в цей процес відповідну кількість вторинних, а ті, в свою чергу, – третинних посередників. В результаті можливе підсилення сигналу на кілька порядків [5], і саме з цим пов'язані біологічні ефекти речовин, які вводяться в організм у надмалих дозах [16, 18]. Отже, пептиди, які регулюють проліферативну активність клітин,

position of blood (Table 2 and 3) did not change. However, the peptides comprising the extracts, do not cause immune response of organism against foreign biologicals.

Tissue-specific peptide complexes with biological activity stipulated by the presence of regulatory peptides (RPs) were isolated from many organs. The efficiency of their effect is maximal towards the organ of their origin [8]. To implement the effects of these complexes and individual RPs the presence of specific receptors on the surface of target cells is necessary



Таблиця 4. Кількість ядер клітин на 1 мм² зрізу тканини серця при різних умовах експерименту

Table 4. Number of cell nuclei per 1 mm² of heart tissue section under different experimental conditions

Умови експерименту Experimental groups	Тварини Animals	
	молоді non-mature	статевозрілі mature
Норма, 14-а доба Norm, day 14	7785 ± 286	7796 ± 278
Норма, 28-а доба Norm, day 28	7710 ± 235	7531 ± 308
Введення ЕСцС, 14-а доба Introduction of PHE, day 14	7544 ± 301	6237 ± 217
Введення ЕСцП, 14-а доба Introduction of PIHE, day 14	8570 ± 279	8122 ± 331
Введення ЕСцС, 28-а доба Introduction of PHE, day 28	9175 ± 217*	6926 ± 342
Введення ЕСцП, 28-а доба Introduction of PIHE, day 28	9283 ± 239*	7388 ± 290

Примітка: * – відмінності статистично достовірні в порівнянні з нормою на відповідну добу експерименту, $p < 0,05$.

Note: * – differences are statistically significant if compared with the norm to the certain day of the experiment, $p < 0.05$.

можуть впливати тільки на клітини, які готові ввійти в цикл проліферації.

В принципі, природні і синтетичні поліпептиди здатні індукувати імунну відповідь. Така властивість з'являється у поліпептидів, в утворенні яких беруть участь дві і більше амінокислоти різної будови [4]. Безсумнівно, існує зв'язок між молекулярною масою біополімеру і його антигенною активністю. Вираженість антигенних властивостей пептидів також обумовлена тим, наскільки віддалений в еволюційному відношенні донор, від якого отримано пептид, і реципієнт, якому цей пептид вводять.

При визначенні щільності ядер клітин на зрізах тканини серця статевозрілих щурів статистично значимих відмінностей цього показника у тварин, яким вводили пептидні комплекси, в порівнянні з нормою не було зафіксовано ні на 14-ту, ні на 28-у добу експерименту (табл. 4). При введенні молодим щурам ЕСцС або ЕСцП на 14-ту добу відмінності в щільності ядер клітин в порівнянні з нормою також були статистично недостовірні ($p > 0,05$). Але на 28-у добу цей показник у тварин, яким вводили ЕСцС або ЕСцП, перевищував норму на 19 та 20% відповідно, а відмінності між показниками у дослідних тварин були статистично достовірні ($p < 0,05$).

Результати підрахунку кількості одно-, дво- та багатоядерних клітин м'яза серця свідчать про зменшення відносної кількості одноядерних клітин,

[15, 20, 22, 23]. For example, only in G1 phase the cells have appropriate receptors, affecting which RP can initiate a proliferation cycle. If this signal would not come during appropriate time the cells return back to G0 phase [17]. It should be taken into account that the appeared trigger reaction can involve into this process an appropriate number of secondary messengers and those in their turn can recruit tertiary messengers. This could result in manyfold amplification of the signal [5], and namely this is the basis of biological effects resulted from introduction of substances into an organism even in in neglective amounts [16, 18]. Thus, the peptides regulating proliferative activity of cells may affect only the cells being ready to enter the proliferation cycle.

Generally, both natural and synthetic polypeptides are capable of inducing immune response. This peculiarity appears in polypeptides which formation involved two or more aminoacids of different structure [4]. There is certainly a relationship between molecular weight of biopolymer and its antigen activity. Expression of the peptides antigen properties is also preconditioned by the evolutionary proximity of donor of the peptide and the recipient, obtaining this peptide.

Assessment of density of cell nuclei in tissue section of mature rat heart revealed no statistically significant differences between the norm and the animals which obtained the peptide complexes, either to the 14th day or the 28th day of the experiment (Table 4). Introduction of PHEs or PIHEs to young rats did not resulted in significant differences of cell nuclei density to the 14th day if compared with the norm ($p > 0.05$). However, to the 28th day this index exceeded the norm by 19 and 20% in the animals injected with PHEs and PIHEs respectively, and differences between the indices in experimental animals were statistically significant ($p < 0.05$).

Calculation of mono-, bi- or multi-nuclear cells of heart muscle testified to the reduction of relative number of mononuclear cells, as well as 1.4 fold increase of number of bi- and multinuclear cells (Table 5).

According to recent reports [6, 14], mononuclear cardiomyocytes preserve capability to enter cell cycle, finishing by karyo- and cytokinesis. Karyokinesis without cytokinesis results in decrease of percentage of mononuclear cardiomyocytes and, accordingly, in increase of binuclear cell number. Support of mononuclear cardiomyocytes pool (replicative pool) is due to karyokinesis and completed cytokinesis. Quantitatively the binuclear cardiomyocytes prevail in rat myocardium and are not only the basic structural and functional elements of myocardium, but also their main compensatory-adaptive stock (hypertrophied when increasing functional load).

The analysis of heart rate variability is increasingly widespread as the method, enabling to quantitatively



та збільшення кількості двоядерних і багатоядерних клітин в 1,4 рази (табл. 5).

За даними досліджень [6, 14] одноядерні кардіоміоцити зберігають здатність вступати в клітинний цикл, що завершується каріо- і цитокінезом. Каріокінез без цитокінезу призводить до зниження процентного вмісту одноядерних кардіоміоцитів і відповідно до збільшення кількості двоядерних. Підтримка пулу одноядерних кардіоміоцитів (реплікативного пулу) відбувається за рахунок каріокінезу і завершеного цитокінезу. Кількісно двоядерні кардіоміоцити переважають в міокарді щурів і є не тільки основними структурно-функціональними елементами міокарда, але й головним компенсаторно-присосовним його резервом (гіпертрофуються при посиленні функціонального навантаження).

Аналіз варіабельності серцевого ритму набуває все більш широкого поширення як метод, що дозволяє кількісно охарактеризувати активність різних відділів вегетативної нервової системи через їх вплив на функцію синусного вузла серця, що проявляється в коливаннях тривалості RR-інтервалів серцевих скорочень [12].

Як видно з табл. 6, ні один з наведених показників серцевого ритму та його варіабельності у тварин, яким вводили екстракти, на 28 добу експерименту статистично достовірно ($p < 0,05$) не відрізнялися від норми. Отже, введення екстрактів не впливає на активність та співвідношення регуляторних систем, які контролюють електрофізіологічну активність серця.

Таблиця 5. Відносна кількість клітин (%) в серці молодих щурів на 28-у добу експерименту

Table 5. Relative number of cells (%) in heart of young rats to the 28th day of the experiment

Умови експерименту Experimental groups	Клітини Cells		
	Одноядерні Mononuclear	Двоядерні Binuclear	Багатоядерні (3 і більше) Polynuclear (3 and more)
Норма Norm	30,3 ± 0,7	67,5 ± 4,0	2,2 ± 0,2
Введення ЕСЦС Introduction of PHE	17,8 ± 1,3*	79,1 ± 5,4	3,1 ± 0,2*
Введення ЕСЦП Introduction of PIHE	15,4 ± 1,2*	81,4 ± 5,2*	3,2 ± 0,3*

Примітка: * – відмінності статистично достовірні в порівнянні з нормою, $p < 0,05$.

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

characterise the activity of different parts of vegetative nervous system via their effect on function of sinus node of heart, manifesting in fluctuations of RR-intervals duration of heart beats [12].

Table 6 shows that none of the studied indices of heart rate and its variability in the animals, which were introduced with the extracts, had significant differences if compared to the norm to the 28th day of experiment ($p < 0.05$). Thus, the introduction of extracts does not

Таблиця 6. Параметри ЕКГ у щурів при різних умовах експерименту на 28-у добу

Table 6. Parameters of ECG in rats under different experimental conditions to the 28th day

Параметри ЕКГ ECG parameters	Тварини Animals					
	молоді young			статевозрілі mature		
	Норма Norm	Введення ЕСЦС Introduction of PHE	Введення ЕСЦП Introduction of PIHE	Норма Norm	Введення ЕСЦС Introduction of PHE	Введення ЕСЦП Introduction of PIHE
ЧСС, скорочення/хв Cardiac rate, beats/min	497 ± 29	529 ± 31	490 ± 24	479 ± 25	460 ± 19	485 ± 26
RR _{cp} , мс RR _{med} , ms	121 ± 8	119 ± 11	130 ± 7	125 ± 6	139 ± 12	130 ± 9
SDNN, мс SDNN, ms	9,1 ± 1,8	11,3 ± 1,5	10,7 ± 3,2	11,1 ± 0,9	12,4 ± 2,9	12,2 ± 1,6
VLF, мс ² VLF, ms ²	125,0 ± 22,1	120,0 ± 31,9	141,6 ± 33,7	133,4 ± 26,0	149,0 ± 20,0	122,7 ± 23,6
LF, мс ² LF, ms ²	29,1 ± 3,5	34,4 ± 3,0	33,9 ± 2,7	25,7 ± 3,7	27,0 ± 3,1	34,5 ± 3,4
HF, мс ² HF, ms ²	19,3 ± 2,8	15,1 ± 1,2	17,6 ± 1,9	16,4 ± 2,4	19,1 ± 1,7	15,9 ± 2,0

Примітка: відмінності статистично недостовірні в порівнянні з нормою на відповідну добу при всіх умовах експерименту, $p > 0,05$.

Note: * – differences are statistically insignificant if compared with the norm under all the experimental conditions, $p > 0.05$.



У спектрі, одержаному при аналізі коротких записів (від 2 до 5 хв), розрізняють три головні спектральні компоненти частот: дуже низьких (VLF), низьких (LF) і високих (HF). Значення потужності і центральна частота кожного компонента залежать від змін автономних модуляцій серцевого циклу [12].

Гуморальна ланка регуляції роботи серця – це біологічно активні речовини, які синтезуються спеціалізованими органами, тканинами і клітинами та поставляються до міокарда рідкими середовищами, включаючи кровообіг і міжклітинну ультрациркуляцію. Крім того, деякі активні речовини синтезуються безпосередньо в тканині серця, зокрема це натрійуретичний гормон передсердя, компоненти ренінаангіотензальдостеронової системи, цитокини та ін. Вони беруть участь в регуляції не тільки роботи серця, але й всієї системи кровообігу [10].

Окрім регуляторного впливу гормонів і пептидів, значну роль в регуляції роботи серця відіграють механо- і хеморецептори, а також медіатори, які виділяються із закінчень симпатичних і парасимпатичних нервів. Кожний з рівнів управління визначає характерні періоди коливань регульованих ним функцій. Чим вище рівень, тим довше період коливальних процесів, що обумовлено більшою кількістю його елементів [12].

Висновки

Введення молодим щурам ЕСцС або ЕСцП призводить до збільшення щільності ядер в м'язі серця, на відміну від статевозрілих, але не впливає на швидкість зміни маси тварин та їх сердець, морфологічну картину крові та електрофізіологічні показники роботи серця: частоту серцевих скорочень, варіабельність серцевого ритму та співвідношення гуморальної, симпатичної та парасимпатичної ланок регулювання роботи серця.

Література

1. Гальченко С.Є. Екстракти кріоконсервованих фрагментів ксеноорганів: одержання та біологічна дія // Проблеми кріобіології. – 2005. – Т. 15, №3. – С. 403–406.
2. Гальченко С.Є. Тканинна та вікова специфічність водно-сольових екстрактів кріоконсервованих фрагментів ксеноорганів // Проблеми кріобіології. – 2005. – Т. 15, №2. – С. 153–158.
3. Гольцев А.Н., Бабенко Н.Н., Пятікоп В.А. Изучение функционального потенциала эмбриональных нервных клеток крыс до и после кріоконсервирования (в ранние сроки культивирования) // Укр. мед. альманах. – 2007. – Т.10, №1. – С.48–50.
4. Ивашкин В.Т. Основные понятия и положения фундаментальной иммунологии // Рос. журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2008. – Т. 18, № 4. – С. 4–13.
5. Карелин А.А., Глоба А.Г., Демидова В.С. АТФ как передатчик и усилитель сигналов ростовых факторов и цитокинов // Успехи биологической химии. – 2000. – Т. 40. – С. 267–308.

affect the activity and correlation of regulatory systems, controlling the electrophysiological activity of heart.

In the spectrum, obtained from analysis of short records (from 2 to 5 min), three main spectral components of frequencies could be recognized such as: very low (VLF), low (LF) and high frequencies (HF). Intensities and central frequency of each component depend on the changes of autonomous modulations of cardiac cycle [12].

Humoral link of cardiac control is represented by biologically active substances, synthesized by specialized organs, tissues and cells, and supplied to myocardium through liquid media, namely blood circulation and intercellular ultracirculation. Moreover, some active substances are synthesized directly in heart tissues, particularly, these are natriuretic hormone of atrium, components of renin-angiotensin-aldosterone system, cytokines *etc.* They take part both in cardiac function, and in the whole blood circulation [10].

Except regulatory effect of hormones and peptides, of importance for cardiac functional control are mechano- and chemoreceptors, as well as mediators, release from sympathetic and parasympathetic nerve terminals. Each of the control level determines characteristic periods of fluctuations in controlled functions. The higher level, the longer period of fluctuation processes, which is stipulated by a high number of its elements [12].

Conclusions

Introduction of PHEs or PIHEs to young rats results in an increase of density of nuclei in heart muscle unlike mature animals, and does not affect the rate of changes in mass of the animals and their hearts, morphological pattern of blood and electrophysiological indices of cardiac function such as: frequency of heart beats, variability of heart rhythm and ratio of humoral, sympathetic and parasympathetic links of cardiac function control.

References

1. Galchenko S.E. Extracts of cryopreserved fragments of xenoorgans: derivation and biological action // Problems of Cryobiology. – 2005. – Vol. 15, N3. – P. 403–406.
2. Galchenko S.E. Tissue and age specificity of aqueous-saline extracts of cryopreserved fragments of xenoorgans // Problems of Cryobiology. – 2005. – Vol. 15, N2. – P. 153–158.
3. Goltsev A.N., Babenko N.N., Pyatikop V.A. Investigation of functional potential of embryonic nerve cells of rats prior to and after cryopreservation (at yearly terms of culturing) // Ukr. Med. Almanakh. – 2007. – Vol. 10, N1. – P. 48–50.
4. Ivashkin V.T. Basic definitions and statements of fundamental immunology // Ros. Zhurnal Gastroenterologii, Hepatologii, Koloproktologii. – 2008. – Vol. 18, N4. – P. 4–13.
5. Karelin A.A., Globa A.G., Demidova V.S. ATP as transmitter and signal amplifier of growth factors and cytokines // Uspekhi biologicheskoy khimii. – 2000. – Vol. 40. – P. 267–308.



6. Непомнящих Л.М., Лушникова Е.Л., Клиникова М.Г., Молодых О.П. Влияние препаратов с противоопухолевой активностью – доxorубинина и циклофосфана на структурную реорганизацию миокарда крыс и численность кардиомиоцитов // Сибир. онколог. журнал. – 2011. – Т. 46, №4. – С. 30–35.
7. Непомнящих Л.М., Лушникова Е.Л., Ларионов П.М., Шурьгин М.Г. Регенерация миокарда: Пролиферативный потенциал кардиомиоцитов и индукция кардиомиогенеза при альтернативной и пластической недостаточности сердца // Вестник РАМН. – 2010. – №5. – С. 3–11.
8. Ролик И.С. Основы клинической фармакологии органо-препаратов. Руководство. – М.: РегБиоМед, 2004. – 336 с.
9. Слесарев С.М. Роль пептидов эпифиза в регуляции циркадианного ритма пролиферации эпителия пищевода // Вестник РГМУ. – 2009. – №2. – С. 62–64.
10. Сытый В.П., Мрочек А.Г. Гормональная функция сердца в норме и при патологических состояниях // Мед. новости. – 1995. – №4. – С. 10–21.
11. Чуян Е.Н., Никифоров И.Р. Вариабельность сердечного ритма после физической нагрузки в условиях превентивного воздействия низкоинтенсивного электромагнитного излучения крайне высокой частоты // Ученые записки Таврического нац. ун-та им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, химия». – 2011. – Т. 24, №2. – С. 321–331.
12. Яблучанский Н.И., Кантор Б.Я., Мартыненко А.В., Питык А.И. Вариабельность сердечного ритма в современной клинике. – Харьков: Основа, 2001. – 189 с.
13. Пат. 64381 А Україна, МПК7 А61К35/12. Спосіб отримання екстрактів ксеногенних органів / Гальченко С.Є., Шкодовська Н.Ю., Сандомирський Б.П., Грищенко В.І. №2003054649; заявлено 22.05.2003; опубл. 16.02.2004. Бюл. №2.
14. Ang K.-L., Shenje L.T., Reuter S. et al. Limitations of conventional approaches to identify myocyte nuclei in histologic sections of the heart // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* – 2010. – Vol. 298, №6. – P. 1603–1609.
15. Cherezov V., Rosenbaum D.M., Hanson M.A. et al. High-resolution crystal structure of an engineered human β 2-adrenergic G protein-coupled receptor // *Science*. – 2007. – Vol. 318, №5817. – P. 1258–1265.
16. Kang H.-K., Michaels M.A., Berner B.R., Datta S.K. Very low-dose tolerance with nucleosomal peptides controls lupus and induces potent regulatory T cell subsets // *J. Immunol.* – 2005. – Vol. 174, №6. – P. 3247–3255.
17. Li G., Wang R., Gao J. et al. RNA interference-mediated silencing of iASPP induces cell proliferation inhibition and G0/G1 cell cycle arrest in U251 human glioblastoma cells // *Molecular and cellular biochemistry*. – 2011. – Vol. 350, №1–2. – P. 193–200.
18. Longhi M.S., Hussain M.J., Bogdanos D.P. et al. Cytochrome P450IID6 – specific effector CD8 T-cell immune responses mirror disease activity in autoimmune hepatitis type 2 // *Hepatology*. – 2007. – Vol. 46, №2. – P. 472–484.
19. Pardee A.B. Multiple molecular levels of cell cycle regulation // *J. Cell. Biochem.* – 1994. – Vol. 54, №4. – P. 375–378.
20. Rosenbaum D.M., Cherezov V., Hanson M.A. et al. GPCR engineering yields high-resolution structural insights into β 2-adrenergic receptor function // *Science*. – 2007. – Vol. 318, №5817. – P. 1266–1273.
21. de Silva R., Raval A.N., Hadi M. et al. Intracoronary infusion of autologous mononuclear cells from bone marrow or granulocyte colony-stimulating factor-mobilized apheresis product may not improve remodeling, contractile function, perfusion, or infarct size in a swine model of large myocardial infarction // *Eur. Heart J.* – 2008. – Vol. 29, №14. – P. 1772–1782.
22. Weaver C.T., Harrington L.E., Morgan R.P. et al. Th17: an effector CD4 T cells lineage with regulatory T cells ties // *Immunity*. – 2006. – Vol. 24, №6. – P. 677–688.
23. Zhang H., Yee D. Is the type I insulin-like growth factor receptor a therapeutic target in endometrial cancer? // *Clin. Cancer Res.* – 2006. – Vol. 12, №21. – P. 6323–6325.
6. Nepomnyaschykh L.M., Lushnikova E.L., Klinnikova M.G., Molodykh O.P. Effect of preparations with antitumor activity – doxorubicin and cyclophosphan on structural reorganization of rat myocardium and a number of cardiomyocytes // *Sibirsky Oncologicheskyy Zhurnal*. – 2011. – Vol. 46, №4. – P. 30–35.
7. Nepomnyaschykh L.M., Lushnikova E.L., Larionov P.M., Shurygin M.G. Regeneration of myocardium: Proliferative potential of cardiomyocytes and induction of cardiomiogenesis at alternative and plastic cardiac failure // *Vestnik RAMN*. – 2010. – №5. – P. 3–11.
8. Rolik I.S. Principles of clinical pharmacology of organo-preparations. Manual. – Moscow: RegBioMed, 2004. – 336 p.
9. Slesarev S.M. Role of epiphysis peptides in regulation of circadian rhythm of proliferation of oesophagus epithelium // *Vestnik RGMU*. – 2009. – №2. – P. 62–64.
10. Syty V.P., Mrochek A.G. Hormonal function of heart at norm and at pathological states // *Med. Novosti*. – 1995. – №4. – P. 10–21.
11. Chuyan E.N., Nikiforov I.R. Heart rate variability after exercise in preventive effects of low-intensity electromagnetic radiation of extremely high frequency // *Academic Bulletin of Taurida National V.I. Vernadsky University. Series 'Biology, Chemistry'*. – 2011. – Vol. 24, №2. – P.321–331.
12. Yabluchansky N.I., Kantor B.Ya., Martynenko A.V., Pityk A.I. Heart rate variability in current clinical practice. – Kharkov: Osнова, 2001. – 189 p.
13. Patent 64381 A (Ukraine), IPC7 A61K35/12. Method of deriving extracts of xenogeneic organs / S.E. Galchenko, N.Yu. Shkodovska, B.P. Sandomirsky, V.I. Grischenko, Nr. 2003054649. Applied 22.05.2003; Publ. 16.02.2004. Bull. N2.
14. Ang K.-L., Shenje L.T., Reuter S. et al. Limitations of conventional approaches to identify myocyte nuclei in histologic sections of the hear // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* – 2010. – Vol. 298, №6. – P. 1603–1609.
15. Cherezov V., Rosenbaum D.M., Hanson M.A. et al. High-resolution crystal structure of an engineered human β 2-adrenergic G protein-coupled receptor // *Science*. – 2007. – Vol. 318, №5817. – P. 1258–1265.
16. Kang H.-K., Michaels M.A., Berner B.R., Datta S.K. Very low-dose tolerance with nucleosomal peptides controls lupus and induces potent regulatory T cell subsets // *J. Immunol.* – 2005. – Vol. 174, №6. – P. 3247–3255.
17. Li G., Wang R., Gao J. et al. RNA interference-mediated silencing of iASPP induces cell proliferation inhibition and G0/G1 cell cycle arrest in U251 human glioblastoma cells // *Molecular and cellular biochemistry*. – 2011. – Vol. 350, №1–2. – P. 193–200.
18. Longhi M.S., Hussain M.J., Bogdanos D.P. et al. Cytochrome P450IID6 – specific effector CD8 T-cell immune responses mirror disease activity in autoimmune hepatitis type 2 // *Hepatology*. – 2007. – Vol. 46, №2. – P. 472–484.
19. Pardee A.B. Multiple molecular levels of cell cycle regulation // *J. Cell. Biochem.* – 1994. – Vol. 54, №4. – P. 375–378.
20. Rosenbaum D.M., Cherezov V., Hanson M.A. et al. GPCR engineering yields high-resolution structural insights into β 2-adrenergic receptor function // *Science*. – 2007. – Vol. 318, №5817. – P. 1266–1273.
21. de Silva R., Raval A.N., Hadi M. et al. Intracoronary infusion of autologous mononuclear cells from bone marrow or granulocyte colony-stimulating factor-mobilized apheresis product may not improve remodeling, contractile function, perfusion, or infarct size in a swine model of large myocardial infarction // *Eur. Heart J.* – 2008. – Vol. 29, №14. – P. 1772–1782.
22. Weaver C.T., Harrington L.E., Morgan R.P. et al. Th17: an effector CD4 T cells lineage with regulatory T cells ties // *Immunity*. – 2006. – Vol. 24, №6. – P. 677–688.
23. Zhang H., Yee D. Is the type I insulin-like growth factor receptor a therapeutic target in endometrial cancer? // *Clin. Cancer Res.* – 2006. – Vol. 12, №21. – P. 6323–6325.

