

УДК 611.018.5.013.8.08

О.К. Гулевський, І.Й. Щенявський*

Антигіпоксанта активність низькомолекулярної фракції кріогемолізату крові великої рогатої худоби на різних стадіях онтогенезу

UDC 611.018.5.013.8.08

O.K. Gulevsky, I.I. Schenyavsky*

Antihypoxant Activity of Low Molecular Weight Fraction Bovine Blood Cryohemolysate at Different Stages of Ontogenesis

Реферат: Досліджували антигіпоксанта активність низькомолекулярної (до 5 кДа) фракції, отриманої методом ультрафільтрації з кріогемолізату пуповинно-плацентарної крові корів і периферичної крові 3-місячних телят та корів віком 4–5 років. Показано, що ін'єкції фракції кордової крові корів і крові молочних телят, на відміну від низькомолекулярної фракції крові корів, значуще збільшували час виживання мишей у замкнутому об'ємі та уповільнювали накопичення малонового діальдегіду і гідроперексидів ліпідів у тканині мозку при експериментальній гіпоксії замкнутого об'єму. Більш вираженим ефектом застосування даних препаратів був після попереднього п'ятиденного курсу їх ін'єкцій. Таким чином, висока на ранніх етапах онтогенезу антигіпоксанта активність низькомолекулярної фракції крові до 5 кДа у тварин з віком знижується. Отримані результати свідчать про те, що кріогенні технології дозволяють використовувати кордову кров великої рогатої худоби як сировинне джерело для виробництва фармацевтичних препаратів антигіпоксанта дії.

Ключові слова: кріогемолізат, пуповинно-плацентарна кров, Актівегін, антигіпоксанта активність, онтогенез, стійкість до гіпоксії.

Реферат: Исследовали антигипоксанта активность низкомолекулярной (до 5 кДа) фракции, полученной методом ультрафильтрации из криогемолизата пуповинно-плацентарной крови коров, периферической крови 3-месячных телят и коров в возрасте 4–5 лет. Показано, что инъекции фракции кордовой крови коров и крови молочных телят, в отличие от низкомолекулярной фракции крови коров, значительно увеличивали время выживания мышей в замкнутом объеме и замедляли накопление малонового диальдегида и гидроперексидов липидов в ткани мозга при экспериментальной гипоксии замкнутого объема. Более выраженным эффектом применения данных препаратов был после предыдущего пятидневного курса их инъекций. Таким образом, высокая на ранних этапах онтогенеза антигипоксанта активность низкомолекулярной фракции крови до 5 кДа с возрастом животных снижается. Полученные результаты свидетельствуют о том, что криогенные технологии позволяют использовать кордовую кровь крупного рогатого скота в качестве сырьевого источника для производства фармацевтических препаратов антигипоксанта действия.

Ключевые слова: криогемолизат, пуповинно-плацентарная кровь, Актівегін, антигіпоксанта активність, онтогенез, устійність к гіпоксії.

Abstract: Antihypoxant activity of low-molecular weight (below 5 kDa) fraction, obtained by ultrafiltration from cryohemolysate of umbilical/placental bovine and peripheral blood of 3-month-old calves and 4–5-year-old cows was studied. It was shown that injections of the fraction derived from bovine cord blood and the one of 3-month-old calves unlike low molecular fraction of bovine blood significantly increased the survival time of mice in confined space and inhibited the accumulation of malon dialdehyde and lipid hydroperoxides in brain tissue at experimental confined space hypoxia. The effect after a preliminary 5-days course of injections of these drugs was the most pronounced. Thus, low molecular weight fraction below 5 kDa of blood at the early stages of ontogenesis had lower antihypoxant activity in animals with age. The obtained results testify to the fact that cryogenic technologies enable to use bovine cord blood as a raw material source for the production of pharmaceuticals with an antihypoxant action.

Key words: cryohemolysate, cord blood, Actovegin, antihypoxant activity, ontogenesis, hypoxia, resistance.

Гіпоксія – типовий патологічний процес, який визначає тяжкість перебігу та наслідків ішемічного ураження серця і головного мозку, шоківих і колаптоїдних станів, захворювань інфекційної та неінфекційної природи, а також стресових ситуацій [12]. Розрізняють гіпоксичні стани ендогенного та екзогенного типів. Гіпоксія першого типу за етіологією

Hypoxia is a typical pathological process that determines the severity and consequences of ischemic heart and brain diseases, shock and collaptoid states, infectious and noncontagious diseases, and stress as well [5]. There are endogenous and exogenous types of hypoxic states. Hypoxia of the first type could be etiologically divided into respiratory (reduced oxygen

Відділ холодової адаптації, Інститут проблем кріобіології і кріомедицини, 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: ivanhou11@gmail.com

*To whom correspondence should be addressed:
23, Pereyaslavskaya str., Kharkiv, Ukraine 61016;
tel.: +380 57 3737435, fax: +380 57 373 5952,
e-mail: ivanhou11@gmail.com

Надійшла 15.11.2016
Прийнята до друку 05.12.2016

Received November, 15, 2016
Accepted December, 05, 2016

© 2017 O.K. Gulevsky 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.

поділяється на дихальну (зменшення надходження кисню до організму при патології органів дихання), циркуляторну (розлади циркуляції крові по судинній системі), гемічну (порушення киснево-транспортної функції крові внаслідок деяких патологічних процесів) і тканинну (недостатня екстракція тканинами з крові, що припливає, кисню і нездатність клітин до його утилізації). Екзогенна гіпоксія може розвиватися в результаті зменшення парціального тиску кисню у вдихуваному повітрі при нормальному загальному барометричному тиску (нормобарична гіпоксія) та зниженому загальному барометричному тиску (гіпобарична гіпоксія). Нормобарична гіпоксія може виникнути в замкнутому просторі (відсіки підводного човна, сховища, бункери, ангари), а також при несправності дихальної апаратури, гіпобарична – під час дихання газовими сумішами з недостатнім парціальним тиском кисню (наприклад, гірська і висотна хвороби). Гіпоксія екзогенного типу розвивається внаслідок компенсаторної гіпервентиляції легенів, яка призводить до порушення кислотно-основної рівноваги та розвитку газового алкалозу. Екзогенна гіпоксія, як і гіпоксії іншого генезу, що ініціюють розвиток ацидозу, активацію процесів ліпопероксидації, дестабілізацію всіх біологічних мембран, в тому числі й мітохондріальних, призводить до формування тканинної гіпоксії. Гіпоксія, починаючись як циркуляторна, дихальна або гемічна, досить швидко набуває змішаного характеру [12].

У зв'язку з вищевикладеним на даний час важливою є розробка нових засобів для медикаментозної корекції метаболічних і функціональних порушень, обумовлених гіпоксією, яка супроводжує будь-який патологічний процес або виникає під час стресових впливів навколишнього середовища. Фармакологи активно ведуть пошук нових специфічних антигіпоксантичних засобів, що впливають на постачання кисню до тканин, а також на його утилізацію клітинами і кисневозалежний метаболізм. Одним із ефективних підходів у терапії різних захворювань вважається використання плейотропних препаратів, які справляють модулюючий вплив на різні пошкоджуючі патологічні механізми (гіпоксію, окислювальний стрес, запалення та ін.) [13]. Особлива увага приділяється пошуку біологічно активних речовин природного походження. Так, інтерес багатьох дослідників давно привертає висока біологічна активність низькомолекулярних речовин, які містяться в крові молодих тварин. На сьогодні широким попитом на фармацевтичному ринку користуються препарати, створені на основі безбілкових гемодіалізатів, які отримують методом ультрафільтрації з крові молочних телят віком до 3-х місяців. Добре відомим препаратом антигіпоксантичної дії є «Актовегін» («Nycomed», Австрія), до складу якого

delivery to a body at respiratory pathology), circulatory (disorders of blood circulation through the vascular system), hemic (disordered oxygen-transport function of blood resulted from some pathological processes) and tissue one (insufficient extraction by tissues from mantled blood of oxygen and inability of cells to its disposal). Exogenous hypoxia can appear as a result of the reduced partial pressure of oxygen in inhaled air at normal total barometric pressure (normobaric hypoxia) and decreased total barometric pressure (hypobaric hypoxia). Normobaric hypoxia can occur in a confined space (compartments of submarine, depositories, bunkers, hangars), as well due to the failure of respiratory apparatus, hypobaric hypoxia may also take place in case if breathing gas mixtures have insufficient oxygen partial pressure (e.g., mountainous and high-altitude sickness). Exogenous hypoxia is developing because of compensatory hyperventilation of lungs, resulting in disruption of acid-base equilibrium and progression of gas alkalosis. Like hypoxias of other origin, initiating acidosis development, activation of lipid peroxidation or destabilization of all the biological membranes including mitochondrial ones, the exogenous hypoxia leads to the formation of tissue hypoxia. The hypoxia could start as a circulatory, respiratory or hemic one, but quickly acquires a mixed nature [5].

In accordance with the above statements, nowadays it is important to develop new drugs for pharmacotherapeutical correction of metabolic and functional disorders caused by hypoxia which accompanies any disease or occurs during environmental stresses. Pharmacologists are actively developing new specific antihypoxants affecting the supply of oxygen to tissues as well as its utilization by cells and oxygen-dependent metabolism. Pleiotropic products with modulating effect on various strong pathological mechanisms (hypoxia, oxidative stress, inflammation, etc.) are thought to be effective in the treatment of various diseases [18]. Specific attention is paid to studying the bioactive substances of natural origin. In particular, a high biological activity of low molecular substances contained in blood of juvenile animals is of interest of many researchers. The today's pharmaceutical market shows a great demand in the preparations, based on protein-free hemodialysate obtained by ultrafiltration from the blood of 3-month-old calves. Actovegin (Nycomed, Austria) is a well known drug with antihypoxant activity, which contains the substances with a molecular weight below 5 kDa (carbohydrates, amino acids, low molecular weight peptides, derivatives of nucleic acids etc.). Therapeutic effects of the product are based on its ability to stimulate the consumption of oxygen and glucose by cells that is important in terms of correcting many pathologies accompanied by tissue hypoxia [1, 4, 5, 14, 18]. Umbilical and placental (cord) blood contains much more biologically active factors compared to



входять речовини з молекулярною масою до 5 кДа (вуглеводи, амінокислоти, низькомолекулярні пептиди, деривати нуклеїнових кислот та ін.). Терапевтичні ефекти препарату визначаються його здатністю стимулювати споживання клітинами кисню та глюкози, що має велике значення для корекції багатьох патологічних станів, які супроводжуються гіпоксією тканин [1, 12, 13, 16, 20]. Крім того відомо, що пуповинно-плацентарна (кордова) кров значно багатша на біологічно активні чинники порівняно з периферичною кров'ю дорослих організмів [11, 17, 18]. Завдяки цим особливостям цілісна кордова кров і одержані з неї препарати на основі окремих клітинних і неклітинних компонентів все більше застосовуються в клінічній практиці як трансплантаційний матеріал та біогенні стимулятори [19, 21]. Численні публікації за результатами застосування препаратів цільної кордової крові та її окремих компонентів в експериментах і клінічній практиці свідчать про їх позитивний вплив як на клітинні культури, так і на різні тканини, органи, системи та організм у цілому. Властивості препаратів пуповинної крові як біогенних стимуляторів обумовлені дією збалансованого комплексу біологічно активних речовин у її складі. Вони беруть участь в індукції, репресії, зворотному інгібуванні різних ферментів в органах і тканинах реципієнта. Це надає можливість впливати на метаболізм організму не тільки при патології, але й у нормі [2, 11, 14]. У цьому аспекті перспективними є роботи, спрямовані на розробку нових фармацевтичних препаратів на основі низькомолекулярних речовин кордової крові, оскільки це може значно розширити сировинну базу завдяки можливості використання кордової крові не тільки людини, але й тварин.

Сьогодні вченими, зокрема кріобіологами, ведеться активний пошук нових методів переробки біологічної сировини, які дозволили б створити ефективні технології виробництва біологічно активних речовин з максимальним збереженням їх нативної молекулярної структури і високої активності. Таким вимогам цілком відповідають кріогенні технології, які дозволяють переробляти сировину при негативних температурах. Це сприяє інгібуванню реакцій окислення, виключенню процесів денатурації та дисоціації важливих молекулярних комплексів і має надзвичайне значення для впровадження препаратів на фармацевтичному ринку. У попередніх роботах нами досліджувалися біологічна активність і терапевтична дія низькомолекулярної фракції (до 5 кДа), отриманої методом ультрафільтрації з кріогемолізату кордової крові великої рогатої худоби [4–6]. Відомо, що фракція кордової крові до 5 кДа складається не тільки з низькомолекулярних речовин, присутніх відпочатку в плазмі, а й тих, що потрапляють до кріогемолізату

peripheral blood of adults [6, 11, 20]. Due to these features the whole cord blood and derivative preparations with certain cellular and non-cellular components are increasingly used in clinical practice as the transplant material and biogenic stimulants [13, 21]. Numerous publications on the results of application of the medical products of the whole cord blood and its certain components in experiments and clinical practice indicate their positive effect on the cell cultures, different tissues, organs, systems and whole organism as well. Properties of cord blood preparations as biogenic stimulants are based on the activity of a balanced complex of biologically active substances as its components. They participate in an induction, repression, reversible inhibition of various enzymes in recipient's organs and tissues. This provides an opportunity to affect metabolism of body not only in the norm but under pathologies as well [2, 17, 20]. In this aspect the studies targeted to develop new pharmaceuticals based on low molecular weight substances of cord blood are of great importance because of expansion of potential raw material sources considering the using animal cord blood in addition to human blood.

Scientists, in particular, cryobiologists are now actively developing new methods for processing biological materials that would create effective production technologies of biologically active substances with maximum preservation of their native molecular structure and high activity. Cryogenic technologies that allow to process the raw materials at low temperatures fully meet these requirements. This promotes an inhibition of oxidation reactions, eliminating denaturation and dissociation of important molecular complexes and is of an exceptional importance for introducing the drugs to a pharmaceutical market. In previous studies we investigated the biological activity and therapeutic effect of low molecular fraction (below 5 kDa) obtained by ultrafiltration from cryohemolysate of bovine cord blood [7–9]. It has been known that cord blood fraction below 5 kDa consists not only of low molecular substances being in plasma, but also those that get into cryohemolysate from cytosol and cell organelles as a result of their destruction under low temperature effect. Therefore, in order to enhance the content of biologically active substances in the final preparation we used the regimen of rapid freezing – slow thawing. The experimental results in animals have shown that the mentioned fraction had hypoglycemic and reparative action. These effects were established as being not characteristic for similar fraction from the blood of 4–5-year-old cows. It was also shown that the fraction below 5 kDa from bovine cord blood contributed in better supply of glucose and oxygen to the cells, as well as their more efficient utilization [7, 19]. In this connection the questions arise: whether fraction below 5 kDa from bovine cord blood has antihypoxant action

з цитозоллю та клітинних органел внаслідок їх руйнування під впливом низької температури. Тому з метою збільшення вмісту в кінцевому препараті біологічно активних субстанцій нами було використано режим «повільного заморожування – повільного відігріву». Результати експериментів на тваринах довели, що фракція має цукрознижувальну та репаративну дію. Встановлено, що зазначені ефекти не притаманні аналогічній фракції з крові корів віком 4–5 років. Також було показано, що фракція до 5 кДа з кордової крові корів сприяє кращому забезпеченню клітин глюкозою та киснем і, як наслідок, більш ефективному їх засвоєнню [6, 15]. У зв'язку з цим постають питання: чи володіє фракція до 5 кДа з кордової крові великої рогатої худоби антигіпоксантною дією та чи зберігається біологічна активність низькомолекулярної фракції крові протягом життя тварин? Для відповіді на ці питання ми провели порівняльне дослідження антигіпоксантної дії фракції до 5 кДа з крові великої рогатої худоби, отриманої на трьох різних стадіях онтогенезу: з пуповини під час народження, у віці до 3-х місяців та 4–5 років. Дані експерименти проводили в рамках науково-дослідної роботи 2.2.6.93 «Дослідження залежності складу і біологічної активності фракцій кордової крові від умов холододового впливу».

Матеріали та методи

У роботі досліджували три види низькомолекулярної фракції (до 5 кДа): з кордової крові (ФКК), крові 3-місячних телят (ФТ) і крові корів віком 4–5 років (ФК). Препаратом порівняння був «Актовегін», який за походженням і способом отримання є аналогом вищевказаної фракції з крові молочних телят.

Фракцію з кордової крові великої рогатої худоби, крові молочних телят та крові дорослих корів, яка містить компоненти з молекулярною масою не вище 5 кДа, виділяли методом ультрафільтрації з використанням мембранного модуля «Vivaflow 200» («Sartorius», Німеччина). Перед ультрафільтрацією (на етапі збору) кров дефібринували, а потім для досягнення найбільш повного руйнування клітинних елементів повільно заморожували до -80°C і розморожували при кімнатній температурі.

У дослідженнях, метою яких є пошук нових антигіпоксантних засобів, зазвичай використовують досить прості моделі екзогенної гіпоксії: нормобаричної («гіпоксія замкнутого простору») або гіпобаричної (моделювання «гірської хвороби» за допомогою барокамери). Антигіпоксантну активність отриманих фракцій і «Актовегіну» порівнювали за їх впливом на стійкість мишей до нормобаричної гіпоксії за допомогою моделі гіпоксії в замкнутому об'ємі у власній модифікації. Експе-

and does biological activity of low molecular fraction of blood during the life of animals remain? To answer these questions, we compared the antihypoxant action of the fraction below 5 kDa from bovine blood obtained at three different stages of ontogenesis: from umbilical cord blood at birth, at the age of 3 months and 4–5 years. These experiments were carried out within the framework of the research project 'Investigation of dependence of composition and biological activity of cord blood fractions on conditions of cold effect'.

Materials and methods

In the research we have used three sources of low molecular weight fractions (below 5 kDa): cord blood (CBF), blood of 3-month-old calves (CF) and bovine blood of 4–5-year-old cows (BF). Actovegin was a reference drug, and its way of production is similar to above mentioned calf blood fraction.

Fraction from bovine cord blood, blood from 3-month-old calves and 4–5-year-old cows, containing components with a molecular weight below 5 kDa were isolated by ultrafiltration using Vivaflow 200 membrane module (Sartorius, Germany). Prior to ultrafiltration (at collection stage) blood was defibrinated, thereafter to achieve the most complete destruction of cell elements it was slowly frozen down to -80°C and thawed at room temperature.

The studies targeted to develop new antihypoxant drugs often apply quite simple models of exogenous hypoxia such as normobaric (confined space hypoxia) or hypobaric one (simulation of altitude sickness using altitude chamber). Antihypoxant activity of obtained fractions and Actovegin was compared to their effect on mice resistance to normobaric hypoxia using the model of confined space hypoxia in own modification. The experiments were performed in white outbred male mice of 29.5–30.5 g, which were kept on a standard diet. We have selected the animals with median values of resistance to hypoxia, determined by the method of B. Berezovsky [3]. The animals were divided into five groups according to administered agents: the 1st – CBF, the 2nd – CF, the 3rd – BF, the 4th – comparative drug, the 5th – the control. Actovegin was a reference drug; the animals treated with physiological saline were the control. Investigated fractions were injected intraperitoneally 0.5 hours prior to the experiment at a dose of 4 mg (dry weight) per 1 kg of body weight. Five day course of injections of fractions was performed before carrying out a series of experiments. The mice were placed into a flask of 250 ml, which was tightly closed with a sealed glass stopper. To reduce hypercapnia action in the chambers CO_2 was absorbed by bags filled with a mixture of $\text{Ca}(\text{OH})_2$ and NaOH in the ratio of 2:1 (50 g). The air temperature in the chambers was 20...20.5°C. Survival time of



рименти проводили на білих нелінійних мишах-самцях масою 29,5–30,5 г, які утримувалися на стандартній дієті. Для роботи відбирали тварин із середніми показниками резистентності до гіпоксії, яку визначали за методикою В.Я. Березовського [3]. Тварин розділили на 5 груп відповідно до того, який препарат вводили: 1 – ФКК, 2 – ФТ, 3 – ФК, 4 – препарат порівняння та 5 – контроль. Препаратом порівняння був «Актовегін», контролем – тварини, яким замість препаратів вводили фізіологічний розчин. Досліджувані фракції вводили внутрішньочеревно за 0,5 години до експерименту в дозі 4 мг (у перерахунку на суху речовину) на 1 кг маси тіла. Перед проведенням однієї серії експериментів тестуванню передував п'ятиденний курс ін'єкцій фракцій. Мишей поміщали в колбу об'ємом 250 мл, яку щільно закривали скляною пробкою, змащеною герметиком. Для зменшення дії гіперкапнії в камери поміщали мішечки, наповнені для поглинання CO₂ сумішшю Ca(OH)₂ і NaOH у ваговому співвідношенні 2:1 (50 г). Температура повітря в камерах складала 20,0...20,5°C. Час виживання піддослідних мишей реєстрували за другим агональним вдихом, після чого відновлювали надходження атмосферного повітря до камери. Антигіпоксанти властивості досліджуваних фракцій оцінювали за рівнем малонового діальдегіду (МДА) та гідроперекисів ліпідів у гомогенаті мозку мишей [8]. Для отримання гомогенату мозку по 10 тварин із кожної групи декапітували на 20-й хвилині перебування в умовах гіпоксії, що відповідало мінімальному часу виживання тварин контрольної групи, а частину тварин виводили із експерименту через 3 години після їх перенесення до звичайних атмосферних умов (із метою визначення впливу на дані показники реоксигенації). Мозок подрібнювали за допомогою механічного гомогенізатора десятьма проходженнями товчача при 400 об/хв. Вміст еритроцитів та лейкоцитів у крові піддослідних тварин визначали за допомогою мікроскопа у камері Горяєва. Концентрацію гемоглобіну вимірювали за допомогою гемоглобін-ціанідного методу [10].

Всі маніпуляції з тваринами проводили відповідно до «Загальних принципів експериментів на тваринах», ухвалених VI Національним конгресом з біоетики (Київ, 2016) і узгоджених із положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986).

Статистичну обробку експериментальних даних здійснювали за допомогою комп'ютерної програми «Statgraphics 2.1 plus for Windows» (StatPoint Inc., США) за тестами t-критерію Стьюдента і Манна-Уїтні.

experimental mice was recorded in the second agonal breath, and then flow of air to the chamber was resumed. Antihypoxant properties of the studied fractions were assessed with level of malondialdehyde (MDA) and lipid hydroperoxides in homogenate of mice brain [12]. To derive brain homogenate 10 animals from each group were decapitated on the 20th min of hypoxia exposure, corresponded to the minimum survival time of animals in the control group, and some animals were sacrificed 3 hours after their transfer to normal atmospheric conditions (to determine the effect on the indices of reoxygenation). Brain was homogenized by ten strokes of the pestle at 400 rot/min. The content of erythrocytes and leukocytes in the blood of experimental animals was revealed using a microscope in Goryaev's chamber. Hemoglobin concentration was measured using the hemoglobincyanide method [16].

The experiments in animals were carried out in accordance with the General Principles of Experiments in Animals, approved by the 6th National Congress in Bioethics (Kyiv, 2016) and consistent with the statements of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986).

The experimental data were statistically processed using Statgraphics 2.1 plus for Windows software (StatPoint Inc., USA), Student's t-test and Mann-Whitney test.

Results and discussion

The results of hypoxia test in confined space demonstrated that BF administration to animals did not affect the survival time of mice, but the injections of CBF, CF and Actovegin were efficient (Table 1). The effect of a previous 5-day course of these preparations injection to animals was more pronounced.

It should be noted that even a single injection of CBF caused a significant increase in survival time of mice under hypoxic conditions, while after the introduction of CF and Actovegin only its statistically insignificant rise was observed (Table 1). The increase of the index under hypoxic conditions after a five-day course of CBF, CF and Actovegin injections is consistent with the data on MDA and lipid hydroperoxide content in brain tissue on the 20th min of the test (Table 2). After introduction of CBF, CF and Actovegin these indices were statistically and significantly lower than in the control group, although higher than the normal values. The MDA and hydroperoxide content in brain tissue of mice received BF did not differ from the control (Table 2).

In many cases the recovered partial pressure of oxygen in tissues (reoxygenation) has no less damaging effect than the hypoxia. Therefore, we have studied the content of MDA and lipid peroxides in brain tissue



Результати та обговорення

Результати тесту гіпоксії в замкнутому об'ємі довели, що введення тваринам ФК не впливало на час виживання мишей, а ін'єкції ФКК, ФТ і «Актовегіну» мали ефективну дію (табл. 1). Більш вираженим був ефект від попереднього п'ятиденного курсу ін'єкцій даних препаратів тваринам.

Слід зазначити, що навіть одноразова ін'єкція ФКК викликала значуще збільшення часу виживання мишей в умовах гіпоксії, тоді як після введення ФТ і «Актовегіну» спостерігалось лише статистично незначуще його збільшення (табл. 1). Така зміна цього показника в умовах гіпоксії після п'ятиденного курсу ін'єкцій ФКК, ФТ і «Актовегіну» узгоджується з даними щодо вмісту МДА та гідроперекисів ліпідів у тканині мозку на 20-й хвилині тесту (табл. 2). Після ін'єкцій ФКК, ФТ і «Актовегіну» ці показники були значуще нижчими, ніж у контрольній групі, хоча і перевищували нормальні значення. Вміст МДА та гідроперекисів у тканині мозку мишей, яким вводили ФК, не відрізнявся від контрольного (табл. 2).

У багатьох випадках відновлення парціального тиску кисню в тканинах (реоксигенація) має не менш пошкоджуючий ефект, ніж сама гіпоксія. Тому нами було досліджено вміст МДА та перекисів ліпідів у гомогенаті тканини мозку піддослідних мишей через 3 години після припинення дії гіпоксії. У тварин після ін'єкцій ФКК, ФТ і «Актовегіну» ці показники залишалися вищими за норму, але була помітна тенденція до їх зниження порівняно з відповідними значеннями на 20-й хвилині гіпоксії в замкнутому об'ємі. Вміст МДА в гомогенаті мозку тварин контрольної групи та групі тварин, яким вводили ФК, залишався таким самим високим, як і на 20-й хвилині тесту, а вміст гідроперекисів навіть значуще збільшувався (табл. 2).

На нашу думку, вірогідним поясненням таких змін можуть бути відмінності у реакції на гіпоксію системи крові тварин різних дослідних груп. З метою встановлення можливих відмінностей щодо впливу на киснево-транспортну функцію крові піддослідних тварин фракції до 5 кДа, яку одержували з крові великої рогатої худоби на різних стадіях онтогенезу, було визначено деякі показники гемогра-

homogenate of experimental mice 3 hrs later the hypoxia effect termination. In the animals treated with injection of CBF, CF and Actovegin these indices were higher than the norm, but the tendency of their decrease as compared with the corresponding values on the 20th min of hypoxia in a confined space, was observed. The MDA content in brain homogenate of animals from the control group and mice which received CF remained as high as on the 20th min of the test, but the hydroperoxide content was even significantly increased (Table 2).

We believe these changes may be probably explained by various responses to hypoxia of blood system of animals from different research groups. In order to establish the possible differences in the effect on oxygen-transport function of experimental animal blood of the fraction below 5 kDa, obtained from cattle blood at various stages of ontogeny, we determined some indices in murine haemogram after a 5-day course of injections. As demonstrated in the Table 3, none of the preparations affected the number of erythrocytes, hemoglobin concentration and hematocrit of murine blood before hypoxia effect onset. On the 20th min of hypoxia in animals of the control group and those received BF, a number of erythrocytes, hemoglobin and hematocrit were increased. This may be explained by a compensatory release of blood cells from the 'depot' in response to a decrease in oxygen partial pressure. However, in animals after administering CBF, CF and Actovegin this tendency was not observed. In 3 hrs after the hypoxia effect terminated, the studied indices in all the groups of animals remained at the same level. Consequently, higher damaging effect of

Таблиця 1. Час виживання мишей у тесті гіпоксії в замкнутому об'ємі, хв ($M \pm m$)
Table 1. Time of mice survival in confined space hypoxia test, min ($M \pm m$)

Умови експерименту Experimental conditions	Контроль (0,9 % NaCl) Control (0,9 % NaCl)	Актовегін Actovegin	Фракція з крові молочних телят Calf blood fractions	Фракція з кордової крові корів Bovine cord blood fractions	Фракція з крові корів віком 4–5 років Blood fractions from 4–5-year-old cows
Після одноразового введення ($n=10$) After a single injection ($n=10$)	21,9 ± 0,9	23,4 ± 0,8	23,5 ± 0,8	23,7 ± 0,8*	21,1 ± 0,9
Після 5-денного курсу ін'єкцій ($n=10$) After a 5-day course of injections ($n=10$)	21,0 ± 0,9	25,0 ± 0,8*	25,1 ± 0,8*	25,2 ± 0,8*	20,4 ± 0,8

Примітка: * – відмінності значущі порівняно з контролем, $p < 0,05$.

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



Таблиця 2. Вміст МДА та гідроперекисів ліпідів у тканині мозку мишей після п'ятиденного курсу ін'єкцій ($n = 10$)
Table 2. Content of MDA and lipid hydroperoxides in murine brain tissue after a 5-day course of injections ($n = 10$)

Показник Parameter	Норма Norm	Контроль (0,9 % NaCl) Control (0.9 % NaCl)	Актовегін Actovegin	Фракція з крові молочних телят Calf blood fractions	Фракція з кордової крові Bovine cord blood fractions	Фракція з крові корів віком 4–5 років Blood fractions from 4–5-year-old cows
На 20-й хвилині гіпоксії в замкнутому об'ємі On the 20th min of hypoxia in enclosed volume						
МДА, нмоль/мг білка MDA, nmol/mg protein	2,83 ± 0,15	4,43 ± 0,37 #	3,61 ± 0,29 **	3,54 ± 0,26 **	3,57 ± 0,27 **	4,64 ± 0,37 #
Гідроперекиси, одиниці екстинції Hydroperoxides, extinction units	0,12 ± 0,01	0,24 ± 0,02 #	0,18 ± 0,01 **	0,19 ± 0,02 **	0,17 ± 0,02 **	0,25 ± 0,03 #
Через 3 години після припинення дії гіпоксії 3 hours later after hypoxia termination						
МДА, нмоль/мг білка MDA, nmol/mg protein	2,83 ± 0,15	4,49 ± 0,48 #	3,33 ± 0,25 **	3,41 ± 0,30 **	3,29 ± 0,23 **	5,04 ± 0,45 #
Гідроперекиси, одиниці екстинції Hydroperoxides, extinction units	0,12 ± 0,01	0,33 ± 0,04 ***	0,16 ± 0,01 **	0,18 ± 0,01 **	0,15 ± 0,03 **	0,34 ± 0,03 ***

Примітка: відмінності значущі порівняно з контролем (*), нормою (#) та показниками на 20-й хвилині гіпоксії в замкнутому об'ємі (**), $p < 0,05$.

Note: significant differences if compared to the control (*), the norm (#), the indices to 20th min of hypoxia in confined volume (**), $p < 0,05$.

ми мишей після п'ятиденного курсу ін'єкцій. Як видно з табл. 3, жоден із препаратів не впливав на кількість еритроцитів, концентрацію гемоглобіну та гематокрит крові мишей до початку дії гіпоксії. На 20-й хвилині гіпоксії у тварин контрольної групи та тим, яким вводили ФК, збільшилася кількість еритроцитів, підвищився вміст гемоглобіну та гематокрит. Це можна пояснити компенсаторним виходом клітин крові з «депо» у відповідь на зниження парціального тиску кисню. Однак у тварин після введення ФКК, ФТ і «Актовегіну» такої тенденції не спостерігалось. Через 3 години після припинення дії гіпоксії досліджувані показники в усіх групах тварин залишалися на однаковому рівні. Отже, більший пошкоджуючий ефект реоксигенації на тканину мозку мишей контрольної групи та після введення ФК принаймні частково можна пояснити більш високою насиченістю крові киснем після відновлення його нормального вмісту у вдихуваній газовій суміші. Очевидно, завдяки більш ефективному використанню клітинами кисню у тварин, яким робили ін'єкції ФКК, ФТ і «Актовегіну», спостерігається менший його дефіцит, тому компенсаторного виходу еритроцитів із «депо» у відповідь на 20-хвилинну гіпоксію не відбувалося, що, можливо, мало позитивний ефект в умовах реоксигенації.

reoxygenation on brain tissue of mice in the control group and after administering CF may be at least partly explained by better blood saturation with oxygen after recovery of its normal content in the inhaled gas mixture. Obviously, due to more efficient use of oxygen by cells in the animals, injected with CBF, CF and Actovegin its lower deficit was observed, therefore no compensatory release of erythrocytes from the 'depot' in response to a 20-min hypoxia occurred, that possibly had a positive effect in terms of reoxygenation.

Thus, the low molecular weight fraction (below 5 kDa) from cord blood and blood of calves has the same antihypoxant activity as Actovegin drug unlike the fraction from bovine blood (4–5-year-old cows). Thus, at early stages of ontogenesis, in contrast to adult animals, the blood fractions below 5 kDa had a high antihypoxant activity.

The hypoxia development is believed to be based on disorders in the redox reactions, associated with oxygen deficiency. The development of oxygen deficiency in a body is accompanied by occurrence of a complicated complex of symptoms, resulting from hypoxia-induced disorders of the major systems and organs, as well as the changes stipulated by a primary pathological process, intoxication with insufficiently oxidized products *etc.* As a result of oxygen

Таблиця 3. Вплив п'ятиденного курсу ін'єкцій фракції до 5 кДа з крові великої рогатої худоби та гіпоксії в замкнутому об'ємі на деякі показники крові мишей ($n = 10$)

Table 3. Effect of 5-day course of injections of cattle cord blood fraction below 5 kDa and hypoxia in confined space on some blood indices of mice ($n = 10$)

Показник Index	Контроль (0,9 % NaCl) Control (0.9 % NaCl)	Актовегін Actovegin	Фракція з крові молочних телят Calf blood fractions	Фракція з кордової крові корів Bovine cord blood fractions	Фракція з крові корів віком 4–5 років Blood fractions from 4–5-year-old cows
Перед початком тесту Before the test					
Еритроцити, $\times 10^{12}$ г/л Erythrocytes, $\times 10^{12}$ g/l	5,4 \pm 0,8	5,6 \pm 0,6	5,5 \pm 0,9	5,7 \pm 0,9	5,3 \pm 0,7
Гемоглобін, г/л Hemoglobin, g/l	123,0 \pm 8,9	126,0 \pm 9,6	125,0 \pm 7,5	128,0 \pm 6,8	122,0 \pm 10,1
Гематокрит, % Hematocrit, %	28,4 \pm 2,5	30,2 \pm 3,5	29,4 \pm 1,9	30,3 \pm 2,8	27,6 \pm 2,9
На 20-й хвилині гіпоксії в замкнутому об'ємі To the 20th min of hypoxia in enclosed volume					
Еритроцити, $\times 10^{12}$ г/л Erythrocytes, $\times 10^{12}$ g/l	7,1 \pm 0,7*	5,9 \pm 0,5	5,7 \pm 0,8	5,9 \pm 0,7	6,9 \pm 0,6*
Гемоглобін, г/л Hemoglobin, g/l	168,0 \pm 10,2*	130,8 \pm 10,1	132,0 \pm 9,5	129,0 \pm 5,4	159,0 \pm 9,8*
Гематокрит, % Hematocrit, %	35,4 \pm 3,5*	31,4 \pm 5,3	32,1 \pm 3,5	31,6 \pm 4,6	35,3 \pm 3,6*
Через 3 години після припинення дії гіпоксії 3 hours later after hypoxia termination					
Еритроцити, $\times 10^{12}$ г/л Erythrocytes, $\times 10^{12}$ g/l	7,0 \pm 0,9*	5,8 \pm 0,7	5,8 \pm 0,9	5,8 \pm 0,8	6,9 \pm 0,9*
Гемоглобін, г/л Hemoglobin, g/l	165,0 \pm 8,7*	129,0 \pm 8,9	133,0 \pm 8,5	128,0 \pm 9,8	157,0 \pm 9,6*
Гематокрит, % Hematocrit, %	34,8 \pm 4,5*	30,8 \pm 5,6	31,4 \pm 3,1	30,8 \pm 2,4	37,0 \pm 4,3*

Примітка: * – відмінності значущі порівняно з показниками перед початком тесту, $p < 0,05$.

Note: * – significant differences if compared with the indices before the test, $p < 0.05$.

Таким чином, низькомолекулярна фракція (до 5 кДа) з кордової крові та крові молочних телят володіє однаковою з фармацевтичним препаратом «Актовегін» антигіпоксантиною активністю на відміну від фракції з крові корів віком 4–5 років. Отже, на ранніх стадіях онтогенезу, на відміну від дорослих тварин, фракція крові до 5 кДа має високу антигіпоксантину активність.

Вважається, що в основі розвитку гіпоксії лежать порушення окисно-відновних реакцій, пов'язані з дефіцитом кисню. Розвиток кисневої недостатності в організмі супроводжується виникненням складного симптомокомплексу, який є наслідком викликаних гіпоксією порушень функцій життєвоважливих систем і органів, а також змін, зумовлених первинним патологічним процесом, інтоксикацією недоокисленими продуктами і т. д. У результаті кисневого голодування клітин різних тканин і органів у них знижується здатність

starvation of cells of various tissues and organs they have a reduced ability to store energy in terms of macroergic phosphoric compounds (ATP, creatine phosphate) and, consequently, hypoxia results in the disorder of metabolism and virtually all the energy-dependent processes [5]. The severity and outcome of many diseases are determined by features of secondary nonspecific metabolic disorders, degree of destabilization of cell membranes and possibilities of reactivation of structural and enzymatic proteins under hypoxic conditions. An oxidative stress is considered as one of the factors in pathological state development. It manifests in dynamic equilibrium shift in the antioxidant-prooxidant system towards free-radical oxidation, especially lipid peroxidation, the products of which have a wide range of damaging action [15].

Our findings showed an antihypoxant activity of low molecular fraction from cord blood and calf blood and that it is stipulated by an increased level of



запасати енергію у вигляді макроергічних фосфорних сполук (АТФ, креатинфосфат) і, як наслідок, при гіпоксії порушується обмін речовин та практично всі енергозалежні процеси [12]. Тяжкість та результат перебігу багатьох захворювань визначається особливостями вторинних неспецифічних метаболічних розладів, ступенем дестабілізації клітинних мембран, а також можливостями реактивації структурних і ферментних білків в умовах гіпоксії. Одним із факторів розвитку патологічних станів вважають оксидативний стрес. Він проявляється в зсуві динамічної рівноваги в системі антиоксиданти-прооксиданти в бік вільнорадикального окислення, зокрема перекисного окислення ліпідів, продукти якого володіють широким спектром пошкоджуючої дії [9].

Результати проведених експериментів довели, що антигіпоксанта активність низькомолекулярної фракції з пуповинної крові та крові молочних телят обумовлена підвищенням рівня кисню у тканинах та активацією транспорту глюкози з крові до клітин, завдяки чому збільшується частка аеробного метаболізму вуглеводів, а отже покращується енергозабезпечення клітин, що сприяє збереженню життєвоважливих функцій [6, 7, 15].

Висновки

Таким чином, фракція кріогемолізату до 5 кДа з крові великої рогатої худоби на ранніх стадіях онтогенезу має виражену антигіпоксанта дію, тому може бути перспективним сировинним джерелом для виробництва фармацевтичних засобів антигіпоксанта дії, аналогічних за терапевтичною дією до препарату «Актовегін», який виробляють із крові молочних телят.

Література

1. Асташкин Е.И., Глейзер М.Г., Винокуров М.Г. и др. Актовегин снижает уровень радикалов кислорода в образцах цельной крови пациентов с сердечной недостаточностью и подавляет развитие некроза перевиваемых нейронов человека линии SK-N-SH // Доклады Академии Наук. – 2013. – Т. 448, №2. – С. 232–235.
2. Бабийчук Л.В., Сиротенко Л.А., Малова Н.Г. и др. Уровни липидов и глюкозы в сыворотке крови крыс на фоне стресс-индуцированной артериальной гипертензии и после введения криоконсервированной кордовой крови // Проблемы эндокринной патологии. – 2014. – Т. 24, №3. – С. 89–96.
3. Березовський В.А. Риси індивідуальності в реакції на гіпоксію // Фізіол. журн. – 1975. – Т. 21, №3. – С. 371–376.
4. Гулевский А.К., Абакумова Е.С., Моисеева Н.Н., Долгих О.Л. Влияние фракции кордовой крови (до 5 кДа) крупного рогатого скота на биохимические показатели крови при экспериментальной субхронической язве желудка у крыс // Укр. биохим. журнал. – 2008. – Т. 80, №2. – С. 92–99.
5. Гулевский А.К., Грищенко В.И., Моисеева Н.Н. и др. Эффект стимуляции репаративных процессов под влиянием фрак-

oxygen in tissues and glucose transport activation from blood to cells. This contributes to augmenting a share of aerobic metabolism of carbohydrates and therefore the improvement of energy supply to cells, contributing to vital function preservation [7, 10, 19].

Conclusions

Thus, the cryohemolysate fraction below 5 kDa from bovine blood at early stages of ontogenesis has a pronounced antihypoxant action and therefore may be a promising raw material source to produce pharmaceutical products with antihypoxant action, similar by therapeutic effect to Actovegin, produced from calf blood.

References

1. Astashkin E.I., Glezer M.G., Vinokurov M.G. et al. Actovegin reduces the ROS level in blood samples of heart failure patients and diminishes necrosis of SK-N-SH human neuroblastoma cells. Dokl Biol Sci 2013; 448(1): 57–60.
2. Babiychuk L.V., Sirotenko L.A., Malova N.G. et al. Lipid and glucose levels in the rat blood serum under the stress-induced hypertension and after the administration of cryopreserved cord blood. Problems of Endocrine Pathology 2014; 24(3): 89–96.
3. Berzovskyy V.A. Personality traits in response to hypoxia. Fiziol Zh 1975; 21(3): 371–376.
4. Buchmayer F., Pleiner J., Elminger M.W. et al. Actovegin: a biological drug for more than 5 decades. Wien Med Wochenschr 2011; 161(3–4): 80–88.
5. Chesnokova N.P., Ponukalina E.V., Bizenkova M.N. Modern conceptions of hypoxia pathogenesis. Hypoxia classification and the starters of its development. Sovremennye Naukoyomkie Tekhnologii 2006; 5: 23–27.
6. Erdem E., Yagmur M., Harbiyeli I. et al. Umbilical cord blood serum therapy for the management of persistent corneal epithelial defects. Int J Ophthalmol 2014; 5(7): 807–810.
7. Gulevskiy A.K., Nikolchenko A.Yu., Shchenyavskiy I.I. Antihyperglycemic effect of a fraction below 5 kDa from bovine cord blood. Veterynarna Medytsyna 2008; 89: 144–147.
8. Gulevskiy A.K., Abakumova E.S., Moiseeva N.N., Dolgikh O.L. Influence of cattle cord blood fraction below 5 kD on biochemical parameters of blood in experimental chronic stomach ulcer in rats. Ukr Biokhim Zh 2008; 80(2): 92–99.
9. Gulevskiy A.K., Grischenko V.I., Moiseeva N.N. et al. Stimulation effect of reparative processes under influence of fraction below 5 kDa from bovine placental cord blood. Dopov Nat Akad Nauk Ukr 2008; 2: 157–160.
10. Gulevskiy A.K., Nikolchenko A.Yu., Somov A.Yu. et al. Influence of the fraction below 5 kDa from cattle cord blood on respiratory activity of rat liver homogenates. Visnyk Problem Biologii i Medytsyny 2012; 91(1): 104–106.
11. Gulevskiy A.K., Abakumova Ye.S., Moiseyeva N.N. et al. Influence of cord blood fraction (below 5 kDa) on reparative processes during subchronic ulcerative gastropathy. Ulcers 2011; 2011: 23–31.
12. Karageuzyan M.K. Disorders of peroxide formation processes dynamics in whole brain homogenate of white rats under the zearalenon intoxication and normalizing action of superlow concentrations of double-stranded RNA on this background. Doklady NAN Armenii 2013; 2(113): 189–194.
13. Kedzia A., Petriczko E., Tarka A. Placental growth hormone, pituitary growth hormone, insulin-like growth factor, and ghrelin

- ции до 5 кДа из пуповинно-плацентарной крови крупного рогатого скота // Доп. НАН України. – 2008. – №2. – С. 157–160.
6. Гулевский А.К., Никольченко А.Ю., Щенявский И.И. Сахароснижающий эффект фракции до 5 кДа из пуповинной крови крупного рогатого скота // Ветеринарная медицина. – 2008. – Вып. 89. – С. 144–147.
 7. Гулевский А.К., Никольченко А.Ю., Сомов А.Ю. и др. Влияние предварительного введения фракции до 5 кДа из кордовой крови на процессы сопряженного дыхания в митохондриях печени крыс // Вісник проблем біології і медицини. – 2012. – Т. 91, №1. – С. 104–106.
 8. Карагезян М.К. Динамика нарушенных процессов перекиснообразования в общем мозговом гомогенате белых крыс при зеараленоновой интоксикации и корригирующее действие сверхнизких концентрации двуспиральной РНК на этом фоне // Доклады НАН Армении. – 2013. – Т. 113, №2. – С. 189–194.
 9. Овсепян Л.М., Захарян Г.В., Казарян Г.С. Исследование перекисного окисления белков и липидов при острой гипоксии // Биолог. журнал Армении. – 2010. – Т. 62, №3. – С. 42–45.
 10. Пупкова В.И. Определение гемоглобина в крови (информационно-методическое пособие). – Кольцово, 2001. – С. 4–8.
 11. Трифонов В.Ю., Прокопюк В.Ю., Зайченко А.В. Криоконсервированная сыворотка кордовой крови в восстановлении репродуктивной функции при антифосфо-липидном синдроме // Проблемы криобиологии. – 2011. – Т. 21, №1. – С. 75–84.
 12. Чеснокова Н.П., Понукалина Е.В., Бизенкова М.Н. Современные представления о патогенезе гипоксий. Классификация гипоксий и пусковые механизмы их развития // Совр. наукоемкие технологии. – 2006. – №5. – С. 23–27.
 13. Шавловская О.А. Новые аспекты применения Актовегина: от механизмов действия к клиническим эффектам // Эффективная фармакотерапия. – 2016. – Т. 9, №2. – С. 4–7.
 14. Щенявский И.И. Влияние фракции до 5 кДа, полученной из кордовой крови телят, на содержание лактата и пирувата в печени крыс после глюкозной нагрузки // Вісник проблем біології і медицини. – 2009. – Вып. 4. – С. 118–120.
 15. Щенявський І.Й. Вплив фракції до 5 кДа з пуповинно-плацентарної крові великої рогатої худоби на вміст глюкози та лактату і пірувату в тканині опікових ран // Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. – 2010. – Т. 1, №49. – С. 50–53.
 16. Buchmayer F., Pleiner J., Elmlinger M.W. et al. Actovegin: a biological drug for more than 5 decades // Wien. Med. Wochenschr. – 2011. – Vol. 161, №3–4. – P. 80–88.
 17. Erdem E., Yagmur M., Harbiyeli I. et al. Umbilical cord blood serum therapy for the management of persistent corneal epithelial defects // Int. J. Ophthalmol. – 2014. – Vol. 5, №7. – P. 807–810.
 18. Gulevsky A.K., Abakumova Ye.S., Moiseyeva N.N. et al. Influence of cord blood fraction (below 5 kDa) on reparative processes during subchronic ulcerative gastropathy // Ulcers. – 2011. – Vol. 2011. – P. 23–31.
 19. Kedzia A., Petriczko E., Tarka A. Placental growth hormone, pituitary growth hormone, insulin-like growth factor, and ghrelin in umbilical cord blood serum and amniotic fluid // Endokrynol. Pol. – 2013. – Vol. 64, №4. – P. 293–299.
 20. Machicao F., Muresanu D.F., Hundsbarger H. et al. Pleiotropic neuroprotective and metabolic effects of Actovegin's mode of action // J. Neurol. Sci. – 2012. – Vol. 322, №1–2. – P. 222–227.
 21. Versura P., Buzzi M., Giannaccare G. et al. Cord blood serum-based eye drops: the impact of donor haematological and obstetric factors on the variability of epidermal growth factor levels // Blood Transfus. – 2014. – Vol. 12, №1. – P. 44–50.
 - in umbilical cord blood serum and amniotic fluid. Endokrynol Pol 2013; 64(4): 293–299.
 24. Machicao F., Muresanu D.F., Hundsbarger H. et al. Pleiotropic neuroprotective and metabolic effects of Actovegin's mode of action. J Neurol Sci 2012; 322(1–2): 222–227.
 25. Ovsepyan L.M., Zakaryan G.V., Kazaryan G.S. Study of oxidative modification of proteins and lipids at hypoxia. Biological Journal of Armenia 2010; 3(62): 42–45.
 26. Pupkova V.I. Determination of hemoglobin in blood (methodical manual). Koltsovo; 2001.
 27. Schenyavsky I.I. Influence of fraction below 5 kDa, extracted from the calf cord blood, on lactate and pyruvate contents in rat liver after glucose challenge. Vestnik Problem Biologii i Meditsyny 2009; 4: 118–120.
 28. Shavlovskaya O.A. New aspects of the use of Actovegin: from mechanisms to the effects. Effectivnaya Farmakoterapiya 2016; 2(9): 4–7.
 29. Shenyavsky I. Influence of the fraction under 5 kDa from the cattle cord blood on glucose, lactate and pyruvate contents in burn wound tissues. Experimental and Clinical Physiology and Biochemistry (ECPB) 2010; 49(1): 50–53.
 30. Trifonov V.Yu., Prokopyuk V.Yu., Zaychenko A.V. Cryopreserved cord blood serum for reproductive function restoration during antiphospholipid syndrome. Probl Cryobiol 2011; 21(1): 75–84.
 31. Versura P., Buzzi M., Giannaccare G. et al. Cord blood serum-based eye drops: the impact of donor haematological and obstetric factors on the variability of epidermal growth factor levels. Blood Transfus 2014; 12(1): 44–50.

