



УДК 615.361.018.5.013.8

© 2009

А. К. Гулевский, академик НАН Украины В. И. Грищенко,
Н. Н. Моисеева, О. Л. Горина

Влияние низкомолекулярной фракции (до 5 кДа) из кордовой крови на фагоцитарную активность лейкоцитов *in vivo* и *in vitro*

*Досліджено вплив низкомолекулярної фракції кордової крові великої рогатої худоби на фагоцитарну активність лейкоцитів у дослідях *in vivo* та *in vitro* у порівнянні з онтогенетично близьким за складом препаратом актовегіном. Показано, що введення ФКК і актовегіну експериментальним щурам сприяє нормалізації зниженої після опіку ІІВ ступеня фагоцитарної активності нейтрофілів. У дослідях *in vitro* встановлено дозозалежну імуностимулювальну дію ФКК та актовегіну.*

Ранее в наших работах было показано, что препараты цельной кордовой крови и ее отдельные компоненты обладают иммуномодулирующим действием [1–4]. Однако не установлено, с какими компонентами кордовой крови связан этот феномен. Принимая во внимание данные о механизмах действия известных препаратов актовегин (“Nuscomed”, Австрия) и солкосерил (“Solco Basel AG”, Швейцария), в состав которых входят соединения до 5–10 кДа, полученные из крови молочных телят, можно предположить, что биологическая активность кордовой крови связана с низкомолекулярными компонентами, входящими в ее состав.

Цель наших исследований состояла в изучении влияния низкомолекулярной фракции кордовой крови (до 5 кДа) крупного рогатого скота и актовегина, как препарата сравнения, на фагоцитарную активность лейкоцитов в условиях *in vivo* и *in vitro*.

Материалы и методы. Низкомолекулярную фракцию до 5 кДа из дефибринированной кордовой крови, подвергнутой криодеструкции, получали с помощью ультрафильтрационного оборудования фирмы “Sartorius” (Германия).

Для снижения фагоцитарной активности лейкоцитов в опытах *in vivo* животных подвергали диатермическому ожогу ІІВ степени по методу [5], который воспроизводили на лабораторных крысах массой 160–180 г. Иммуномодулирующее действие низкомолекулярной фракции кордовой крови (ФКК) и актовегина в опытах *in vivo* оценивали по фагоцитарной активности нейтрофилов периферической крови крыс методом [6]. В опытах *in vitro* функциональную активность фагоцитов изучали в лейкоцитарной массе, полученной из

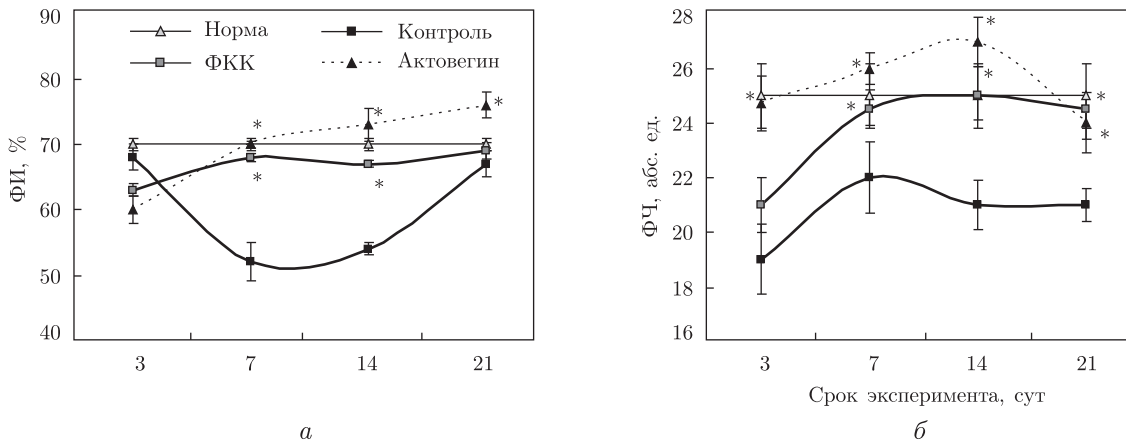


Рис. 1. Фагоцитарный индекс (а) и фагоцитарное число (б) нейтрофилов после 2 ч инкубации со стафилококком периферической крови экспериментальных крыс.

* — отличия достоверны в сравнении с контролем ($P < 0,05$)

донорской крови человека, по методу [7], в зависимости от концентрации фракции в пределах 0,17 — 3,30 мг/мл. В контрольные пробы вносили физиологический раствор. Конечное соотношение лейкоцитов и бактерий (суточная инактивированная культура *Staphylococcus aureus* штамм № 209) составляло 1 : 50. Для оценки специфичности реакции отдельно ставили пробу с добавлением колхицина (ингибитора фагоцитоза) в конечной концентрации 100 мМ [8].

Для оценки фагоцитарной активности лейкоцитов использовали следующие показатели: фагоцитарный индекс (ФИ) лейкоцитов периферической крови — процент активных лейкоцитов, т. е. соотношение фагоцитирующих клеток к их общему числу после 45 мин и 2 ч инкубации крови со стафилококком; фагоцитарное число (ФЧ) — среднее число микробов, поглощенных одной фагоцитирующей клеткой после 45 мин и 2 ч инкубации крови со стафилококком; коэффициент фагоцитарного числа (КФЧ) — показатель завершенности фагоцитоза, отношение $\text{ФЧ}_{45 \text{ мин}}/\text{ФЧ}_{2 \text{ ч}}$.

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с помощью статистического программного пакета “STATGRAPHIC plus for Windows” версии 2.1 с использованием t -критерия Стьюдента и Манна-Уитни.

Результаты исследований. Как свидетельствуют полученные данные, диатермический ожог IIIВ степени приводит к резкому снижению фагоцитарного процесса, что согласуется с данными литературы [9]. В наших экспериментах ФИ, отражающий процент клеток, вступивших в реакцию со стафилококком, в наибольшей мере снижался на 7–14-е сутки после ожога и составлял $(53,0 \pm 3,0)\%$, в норме — $(70,0 \pm 1,0)\%$ (рис. 1, а). Введение экспериментальным животным ФКК приводило к нормализации в указанные сроки этой функции фагоцитов (см. рис. 1, а). Введение препарата сравнения актовегина способствовало не только нормализации ФИ нейтрофилов, но и увеличению процента активных лейкоцитов до $(76,0 \pm 2,0)\%$ на 21-е сутки эксперимента (см. рис. 1, а).

После термокоагуляции уменьшался не только показатель ФИ, но и ФЧ лейкоцитов периферической крови, отражающее количество поглощенных микробов (см. рис. 1, б). Введение актовегина и ФКК позволяло нормализовать и эту функцию фагоцитов. При введении ФКК нормализация ФЧ наблюдалась уже на 7-е сутки после термической травмы,

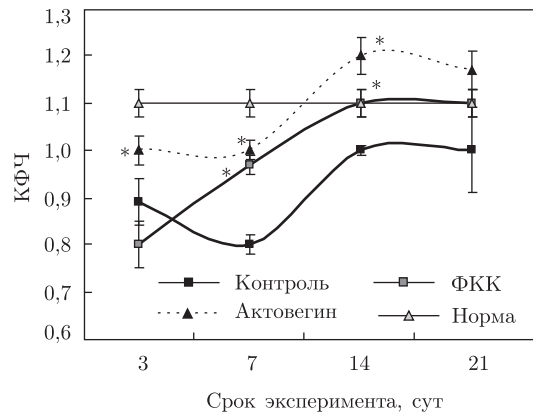


Рис. 2. Динамика коэффициента фагоцитарного числа нейтрофилов периферической крови экспериментальных крыс.

* — отличия достоверны в сравнении с контролем ($P < 0,05$)

а при использовании актовегина — уже на 3-тй сутки. В то же время в группе контрольных животных на протяжении всего эксперимента показатель ФЧ был достоверно ниже нормальных значений (см. рис. 1, б).

Как известно [7], функциональное состояние фагоцитов в наибольшей мере характеризует показатель КФЧ, отражающий способность нейтрофилов переваривать захваченные микробы. В наших экспериментах КФЧ после термокоагуляции снижался до $0,89 \pm 0,05$, в норме — $1,1 \pm 0,03$ (рис. 2). После введения ФКК уже на 7-е сутки происходило достоверное ($p < 0,05$) повышение данного показателя до $0,97 \pm 0,02$ по сравнению с контролем — $0,8 \pm 0,02$. К 14-м суткам функциональная способность по показателю КФЧ у нейтрофилов восстанавливалась в полной мере, о чем свидетельствовали значения данного показателя — $1,1 \pm 0,03$. Введение актовегина способствовало нормализации КФЧ в более ранние сроки эксперимента (на 3-тй сутки) по сравнению с ФКК (на 7-е сутки) (см. рис. 2).

В связи с тем что ФКК и актовегин могут оказывать свое иммуномодулирующее действие как на уровне организма, так и непосредственно воздействовать на клетки, принимающие участие в реакциях фагоцитоза, представлялось интересным исследовать их действие в опытах *in vitro* в диапазоне концентраций 0,17–3,3 мг/мл. Влияние ФКК и препарата сравнения актовегина на фагоцитарную активность лейкоцитов донорской крови оценивали по КФЧ, который характеризует степень завершения фагоцитоза и отражает процесс внутриклеточного лизиса бактерий. Как видно из рис. 3, максимальное значение КФЧ ($1,92 \pm 0,08$) по сравнению с контролем ($1,06 \pm 0,08$) было отмечено при концентрации ФКК в инкубационной среде 0,17 мг/мл. Препарат сравнения актовегин также стимулировал внутриклеточное переваривание фагоцитами поглощенных микроорганизмов. Однако его биологическая активность проявлялась лишь при концентрации в инкубационной среде 1,70 мг/мл (см. рис. 3). Следовательно, ФКК в опытах *in vitro* более эффективно активирует фагоцитарную активность лейкоцитов по сравнению с актовегином, что, видимо, обусловлено разным и составом этих фракций [10] и концентрацией содержащихся в ней активирующих компонентов.

Таким образом, нами в экспериментах *in vivo* и *in vitro* установлено, что низкомолекулярная фракция кордовой крови обладает сходным с актовегином иммуномодулирующим действием. В опытах *in vivo* актовегин более эффективно стимулирует фагоцитарную

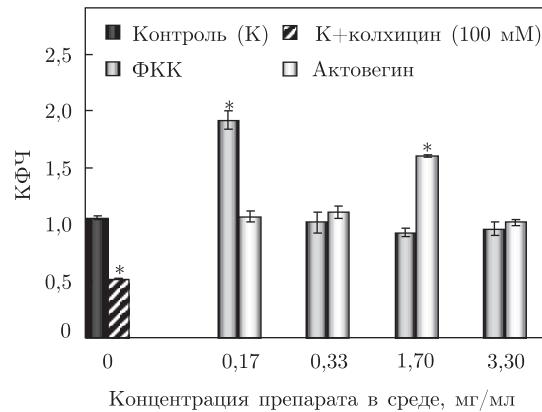


Рис. 3. Коэффициент фагоцитарного числа нейтрофилов лейкоцитарной массы, полученной из донорской крови человека, в опытах *in vitro*.

* — отличия достоверны в сравнении с контролем ($P < 0,05$)

активность, чем ФКК. Однако на клеточном уровне, как показывают данные экспериментов *in vitro*, иммуномодулирующее действие ФКК более специфично.

1. Гулевський О. К., Грищенко В. І., Нікольченко А. Ю., Моїсєєва Н. М. Властивості і перспективи використання кордової крові в клінічній практиці // Укр. журн. гематології та трансфузіології. – 2005. – № 1(5). – С. 5–14.
2. Мошко Ю. А. Криоконсервирование сыворотки кордовой крови, определение ее биологической активности и клинической эффективности в терапии хронических сальпингоофоритов: Дис. . канд. мед. наук/ Ин-т проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины. – Харьков, 2003. – 161 с.
3. Цуцаева А. О., Глушко Т. О., Лобасенко Н. П. та ін. Гемокорд – препарат комплексної терапії // Трансплантологія – 2003. – № 4. – С. 46–48.
4. Грищенко В. І., Гольцев А. Н. Трансплантация продуктов эмбриофетоплацентарного комплекса. От понимания механизма действия к повышению эффективности применения // Проблемы криобиологии. – 2002. – № 1. – С. 54–84.
5. Хакимов З. З., Наджимутдинов К. Н., Мавлянов И. Р. Фармакодинамика лекарственных веществ, метаболизирующихся в печени, при ожоговой травме у крыс // Фармакология и токсикология. – 1985. – № 2. – С. 103–106.
6. Кудрявицкий А. И. Оценка киллерной бактерицидности нейтрофилов периферической крови здоровых и больных в прямом и визуальном тесте // Лаб. дело. – 1985. – № 1. – С. 45–47.
7. Подопригора Г. И., Андреев В. Н. Современные методы изучения фагоцитарной активности лейкоцитов *in vitro* // Журн. микробиологии. – 1976. – № 1. – С. 19–25.
8. Scheef H., Stelzner A., Kunze M. Effect of colchicine and indomethacin on leukocytic phagocytosis of *Staphylococcus aureus* and *E. coli* // Zbl. Bacteriol. Mikrobiol. und Hyg. A. – 1984. – No 3(257). – P. 388–399.
9. Саркисов Д. С., Сологуб В. К., Каем Р. И., Колкер И. И. Современные проблемы ожоговой болезни // Клинич. медицина. – 1986. – 64, № 2. – С. 14–22.
10. Гулевский А. К., Абакумова Е. С., Моїсєєва 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. біохім. журн. – 2008. – 80, № 2. – С. 120–127.

Институт проблем криобиологии
и криомедицины НАН Украины, Харьков

Поступило в редакцию 23.01.2009

A. K. Gulevsky, Academician of the NAS of Ukraine **V. I. Grischenco**,
N. N. Moiseeva, **O. L. Gorina**

Influence of low-molecular fraction (less than 5 kD) of cord blood on leukocyte phagocytic activity *in vivo* and *in vitro*

The influence of a low-molecular fraction of cattle cord blood on the leukocyte phagocytic activity in vivo and in vitro is studied in comparison with that of the ontogenically close composition actovegin. It has been shown that the fraction and actovegin administrations in experimental rats promote the normalization of the neutrophil phagocytic activity reduced after a IIIB degree burn. Dose-dependent immunopotentiating actions of the cattle cord blood fraction less than 5 kD and actovegin on leukocytes in vitro have been established.