

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ ТА КРІОМЕДИЦИНИ

**КУЗНЕЦОВА ВІКТОРІЯ ГЕННАДІЇВНА**

УДК: 636.521.58:612.646:616.15:636.028

**ОТРИМАННЯ КРІОЕКСТРАКТІВ З ЕМБРІОНІВ КУРЕЙ ТА ЇХ  
БІОЛОГІЧНА ДІЯ У ЩУРІВ З ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИМ ТОКСИЧНИМ  
ГЕПАТИТОМ**

03.00.19 – кріобіологія

**Автореферат**

дисертації на здобуття наукового ступеня

кандидата біологічних наук

Харків-2016

## Дисертацією є рукопис

Робота виконана в Харківській державній зооветеринарній академії

**Науковий керівник:** доктор біологічних наук, професор, завідувач кафедри хімії та біохімії імені проф. О.В. Чечоткіна ХДЗВА, Лауреат державної премії України в області науки та техніки Жегунов Геннадій Федорович

**Офіційні опоненти:** доктор біологічних наук, старший науковий співробітник Гальченко Сергій Євгенович, Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, провідний науковий співробітник відділу експериментальної кріомедицини, м.Харків.

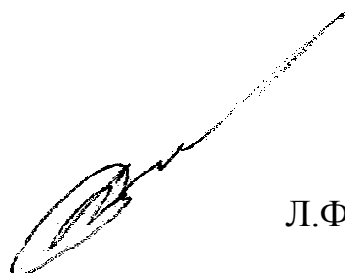
доктор біологічних наук, професор  
Загайко Андрій Леонідович, Національний фармацевтичний університет, завідувач кафедри біохімії, м.Харків.

Захист відбудеться «22» листопада 2016 р. о 13-30 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д.64.242.01 при Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України за адресою: 61015, м. Харків, вул. Переяславська 23.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України за адресою: 61015, м.Харків, вул. Переяславська 23.

Автореферат розісланий «22» жовтня 2016 р.

Вчений секретар  
спеціалізованої вченої ради Д64.242.01,  
доктор біологічних наук, професор



Л.Ф. Розанов

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Досягнення кріобіології останніх десятиріч, створення унікальних кріобіологічних технологій довгострокового зберігання різних клітин і тканин сприяли прогресу багатьох напрямків медицини і біології, зокрема стали підґрунтям нового, сучасного етапу розвитку клітинної і тканинної терапії (Грищенко В.И., 2000; Меньшиков Н.В., 2002; Гольцев А.Н. 2011, Bianco P., 2000).

Клітинна і тканинна терапія як напрямок науки має майже сторічну історію (Грищенко В.И., 2000). Її родоначальником вважають лікаря С. Воронова, який у 20-ті роки минулого сторіччя з успіхом застосовував підсадку фетальних тканин пацієнтам. Пізніше клітинна терапія отримала продовження і широке висвітлення у роботах Nicolson та його послідовників, які використовували в якості лікарського компоненту очищені та висушені екстракти тканин і органів плодів овець (Kahn, 2005).

Другим поколінням препаратів клітинної терапії можна назвати препарати, отримані з переживаючих тканин, виготовлені за В.П. Філатовим. В.П. Філатов розробив методику зберігання ізольованих тканин (рогівка ока, шкіра), біологічних тканин, що витримані в парабіотичних умовах та не мають життєздатності (плацента, хоріон, склоподібне тіло), екстракти та відгони з них і назвав це тканинною терапією (Логай, 2002).

У теперішній час накопичений великий обсяг фундаментальних та експериментальних даних щодо створення і дослідження біологічної дії різних форм біопрепаратів (Halfpenny S., 2002; Berger S.N., 2005; Vercruysse L., 2005; Грищенко В.И., 2005; Гольцев А.Н., 2005). Визначальним моментом розробки і отримання цих препаратів є вибір джерела сировини (Кузнецова В.Г., 2011; Varney T., 2001). До перспективних джерел клітинно-тканинних препаратів спеціалісти відносять клітини і тканини фетоплацентарного комплексу людини – плаценту, оболонки плоду, кордову кров (Петренко А.Ю., 2001; Ahmad T.A., 2002; Гальченко С.Є., 2003; Останкова Л.В., 2006; Розанова С.Л., 2008; Skene D.J., 2001; Cleary M., 2001). Разом з цим, використання таких тканин для виготовлення з них біопрепаратів в деяких країнах має свої обмеження або заборонено (Грищенко В.И., 2004).

Значна увага дослідників також приділяється виготовленню препаратів з тканин та органів, у тому числі фетальних, сільськогосподарських тварин (велика рогата худоба, свині, поросята, вівці тощо). Головним чином це пов'язано з тим, що при використанні такого матеріалу не виникає морально-етичних проблем, а також відсутня небезпека інфікування на характерні для людини віруси (ВІЛ, гепатит). Однак, виготовлення ксенопрепаратів також має ряд обмежуючих факторів, зокрема, епізоотичні проблеми, необхідність використання виключно «здорового» матеріалу, вирощування тварин в екологічно чистих умовах та інше (Главацкий А.Я., 2010; Cheien R.N., 2004).

Дані аспекти примусили вчених звернути увагу на альтернативні джерела сировини, зокрема, ембріони курей (Николаенко А.Н., 1998; Тимченко Л.Д., 2013). Незважаючи на те, що птахи відносяться до іншого класу тварин, біохімічні процеси в клітинах їх організму проходять, в цілому, так, як і у ссавців. Окрім того, ембріони птахів є найбільш епізоотично стійким біооб'єктом як

самоконтрольована система, що живе та розвивається лише в умовах майже повної відсутності мікроорганізмів. В останні роки отримано ряд препаратів з ембріональних тканин курей для тварин та людини (Савула М.М., 2007; Николаенко А.Н., 2011). Однак, біотехнологічний потенціал використання курячих ембріонів достатньо великий та не вичерпаний, а проблема використання ембріональних тканин курей в якості субстрату для отримання біологічно активних препаратів та вивчення їх впливу на організм ссавців в нормі та при патології є актуальною і потребує подальшого дослідження.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами і темами.** Дисертаційна робота виконана в рамках теми Харківської державної зооветеринарної академії «Експериментальне обґрунтування і розробка методів кріоконсервування клітин і тканин домашніх і сільськогосподарських тварин, а також розробка методів отримання екстрактів з ембріональних тканин тварин» (№ держреєстрації 0104U009818).

**Мета і завдання дослідження.** Метою даної роботи було отримання кріоекстрактів з ембріонів курей, дослідження їх складу та біологічної дії при експериментальному гепатиті у щурів.

Для досягнення мети були поставлені такі завдання:

1. Розробити методи отримання екстрактів з ембріонів курей з використанням низьких температур.
2. Дослідити гостру та хронічну токсичність і визначити ступінь нешкідливості отриманих кріоекстрактів.
3. Провести дослідження складу кріоекстрактів з ембріонів курей, а саме – кількісного вмісту пептидів, амінокислот та жирних кислот як основних біологічно активних речовин.
4. Дослідити біологічну дію кріоекстрактів з ембріонів курей на моделі токсичного гепатиту у щурів.
5. Провести гістологічне дослідження печінки та селезінки щурів з експериментальним тетраклорметановим гепатитом.
6. Вивчити здатність отриманих кріоекстрактів з ембріонів курей впливати на кількість лейкоцитів у мишей з експериментальною лейкопенією.

*Предмет дослідження.* Кріоекстракти з ембріонів курей, їх склад, токсичність і вплив на організм щурів з експериментальним гепатитом.

*Об'єкт дослідження.* Біологічна дія кріоекстрактів з ембріонів курей у тварин з експериментальним гепатитом.

*Методи дослідження.* При виконанні дисертаційної роботи для отримання кріоекстрактів було використано методи низькотемпературного заморожування ембріонів курей; гельпроникної, рідинної та газової хроматографії для визначення якісного та кількісного вмісту низькомолекулярних пептидних фракцій, жирних кислот та амінокислот в отриманих кріоекстрактах; для дослідження змін в крові, сироватці крові та гомогенатах печінки експериментальних тварин після введення кріоекстрактів з ембріонів курей використовували біохімічні методи; проводили гістологічне дослідження морфофункціональних змін в печінці і селезінці щурів; для обробки результатів експериментів застосовували статистичні методи обробки досліджень.

**Наукова новизна отриманих результатів.** Вперше розроблено метод отримання кріоекстрактів з ембріональної тканини курей як альтернативного джерела фетальної сировини для виготовлення біопрепаратів. Вперше проведено дослідження впливу фактора заморожування сировини і різного терміну їх експозиції у рідкому азоті (-196°C) при виготовленні кріоекстрактів на їх склад, токсичність і біологічну дію у порівнянні з екстрактами із нативних ембріонів. Вперше визначений рівень гострої і хронічної токсичності отриманих кріоекстрактів, встановлена їх нешкідливість за існуючою класифікацією.

Вперше досліджений склад кріоекстрактів з ембріонів курей, отриманих за розробленим методом, встановлений якісний і кількісний вміст амінокислот і жирних кислот, кількісний вміст низькомолекулярних пептидів з молекулярною масою від 0,5 кДа до 5,7 кДа.

Вперше проведено комплексне дослідження клінічного стану, біохімічних та гематологічних показників у щурів з експериментальним токсичним гепатитом. Встановлено, що введення кріоекстракту чинило позитивну дію і сприяло значному підвищенню виживаності лабораторних тварин з токсичним ураженням печінки, зниженню активності ферментів АлАТ і АсАТ, зменшенню інтенсивності процесів пероксидації ліпідів, гальмуванню цитолізу. Вперше проведено морфологічне дослідження тканин печінки і селезінки щурів під час розвитку і перебігу патології, встановлено, що застосування кріоекстракту сприяло відновленню структури ушкодженої печінки, стимулювало центри лейкопоезу в селезінці експериментальних тварин.

**Практичне значення отриманих результатів.** Розроблений спосіб отримання біологічно активних кріоекстрактів з ембріонів курей може бути використаний в практиці для створення біопрепаратів. Експериментально обґрунтована доцільність використання заморожування сировини у рідкому азоті при отриманні кріоекстрактів з ембріональних тканин курей. Показано, що даний спосіб може бути використаний для удосконалення методів отримання різних біологічно активних компонентів у препаратах.

Отримані результати щодо позитивної дії кріоекстракту у щурів із токсичним ураженням печінки, можуть бути підґрунтям для розробки нового гепатопротекторного препарату на основі ембріональних тканин курей.

**Особистий внесок здобувача.** Автором дисертаційної роботи самостійно проведено аналіз літератури за темою дослідження, отримано експериментальні дані, проведено їх первинний аналіз, статистичну обробку. Спільно з науковим керівником встановлену мету роботи та визначено завдання для її досягнення, інтерпретовані результати і сформульовані висновки. У роботах, опублікованих у співавторстві, особистий внесок здобувача полягає:

у роботах [1, 2, 7, 8, 10, 11, 14, 15] – розробка способу отримання кріоекстрактів з ембріонів курей та визначення їх здатності впливати на лейкопоетичні центри у тварин з експериментальною лейкопенією;

у роботах [3, 9, 16, 17, 20] – оцінка впливу кріоекстрактів на серцево-судинну систему та гематологічні показники у експериментальних тварин;

у роботах [4, 6] – оцінка здатності кріоекстрактів впливати на процеси перекисного окиснення ліпідів, антиоксидантного захисту у щурів з

експериментальним токсичним гепатитом;

у роботах [5, 18] – визначення складу кріоекстрактів з ембріонів курей;

у роботах [12, 19] – гістоморфологічне дослідження впливу кріоекстрактів з ембріонів курей та визначення їх впливу на щурів з експериментальним токсичним гепатитом;

у роботі [13] – розробка способу отримання екстракту та кріоекстрактів з ембріонів курей та визначення їх впливу на експериментальних тварин;

**Апробація результатів дисертації.** Основні положення дисертаційної роботи повідомлені та обговорені на науковій конференції з міжнародною участю, присвяченій 90-річчю НАН України та 10-річчю кафедри ЮНЕСКО з кріобіології «Нові кріобіотехнології для вирішення фундаментальних і прикладних задач медицини» (Харків, 2008р.); на науковому семінарі «Актуальні проблеми кріобіотехнології в ветеринарній медицині та біології» (Харків, 2009); на звітній науково-практичній та науково-методичній конференції за результатами наукової діяльності вчених факультету ветеринарної медицини ХДЗВА за 2008-2009рр., присвяченій 125-річному ювілею кафедри гігієни тварин та ветеринарної санітарії та основи наукової школи зоогігієністів «Нові досягнення та перспективи розвитку ветеринарної медицини» (Харків, 2009); на IV міжнародній конференції молодих вчених «Біорізноманіття. Екологія. Адаптація. Еволюція», присвяченій 180-річчю з дня народження видатного фізіолога І.М. Сеченова (Одеса, 2009); на щорічній конференції молодих вчених «Холод в біології та медицині - 2010: Актуальні проблеми кріобіології, трансплантології та біотехнології» (Харків, 2010); на всеукраїнській науково-практичній конференції студентів та молодих вчених «Актуальні питання створення нових лікарських засобів» (Харків, 2010); на міжнародній науковій конференції студентів та молодих вчених «Актуальні питання сучасної медицини» (Харків, 2012); на міжнародній науково-практичній конференції «Сучасні чинники розвитку медичних наук» (Львів, 2012); на міжнародній науково-практичній конференції «Способи захисту та збереження здоров'я людини в сучасних умовах» (Одеса, 2012); на міжнародній науково-практичній конференції «Досягнення медичної науки як чинник стабільності розвитку медичної практики» (Дніпропетровськ, 2013); на III міжнародній науковій конференції студентів, аспірантів та молодих вчених «Фундаментальні та прикладні дослідження в біології» (Донецьк, 2014).

**Публікації.** За матеріалами дисертації опубліковано 20 наукових робіт, у тому числі 5 статей у спеціалізованих наукових виданнях, 1 закордонна публікація, 1 патент.

**Обсяг і структура дисертації.** Дисертаційна робота викладена на 139 сторінках тексту, складається з вступу, огляду літератури, розділу «Матеріали і методи досліджень», 2-х розділів з описом результатів власних досліджень, аналізу та обговорення результатів, висновків і списку цитованої літератури, який включає 238 джерел, розміщених на 25 сторінках друкованого тексту. Робота містить 20 рисунків і 22 таблиці.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

В огляді літератури наведено дані з історії розвитку тканинної та клітинної

терапії. Згадуються вчені та наукові школи, що вивчали дану наукову проблему. Приділено увагу використанню тканин фетоплацентарного комплексу для отримання біологічних препаратів. Показано, як змінювались концепції та підходи використання такої сировини відповідно до етичних норм. В огляді літератури критично проаналізовано переваги використання ембріональних тканин курей в якості сировини для отримання нових препаратів для тканинної терапії. Розглянуто проблему розвитку та поширення захворювань печінки та зазначено необхідність створення нових лікарських засобів гепатопротекторної дії.

**Матеріали та методи дослідження.** Матеріалами дослідження слугували кріоекстракт 1 (КЕ1) і кріоекстракт 2 (КЕ2) з ембріонів курей 9-ти днів розвитку, метод отримання яких розроблено в Харківській державній зооветеринарній академії на кафедрі хімії та біохімії імені професора О.В. Чечоткіна (зав. каф. д.б.н., проф. Г.Ф. Жегунов). Для отримання кріоекстрактів, ембріони курей заморожували в рідкому азоті ( $-196^{\circ}\text{C}$ ), де витримували 60 хв (КЕ1) і 30 хв (КЕ2) з подальшим розморожуванням на водяній бані ( $+37^{\circ}\text{C}$ ). Далі застосовували гомогенізацію, центрифугування та фільтрацію. (Патент України на корисну модель 85646 № у 201307028). В якості препаратів порівняння було обрано екстракт (Е), що виготовлено з нативних ембріонів курей; препарат «Карсил» (АО «Софарма», Болгарія) та препарат «Ербісол» (ТОВ «Ербіс», Україна).

Експерименти на тваринах проводили у відповідності до «Загальних принципів експериментів на тваринах» (Київ, 2001) та «Європейської конвенції з захисту хребетних тварин, що використовуються в експериментальних та інших наукових цілях» (Страсбург, 1986) на статевозрілих самицях і самцях білих нелінійних щурів, масою 180–220 г (300 шт.) та на статевозрілих самицях і самцях мишей лінії СВА, вагою 18–22 г (120 шт.).

Для визначення молекулярних мас низькомолекулярних речовин пептидної природи використовували метод високоефективної гелпроникної хроматографії (Мінаєва В.О., 2013; Столяров І.М., 2002). Якісне і кількісне визначення вмісту амінокислот у зразках кріоекстрактів з ембріонів курей проводили на хроматографі ААА-339М, жирних кислот – на газорідному хроматографі «Хром-5» (Мінаєва В.О., 2013; Столяров І.М., 2002).

Гостру токсичність екстрактів з ембріонів курей визначали при внутрішньошлунковому введенні (20 самиць та 20 самців) та при парентеральному введенні (20 самиць та 20 самців). КЕ1 та КЕ2 вводили щурам внутрішньошлунково одноразово по 4 мл на тварину, внутрішньоочеревинно – одноразово по 5 мл на тварину. Хронічну токсичність КЕ1 та КЕ2 вивчали в динаміці протягом 30 діб при щоденному внутрішньом'язовому введенні 30 білим статевозрілим щурам обох статей по 2 мл/кг (Стефанов О.В., 2001; Хабриев Р.У., 2005). Доза введення екстрактів була встановлена попередніми скринінговими дослідженнями.

Біологічну активність КЕ1 та КЕ2 перевіряли на моделі експериментального токсичного гепатиту у щурів у відповідності до методичних рекомендацій (Стефанов О.В., 2001). Гострий гепатит у щурів моделювали введенням тетрахлорметану ( $\text{CCl}_4$ ) у вигляді 50% олійного розчину в дозі 1 мл/100 г маси тіла внутрішньошлунково. Хронічний гепатит викликали введенням етанолу та

тетрахлорметану щурам протягом 4 діб за наступною схемою: 1 – 50% олійний розчин тетрахлорметану підшкірно в дозі 0,4 мл/100 г маси тіла; 2 – через 3 години внутрішньошлунково 40% розчин етанолу в дозі 1,3 мл/100 г маси тіла (Стефанов О.В., 2001).

Проводили наступні біохімічні дослідження: визначення активності аланінамінотрансферази (АлАТ) та аспартатамінотрансферази (АсАТ) за методом Райтмана-Френкеля (Вяткин П., 2013; Тица Н.У., 1997); вмісту глюкози в сироватці крові глюкозооксидазним методом (Вяткин П., 2013; Тица Н.У., 1997); вмісту альбуміну і загального білку в сироватці крові експериментальних щурів біуретовим методом (Балябіна М.Д., 2006); креатиніну в сироватці крові кінетичним методом (Тица Н.У., 1997); сечовини в плазмі крові щурів діацилмонооксимним методом (Тица Н.У., 1997; Семиколонова Н.А., 2005); вмісту дієнових кон'югатів (ДК), маленового діальдегіду (МДА) та відновленого глутатіону (GS-H) в гомогенатах печінки тварин (Семиколонова Н.А., 2005; Гаврилов В.Б., 1988). Всі дослідження проводили за допомогою наборів реактивів «Фелісит» (ТОВ НВП «Фелісит-Діагностика», Україна).

Гістологічне дослідження печінки і селезінки щурів з експериментальним гепатитом проводили за (Быков В.Л., 2002). Готові препарати досліджували з використанням методу світлової мікроскопії (мікроскоп CARL ZEISS JENA) (Быков В.Л., 2002).

Лейкопенію у лабораторних тварин моделювали шляхом введення гідрокортизону ацетату в дозі 2 мг/кг. Підрахунок кількості лейкоцитів і аналіз лейкоцитарної формули проводили на мазках, забарвлених азур II-еозином за Романовським-Гімза, по полях зору на 100 клітин у світловому мікроскопі (CARL ZEISS JENA об.  $\times 100$ , ок.  $\times 10$ ). Кров для дослідження брали з хвостової вени тварин (Сахаров П.П., 1952).

Результати експериментів піддавали статистичній обробці методом Манна-Уїтні (Иванов И.Ю., 1990; Лапач С.М., 2001; Реброва О.Ю., 2006), при використанні яких був прийнятий рівень значущості  $p \leq 0,05$ . Для проведення математичних розрахунків використовували стандартний пакет статистичних програм Statistica 6.0.

### **Результати власних досліджень та їх обговорення.**

**Дослідження складу кріоекстрактів з ембріонів курей.** При дослідженні вмісту білкових фракцій в кріоекстрактах встановлено, що їх хроматографічний профіль містить 9 основних піків молекулярною масою від  $(0,530 \pm 0,10)$  кДа до  $(5,620 \pm 1,0)$  кДа. За складом Е, KE1 та KE2 мають 7 однакових фракцій. Додатково Е містить фракцію з масою  $(1,320 \pm 0,3)$  кДа (2,42%); а KE1 та KE2 – фракції з молекулярною масою  $(1,740 \pm 0,30)$  кДа (1,04% та 0,78% відповідно). Встановлено, що молекулярні маси фракцій KE1 та KE2 більші, ніж в Е (табл. 1). Підвищення молекулярних мас виявлених речовин може бути пов'язано з тим, що під час заморожування-відігріву відбувається руйнація клітинних оболонки, що призводить до більшого вивільнення біологічних субстанцій.

Відсотковий вміст низькомолекулярних фракцій в досліджуваних екстрактах розподілено наступним чином: 40,5% в KE1; 30,7% в KE2; 29,6% в Е. В отриманих



екстрактах з ембріонів курей переважає фракція з масою ( $5,460 \pm 1,0$ ) кДа – ( $5,710 \pm 1,0$ ) кДа. Вміст цих речовин становить 11,29% для KE1; 6,7% для KE2 та 5,9% для E.

Таблиця 1

Молекулярні маси та відсотковий вміст низькомолекулярних фракцій, що містяться в кріоекстрактах ( $M \pm m$ ,  $n=5$ )

№ з/п	Молекулярні маси фракцій екстрактів з ембріонів курей, кДа			Відсотковий вміст фракцій екстрактів з ембріонів курей, %		
	E	KE1	KE2	E	KE1	KE2
1	$5,460 \pm 1,0$	$5,710 \pm 1,0$	$5,650 \pm 1,0$	5,9	11,29	6,7
2	$3,540 \pm 0,80$	$3,710 \pm 0,80$	$3,620 \pm 0,80$	5,23	8,62	5,48
3	-	$1,740 \pm 0,30$	$1,710 \pm 0,30$	-	1,04	0,78
4	$1,610 \pm 0,60$	$1,400 \pm 0,60$	$1,320 \pm 0,60$	1,99	1,86	2,13
5	$1,320 \pm 0,30$	-	-	2,42	-	-
6	$1,130 \pm 0,30$	$1,210 \pm 0,30$	$1,200 \pm 0,30$	4,3	5,96	4,91
7	$0,840 \pm 0,20$	$0,880 \pm 0,20$	$0,860 \pm 0,20$	9,58	11,41	10,47
8	$0,650 \pm 0,10$	$0,670 \pm 0,10$	$0,650 \pm 0,10$	0,001	0,003	0,001
9	$0,520 \pm 0,10$	$0,540 \pm 0,10$	$0,520 \pm 0,10$	0,17	0,35	0,197

Результати аналізу кількісного та якісного вмісту амінокислот в кріоекстрактах представлено на рис. 1.

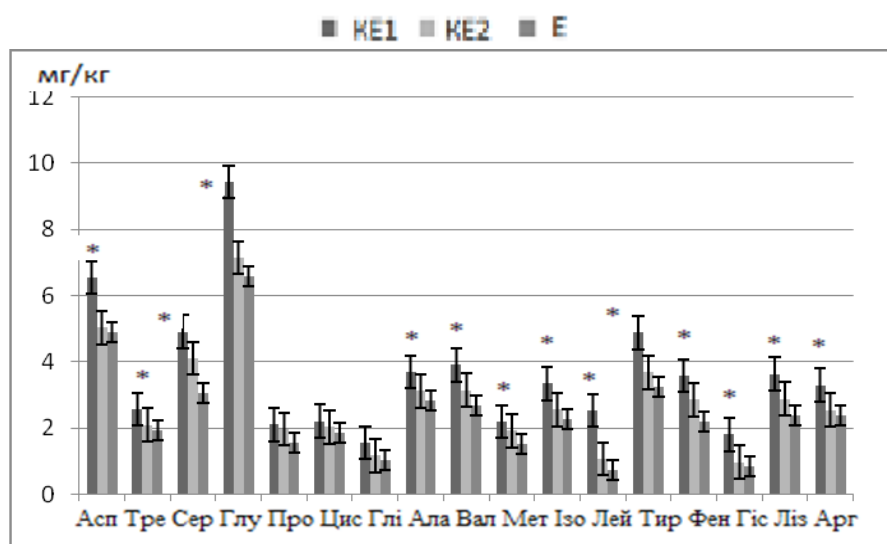


Рис. 1. Якісний та кількісний вміст амінокислот в кріоекстрактах з ембріонів курей у порівнянні з екстрактом з нативних ембріонів, ( $M \pm m$ ,  $n=5$ ). \* – відмінності статистично достовірні порівняно з E,  $p < 0,05$ .

Встановлено, що якісний склад амінокислот KE1 та KE2 та E є однаковим. В екстрактах з ембріонів курей містяться незамінні (треонін, валін, метіонін, ізолейцин, лейцин, фенілаланін, лізин), напівзамінні (тірозин, гістидин, аргінін) та замінні амінокислоти. Кількісний вміст амінокислот в KE1 та KE2 дещо більший, ніж в E. Це, можливо, пов'язано з тим, що в процесі заморожування деякі клітинні органели руйнуються, відбувається вивільнення біологічно активних речовин: чим більше був час експозиції вихідного матеріалу при температурі  $-196^{\circ}\text{C}$ , тим більше речовин вивільнялося в отриманий препарат.

У найбільшій кількості в складі екстрактів з ембріонів курей, що досліджували, містилися глутамін ( $9,43 \pm 0,008$  мг/кг для KE1;  $7,15 \pm 0,006$  мг/кг для KE2 та  $6,59 \pm 0,001$  мг/кг для E), аспарагінова кислота ( $6,54 \pm 0,005$  мг/кг для KE1;  $5,03 \pm 0,004$  мг/кг для KE2 та  $4,88 \pm 0,005$  мг/кг для E), серин ( $4,91 \pm 0,003$  мг/кг для KE1;  $4,11 \pm 0,003$  мг/кг для KE2 та  $3,05 \pm 0,003$  мг/кг для E) і лейцин ( $4,88 \pm 0,005$  мг/кг для KE1;  $3,68 \pm 0,004$  мг/кг для KE2 та  $0,73 \pm 0,001$  мг/кг для E).

Результати дослідження жирнокислотного складу екстрактів з ембріонів курей наведено на рис. 2.

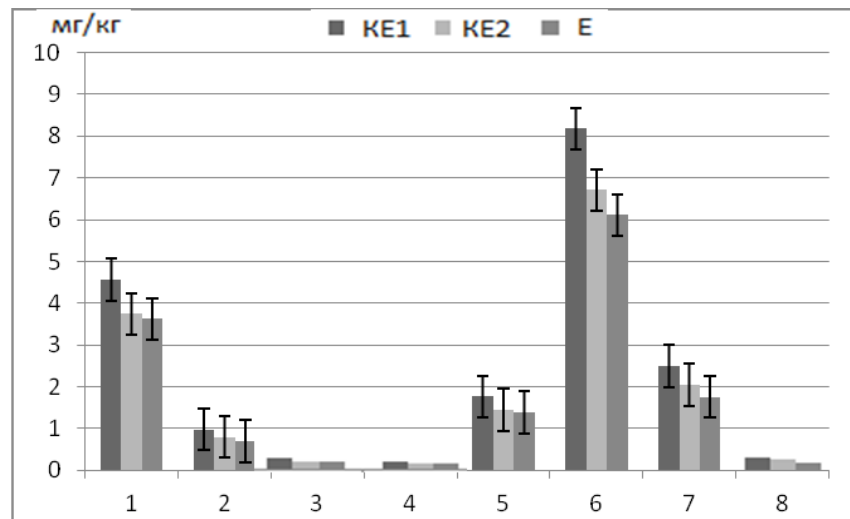


Рис 2. Якісний та кількісний вміст жирних кислот в кріоекстрактах з ембріонів курей у порівнянні з екстрактом з нативних ембріонів, ( $M \pm m$ ,  $n=5$ ). Визначені кислоти: 1 – пальмітинова; 2 – пальмітолеїнова; 3 – маргарінова; 4 – гептадеценава; 5 – стеаринова; 6 – олеїнова; 7 – ліноленова; 8 – арахідонова.

У складі KE1, KE2 та E було виділено 8 жирних кислот. Показано, що кількісний вміст жирних кислот в KE1 та KE2 вищий, ніж в E. В найбільшій кількості визначалися олеїнова ( $8,18 \pm 0,007$  мг/кг для KE1,  $6,71 \pm 0,007$  мг/кг для KE2 та  $6,11 \pm 0,006$  мг/кг для E), пальмітинова ( $4,56 \pm 0,005$  мг/кг для KE1,  $3,74 \pm 0,004$  мг/кг для KE2 та  $3,62 \pm 0,004$  мг/кг для E), лінолева ( $2,49 \pm 0,005$  мг/кг для KE1,  $2,04 \pm 0,001$  мг/кг для KE2 та  $1,75 \pm 0,001$  мг/кг для E) та стеаринова кислоти ( $1,76 \pm 0,002$  мг/кг для KE1,  $1,44 \pm 0,001$  мг/кг для KE2 та  $1,38 \pm 0,001$  мг/кг для E).

Таким чином, отримані дані свідчать, що кріоекстракти та екстракти з ембріонів курей у достатньо великій кількості містять низькомолекулярні пептиди, а також незамінні жирні кислоти та амінокислоти, які в організмі людини і тварин впливають на обмінні процеси, підтримують реологічні властивості крові,

відповідають за певні етапи кровотворення.

**Визначення гострої та хронічної токсичності кріоекстрактів з ембріонів курей.** Параметри гострої токсичності KE1, KE2 та E вивчали на білих нелінійних щурах, яким вводили досліджувані екстракти одноразово внутрішньошлунково в дозі 4 мл. За результатами дослідження було встановлено, що виживаність тварин у всіх групах склала 100%. Загальний стан, апетит, поведінка, рухова активність, стан хутра знаходились в межах норми, ознак інтоксикації виявлено не було. При спостереженні за тваринами, що отримували KE1; KE2 та E внутрішньошлунково в дозі 4 мл 4 рази на добу (16 мл на добу) встановлено, що виживаність щурів склала 100% у кожній групі, загальний стан, апетит у тварин не змінювалися.

Для подальшого вивчення гострої токсичності KE1, KE2 та E було обрано парентеральний шлях введення, а саме внутрішньоочеревиний в дозі 5 мл. Показано, що одноразове внутрішньоочеревине введення щурам KE1, KE2 та E не викликало ознак інтоксикації; такі показники, як рухова активність, апетит, стан хутра щурів, що отримували екстракти з ембріонів курей, не змінювалися та відповідали фізіологічній нормі. Загибелі тварин не спостерігали в жодній експериментальній групі.

Визначення хронічної токсичності KE1, KE2 та E вивчали в динаміці протягом 30 діб при введенні екстрактів в дозі 2 мл/кг. Результати спостереження за загальним станом і поведінкою тварин, показали, що щури добре переносили щоденне введення KE1, KE2 та E протягом місяця. При однакових умовах утримання та режиму харчування щурів контрольної та дослідних груп приріст загальної маси тіла експериментальних щурів відповідав фізіологічній нормі. Маса печінки, селезінки, серця та нирок щурів обох статей збільшувалися в межах пропорційної норми. Патологічного збільшення органів не спостерігалось, що свідчить про відсутність токсичного впливу KE1, KE2 та E на експериментальних тварин.

Для підтвердження відсутності токсичного впливу екстрактів, що досліджували, на організм лабораторних тварин, визначали біохімічні показники крові щурів після щоденного введення KE1, KE2 та E протягом 30 днів в дозі 2 мл/кг. Білоксинтетичну функцію печінки експериментальних щурів оцінювали за кількісним вмістом загального білка, альбуміну та глюкози в сироватці крові. Ферментсинтетичну функцію печінки оцінювали за активністю АлАТ та АсАТ. Стан нирок експериментальних щурів, яким протягом 30 діб вводили KE1, KE2 та E, оцінювали за рівнем сечовини та креатиніну (табл. 2).

Активність індикаторних ферментів не перевищувала показники для контрольної групи тварин і відповідала фізіологічній нормі. Аналіз кількісного вмісту загального білка та альбуміну в експериментальних групах показав відсутність статистично достовірної різниці порівняно з інтактним контролем (ІК). Дослідження вмісту глюкози в крові не виявило статистично достовірної різниці між показниками групи ІК та експериментальних груп щурів. Зазначені дані свідчать про відсутність негативного впливу KE1, KE2 та E на ферментсинтетичну функцію печінки та вуглеводний обмін в організмі тварин. Встановлено, що щоденне введення KE1, KE2 та E щурам не викликало статистично значимих відхилень рівня сечовини та креатиніну у тварин експериментальних груп

порівняно з тваринами групи ІК. Це вказує на те, що білок-синтетичну функцію печінки та азотовидільну функцію нирок експериментальних щурів не порушено. Кількість лейкоцитів у тварин експериментальних груп залишалась в межах норми. Не спостерігалось також змін лейкоцитарної формули крові лабораторних тварин. Після тривалого введення KE1, KE2 та E (протягом 30 діб) не спостерігали жодного токсичного впливу на тварин.

Таблиця 2

Вплив кріоекстрактів з ембріонів курей на біохімічні показники сироватки крові щурів після 30 діб застосування ( $M \pm m$ )

Показники	Група експерименту	Стать тварин	
		Самиці	Самці
Загальний білок, г/л	ІК (n=5)	67,87±6,91	71,62±6,93
Альбумін, г/л		29,90±2,94	32,70±3,21
Глюкоза, ммоль/л		5,61±0,53	5,84±0,57
АсАТ, ммоль/год мл		0,68±0,07	0,74±0,06
АлАТ, ммоль/гд мл		0,59±0,06	0,61±0,05
Сечовина, ммоль/л		7,50±0,08	7,72±0,80
Креатинін, ммоль/л		63,00±6,81	69,42±7,10
Загальний білок, г/л	KE1 (n=5)	71,76±2,73*	75,86±3,15
Альбумін, г/л		30,20±0,77	28,93±1,40
Глюкоза, ммоль/л		5,33±0,36	5,69±0,35
АсАТ, ммоль/год мл		0,68±0,03	0,73±0,02
АлАТ, ммоль/год мл		0,56±0,03	0,52±0,05
Сечовина, ммоль/л		7,66±0,54	7,74±0,57
Креатинін, ммоль/л		67,13±5,04*	72,42±4,53
Загальний білок, г/л	KE2 (n=5)	72,23±3,01	76,45±3,22*
Альбумін, г/л		31,40±0,95	29,51±1,68
Глюкоза, ммоль/л		5,71±0,74	5,88±0,55
АсАТ, ммоль/год мл		0,71±0,04	0,78±0,03
АлАТ, ммоль/год мл		0,58±0,03	0,61±0,05
Сечовина, ммоль/л		7,68±0,54	7,73±0,55
Креатинін, ммоль/л		68,92±4,10*	73,30±5,40*
Загальний білок, г/л	E (n=5)	68,03±2,20	73,00±3,02
Альбумін, г/л		30,08±1,57	33,49±2,23
Глюкоза, ммоль/л		5,53±0,28	6,01±0,37*
АсАТ, ммоль/год мл		0,71±0,04	0,73±0,02
АлАТ, ммоль/год мл		0,58±0,06	0,60±0,04
Сечовина, ммоль/л		7,60±0,54	7,73±0,34
Креатинін, ммоль/л		64,27±5,20	72,44±4,65*

Примітки: n – кількість тварин в експериментальних групах; \* – відмінності статистично достовірні порівняно з ІК,  $p < 0,05$ .

Таким чином, можна вважати, що кріоекстракти з ембріонів курей є безпечними та відносно нешкідливими речовинами у відповідності до існуючої

класифікації.

### Дослідження біологічної дії кріоекстрактів з ембріонів курей на моделі гострого гепатиту, викликаного тетрахлоретаном

Гостре отруєння тетрахлоретаном викликало у щурів групи контрольної патології (КП) значні зміни біохімічних показників, характерних для даної патології. Пряма дія гепатотоксину викликала розвиток цитолізу гепатоцитів. На це вказує достовірне підвищення рівня ферментів АлАТ та АсАТ у сироватці крові в 2,9 та 2,2 рази відповідно. Достовірним, відносно групи ІК, було підвищення ДК (з  $(3,95 \pm 0,81)$  ммоль/г до  $(7,63 \pm 0,55)$  ммоль/г) та ТБК АП (з  $(93,28 \pm 9,58)$  ммоль/г до  $(179,26 \pm 32,86)$  ммоль/г), а також зменшення рівня G-SH (з  $(26,90 \pm 1,03)$  у.о. до  $(11,78 \pm 1,68)$  у.о.). Отримані дані свідчать про інтенсивний розвиток патології у щурів. У групі КП виживаність складала 60%. У тварин, що вижили, було відмічено зниження маси тіла (з  $(208 \pm 5,11)$  г до  $(198 \pm 2,36)$  г); збільшення маси печінки (з  $(6,55 \pm 0,14)$  г до  $11,2 \pm 0,5$  г), що свідчило про набрякання органу.

У групі тварин, що отримували KE1 в дозі 2 мл/кг маси тіла, виживаність тварин склала 91%. Маса тіла щурів з експериментальним гепатитом зменшувалась на 0,5%, а маса печінки складала  $(7,10 \pm 0,25)$  г, що достовірно відрізняється від таких показників у щурів групи контрольної патології.

При введенні щурам з експериментальним гепатитом KE2 в дозі 2 мл/кг маси тіла визначено, що виживаність тварин в групі становила 83%, маса тіла зменшилась лише на 1,5%, а маса печінки складала  $(7,13 \pm 0,34)$  г (рис. 3). Ці показники достовірно відрізнялися від таких у тварин груп ІК та КП.

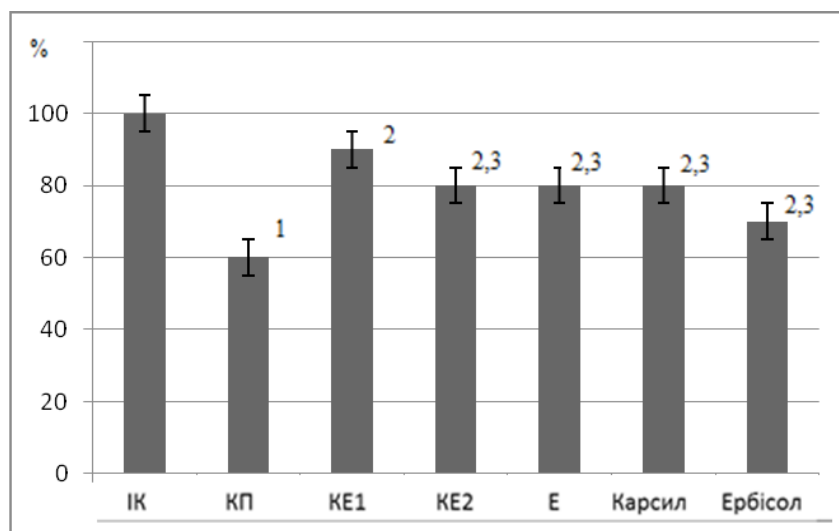


Рис. 3. Виживаність щурів в умовах гострого тетрахлорметанового гепатиту та після введення кріоекстрактів з ембріонів курей та препаратів порівняння, ( $M \pm m$ ,  $n=5$ ). 1 – відмінності статистично достовірні порівняно з ІК,  $p < 0,05$ ; 2 – відмінності статистично достовірні порівняно з КП,  $p < 0,05$ ; 3 – відмінності статистично достовірні порівняно з KE1,  $p < 0,05$ .

Введення експериментальним тваринам Е в кількості 2 мл/кг маси тіла знижувало масу печінки від  $(11,2 \pm 0,5)$  г (показник в групі КП) до  $(7,92 \pm 0,34)$  г. Виживаність щурів даної групи становила 80%.

При введенні щурам препарату «Карсил» в рекомендованій для нього дозі 25,2 мг/кг, маса тіла експериментальних тварин зменшувалась на 2%, маса печінки становила (8,10±0,46) г, виживаність складала 80%.

Після введення щурам з гострим експериментальним гепатитом препарату «Ербісол» в дозі 2 мл/кг маси тіла тварин знижувалась на 3,5%, при цьому маса печінки складала (9,83±0,38) г. В даній експериментальній групі вижило 70% тварин.

Застосування кріоекстрактів (КЕ1 і КЕ2) і екстракту (Е) з ембріонів курей в дозах 2 мл/кг призводило до зменшення активності ферментів АлАТ і АсАТ відносно груп контрольної патології (рис. 4).

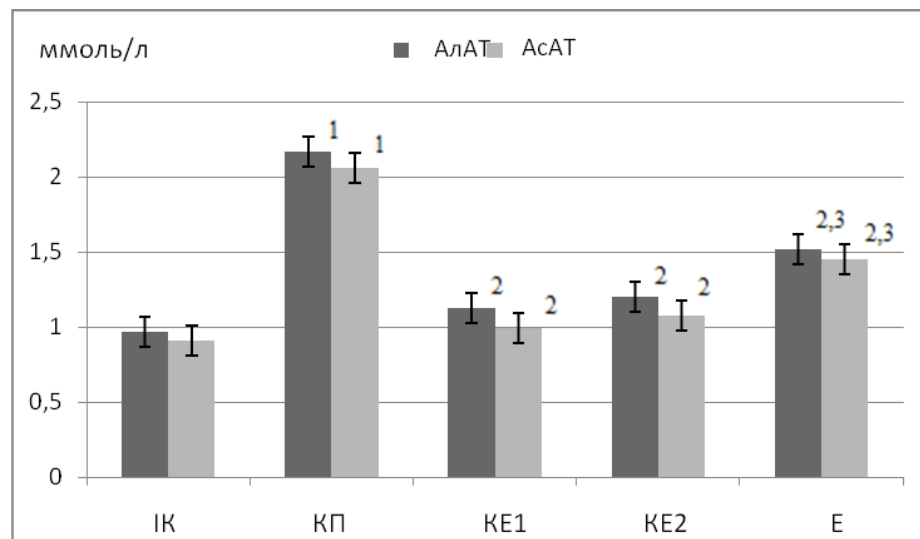


Рис. 4. Вплив кріоекстрактів з ембріонів курей на активність амінотрансфераз в сироватці крові експериментальних щурів з гострим токсичним гепатитом, ( $M \pm m$ ,  $n=5$ ). 1 – відмінності статистично достовірні порівняно з ІК,  $p < 0,05$ ; 2 – відмінності статистично достовірні порівняно з КП,  $p < 0,05$ ; 3 – відмінності статистично достовірні порівняно з КЕ1 і КЕ2,  $p < 0,05$ .

Введення КЕ2 та КЕ1 також призводило до зменшення рівня показників перекисного окиснення ліпідів. Рівень ДК зменшувався з (7,63±0,5) ммоль/г у групі КП до (4,86±0,42) ммоль/г для КЕ1 і (5,12±0,14) ммоль/г для КЕ2. Рівень ТБК АП, порівняно з групою КП, зменшувався до (102,44±10,0) ммоль/г у тварин, які отримували КЕ1 і до (105,23±10,3) ммоль/г у тварин, які отримували КЕ2 (табл. 3).

Рівень G-SH підвищувався до (23,01±1,5) у.о. (КЕ1) і до (21,18±1,2) у.о. (КЕ2) у порівнянні з групою КП (11,78±1,68 у.о.), але не сягав рівня норми. Це може бути пояснено гострим перебігом патології та неспроможністю екстрактів з ембріонів курей у вказаних дозах в короткий термін повністю відновити ушкоджений орган за умов його тяжкого ураження.

Препарати порівняння («Ербісол» і «Карсил») також позитивно впливали на зазначені біохімічні показники крові лабораторних щурів з експериментальним гепатитом, але менш інтенсивно, ніж кріоекстракти (КЕ1 і КЕ2) і екстракт (Е).

Вплив кріоекстрактів на рівень показників перекисного окиснення ліпідів у щурів з гострим тетрахлорметановим гепатитом ( $M \pm m$ )

Група експерименту	Показники		
	ДК, ммоль/г	ТБК АП, ммоль/г	G-SH, у.о.
ІК (n=10)	3,95±0,81	93,28±9,58	26,90±1,03
КП (n=10)	7,63±0,5	179,26±32,86	11,78±1,68
КЕ1, 2 мл/кг (n=10)	4,86±0,42*	102,44±10,0*	23,01±1,5*
КЕ2, 2 мл/кг (n=10)	5,12±0,14*	105,23±10,3*	21,18±1,2*
Е, 2 мл/кг (n=10)	5,53±0,24	132,17±12,89	20,12±1,45*
«Ербісол», 2 мл/кг (n=10)	6,63±0,47	162,17±22,12	12,99±1,57
«Карсил», 25,2 мг/кг (n=10)	6,10±0,36	157,18±11,54	15,17±1,56

Примітки: n – кількість тварин в експериментальних групах; \* – відмінності статистично достовірні порівняно з КП,  $p < 0,05$ .

Аналіз результатів, отриманих при дослідженні біологічної дії досліджуваних кріоекстрактів на моделі гострого токсичного гепатиту у щурів, вказує на те, що найбільш висока активність була у кріоекстракта 1 (КЕ1) у порівнянні з КЕ2, тому, для подальших досліджень було обрано КЕ1.

**Дослідження впливу кріоекстракту з ембріонів курей на процеси цитолізу, перекисного окиснення ліпідів та антиоксидантного захисту в умовах хронічного експериментального гепатиту**

На другому етапі досліджень доцільним було вивчити біологічну активність КЕ1 на моделі хронічного гепатиту щурів (60 тварин обох статей), викликаного введенням тетрахлорметану та етанолу. КЕ1 вводили тваринам в дозі 2 мл/кг маси тіла. В якості препаратів порівняння використовували Е (2 мл/кг) та препарати «Карсил» та «Ербісол» у рекомендованих для них дозах.

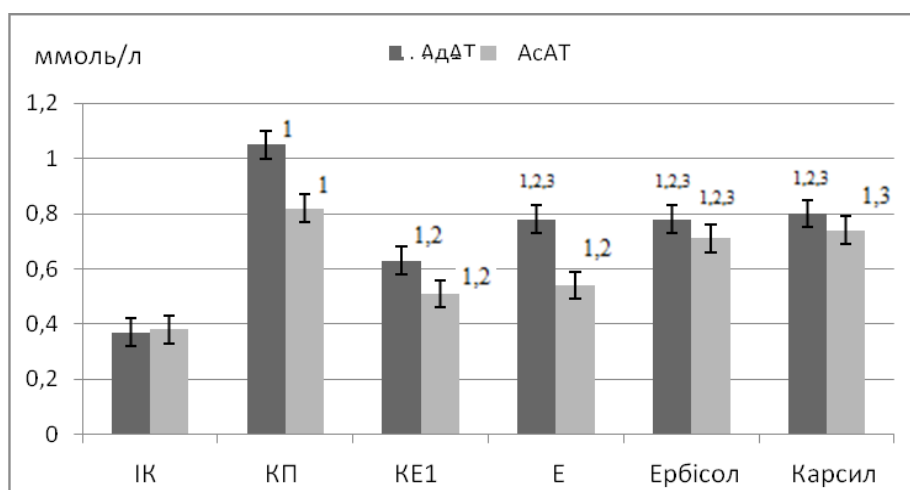


Рис. 5. Вплив кріоекстракту та препаратів порівняння на активність амінотрансфераз в сироватці крові щурів з хронічним токсичним гепатитом, ( $M \pm m$ ,  $n=5$ ). 1 – відмінності статистично достовірні порівняно з ІК,  $p < 0,05$ ; 2 – відмінності статистично достовірні порівняно з КП,  $p < 0,05$ ; 3 – відмінності статистично достовірні порівняно з КЕ1,  $p < 0,05$ .

Дані експерименту свідчать про те, що КЕ1 в дозі 2 мл/кг та препарати



порівняння Е в дозі 2 мл/кг, «Карсил» в дозі 25,2 мг/кг та «Ербісол» в дозі 2 мл/кг позитивно впливають на печінку щурів на тлі хронічного гепатиту, що викликаний введенням тетрахлорметану та етанолу. Маса тіла тварин на 8-му добу експерименту відповідала масі інтактних тварин, в той час, як маса тіла щурів групи КП знизилась на 5%.

Аналіз результатів застосування KE1, у порівнянні з Е, Карсилом та Ербісолом показав різний рівень антицитолітичної дії (рис. 5).

На 8-му добу спостереження зафіксовано зниження активності ферменту АЛАТ в 1,3 рази для Е, Ербісолу і Карсилу та в 1,7 разів для KE1. Спостерігали зниження активності АсАТ в експериментальних групах: в 1,5 разів для Е; в 1,6 разів для KE1; в 1,1 разів для Карсилу та в 1,2 рази для Ербісолу.

KE1 достовірно по відношенню до групи контрольної патології знижував рівень кінцевих продуктів ПОЛ (ТБК АП) в печінці щурів, що вказує на виражені антиоксидантні властивості кріоекстрактів з ембріонів курей і на їх перевагу над препаратами порівняння Ербісолом та Карсилом. Також в гомогенатах печінки експериментальних тварин спостерігали зниження вмісту ДК. Під впливом KE1 в дозі 2 мл/кг спостерігали стимуляцію функції антиоксидантного захисту організму тварин, про що свідчить достовірне збільшення в гомогенатах печінки рівня важливого компоненту цієї системи – відновленого глутатіону (G-SH). Вказані зміни свідчать про можливу здатність KE1 на різних рівнях пригнічувати процеси ПОЛ і гальмувати процеси вільного радикального окислення (табл. 4).

Таблиця 4

Вплив кріоекстракту на рівень показників перекисного окиснення ліпідів у щурів з хронічним гепатитом (M±m)

Група експерименту	Показники		
	ДК, кмоль/г	ТБК АП, ммоль/г	G-SH, у.о.
ІК (n=10)	3,93±0,84	92,96±10,49	26,97±1,06
КП (n=10)	7,92±0,62	181,63±36,91	12,93±1,45
KE1, 2 мл/кг (n=10)	4,34±1,17*	119,66±21,11*	34,49±9,00*
Е, 2 мл/кг (n=10)	4,12±0,96*	117,53±20,49*	32,15±8,54*
«Ербісол», 2 мл/кг n=10)	5,18±0,57	187,77±27,23	20,57±6.14
«Карсил», 25,2 мг/кг (n=10)	5,79±0,88	201,94±29,24	18,14±5,09

Примітки: n – кількість тварин в експериментальних групах; \* – відмінності статистично достовірні порівняно з КП, p< 0,05.

Зазначені вище результати свідчать про те, що в умовах хронічного токсичного гепатиту KE1 в дозі 2 мл/кг проявляє антицитолітичні і антиоксидантні властивості.

**Деструктивно-дистрофічні і репаративні процеси в печінці щурів з хронічним експериментальним гепатитом після введення кріоекстрактів з ембріонів курей.**

Мікроскопічне дослідження печінки інтактних щурів виявило нормальну будову печінкової тканини, що виражається в правильній



організації печінкових часточок, регулярній трабекулярній будові паренхіми печінки, правильній організації і нормальному діаметрі капілярів синусоїдного типу (рис. 6, а).

У контрольній групі щурів з експериментальним гепатитом на 8-му добу експерименту (після припинення хронічної інтоксикації) спостерігалася зміна архітекτονіки печінки: визначалось як часткове, так і повне порушення часточкової будови печінки; відсутність регулярної трабекулярної будови паренхіми (рис. 6, б). Хід трабекул був безладним, виявлялися дистрофічно-некротичні зміни гепатоцитів. На периферії часточок зустрічалися гіпертрофовані клітини з великими поліморфними ядрами і добре вираженими ядерцями. Жирова дистрофія виявлялася в зонах з менш вираженим некрозом.

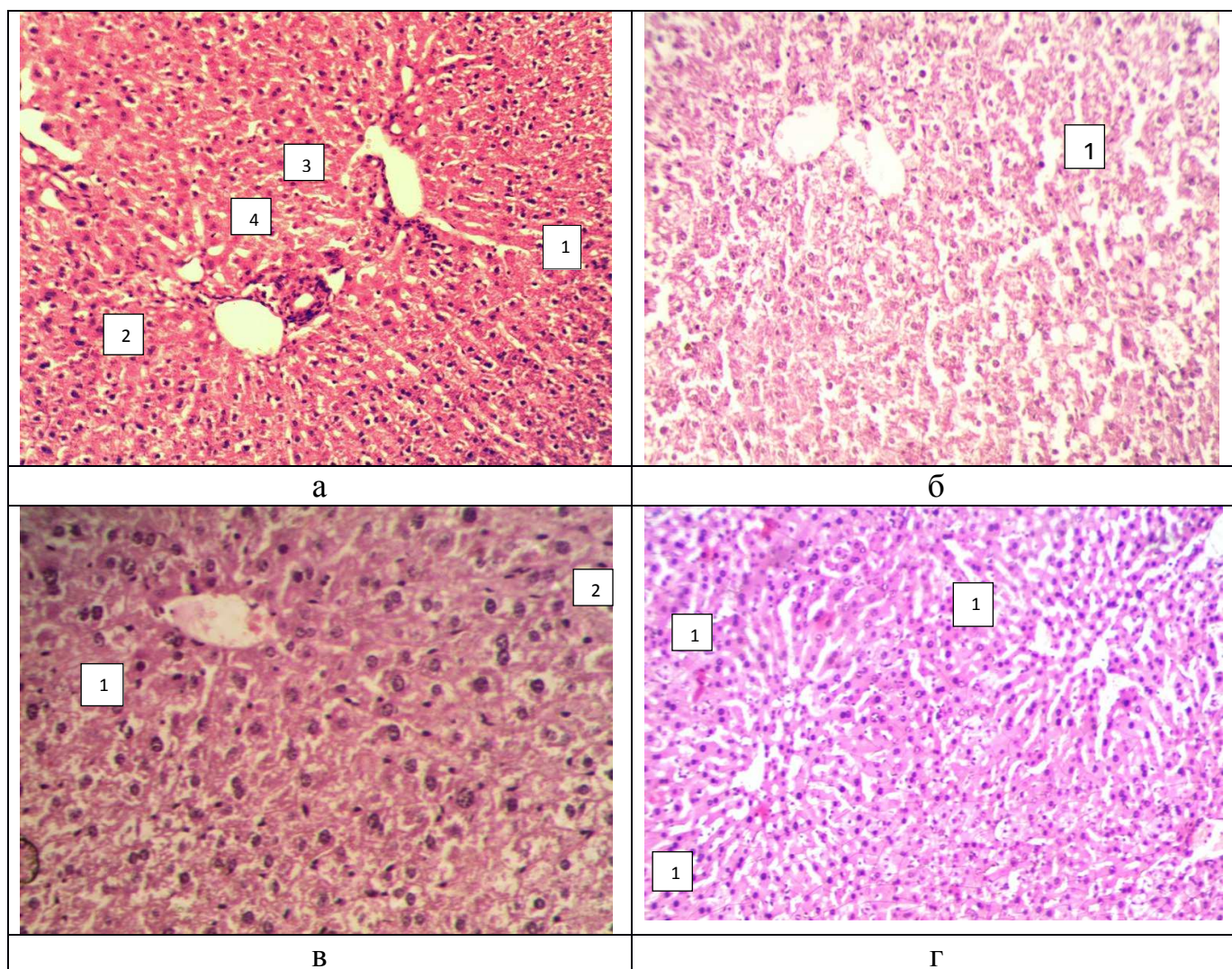


Рис. 6 Мікропрепарати печінки щурів: а – норма (1 – регулярна трабекулярна будова; 2 – вена; 3 – артерія; 4 – жовчний проток.); б – хронічний токсичний гепатит (1 – організація синусоїдів не визначається); в – печінка щура з хронічним гепатитом на 8-му добу після введення KE1 (1 – помірно дилатована центральна вена; 2 – дистрофічно змінені гепатоцити.); г – печінка щура з хронічним гепатитом на 8-му добу після введення Е (1 – відновлення трабекулярної будови). Забарвлення гематоксиліном і еозином, (ок.×10, об.×20).

Гістологічне дослідження в групі тварин, яким на тлі токсичного

гепатиту вводили KE1, на 8-му добу застосування препарату виявило ознаки нормалізації будови печінкової тканини. З боку печінкової паренхіми спостерігалися регенеративні прояви, які виражалися гіпертрофією гепатоцитів, поліплоїдизацією їх ядер, збільшенням числа двоядерних клітин. Спостерігалися великі клітини з добре забарвленою цитоплазмою, великими ядрами, іноді – з двома ядрами. Трабекулярна будова в збережених часточках печінки починає відновлюватися (рис. 6, в).

Гістологічне дослідження в групі щурів з експериментальним токсичним гепатитом, яким вводили E, виявило слабкі ознаки нормалізації будови печінкової тканини. Вони виражалися в організації печінкових часточок, збільшенні числа синусоїдів і помірно дилатованими судинами венозного типу, відновленні регулярної трабекулярної будови паренхіми печінки за рахунок утворення трабекул з масово проліферуючих гепатоцитів, а також в тенденції до правильної організації капілярів синусоїдного типу (рис. 6, г).

Моделювання токсичного гепатиту у щурів призводить також і до змін в структурі селезінки тварин. При оцінюванні гістологічних зрізів селезінки тварин з хронічним гепатитом (8-ма доба експерименту), було встановлено, що капсула органу дещо потовщена і частково розшарована. Сполучна тканина трабекул і підкапсулярних трабекул також потовщена. Місцями спостерігаються капсули клітини мезотелію, що виступають над поверхнею.

Дослідження морфологічної структури селезінки тварин, яким вводили KE1, виявило тенденцію до зменшення білої пульпи, відзначено зменшення щільності лімфоцитів в періартеріальній, маргінальних і центральних зонах фолікулів в порівнянні з контролем. Встановлено збільшення кількості мегакаріоцитів, що свідчить про компенсаторну реакцію організму. Після введення експериментальним тваринам E, капсула органу була розшарована і в ній добре диференціювалися клітини мезотелію. У пульпі селезінок визначалися, в основному, незначно гіперплазовані лімфоїдні фолікули.

За результатами гістоморфологічного вивчення печінки і селезінки експериментальних щурів, встановлено, що введення KE1 стимулює репараційні процеси в печінці і селезінці тварин і, як наслідок, прискорює структурно-функціональне відновлення органів.

При аналізі гістологічних зрізів селезінок щурів, що на тлі експериментального гепатиту отримували KE1 та препарат порівняння, було відзначено підвищення лейкопоезу та часткову міграцію клітин з селезінки в кров. Зважаючи на це, було досліджено здатність кріоекстракту з ембріонів курей впливати на лейкопоез. Дослідження проводили на статевозрілих самицях мишей лінії СВА. У мишей моделювали лейкопенію шляхом введення гідрокортизону ацетату (ГА) в дозі 2 мл/кг.

У тварин, яким на тлі глюкокортикоїдної лейкопенії вводили KE1 в дозі 2 мл/кг, спостерігали відновлення кількості лейкоцитів до норми ( $1200 \pm 1100$  кл/мм<sup>3</sup>) на 5-ту добу експерименту. Після цього кількість клітин продовжувала збільшуватись до 8-мої доби експерименту ( $15450 \pm 1430$  кл/мм<sup>3</sup>). Далі число лейкоцитів зменшувалось і досягало норми на 13-ту добу. При застосуванні E в дозі 2 мл/кг, спостерігали повільне відновлення кількості лейкоцитів. Показник

сягав норми на 7-му добу ( $13900 \pm 1480$  кл/мм<sup>3</sup>).

Проведені експерименти свідчать про здатність KE1 і E ефективно і швидко відновлювати рівень лейкоцитів в крові у мишей з експериментальною лейкопенією.

## ВИСНОВКИ

Проведено теоретичне і експериментальне узагальнення і представлено новий підхід до вирішення задачі, спрямованої на пошук альтернативних джерел сировини для виготовлення біологічно активних препаратів, що застосовуються у тканинній терапії. Експериментально обґрунтовано доцільність використання у якості джерела фетальної сировини тканини ембріонів курей, розроблено спосіб отримання з цієї тканини кріоекстрактів і екстрактів, досліджено їх склад, токсичність і біологічну дію на моделі експериментального токсичного гепатиту у щурів.

1. Розроблено спосіб отримання кріоекстрактів з ембріонів курей першої третини розвитку, які заморожували у рідкому азоті з різним строком подальшої експозиції (30 хв і 60 хв) при  $-196^\circ\text{C}$ . Досліджено гостру і хронічну токсичність отриманих кріоекстрактів. Показано, що KE1 та KE2, а також E не чинять токсичного впливу на організм лабораторних тварин і відповідно до існуючої класифікації кріоекстракти можуть бути віднесені до нешкідливих речовин.

2. Дослідження вмісту білкових фракцій в кріоекстрактах показало високий вміст низькомолекулярних пептидів з молекулярною масою від 0,520 кДа до 5,710 кДа (40,5% для KE1; 30,7% для KE2 і 29,6% для E від загальної кількості речовин). В отриманих екстрактах переважає фракція з масою ( $5,460 \pm 1,0$ ) кДа — ( $5,710 \pm 1,0$ ) кДа. Вміст цих речовин становить 11,29% для KE1, 6,7% для KE2 та 5,9% для E. Визначено якісний та кількісний склад амінокислот. В найбільшій кількості в складі отриманих кріоекстрактів містилися глутамін (до ( $9,43 \pm 0,008$ ) мг/кг), аспарагінова кислота (до ( $6,54 \pm 0,005$ ) мг/кг), серин (до ( $4,91 \pm 0,003$ ) мг/кг) і лейцин (до ( $4,88 \pm 0,005$ ) мг/кг). У складі KE1, KE2 і E було виділено жирні кислоти: олеїнову (до ( $8,18 \pm 0,007$ ) мг/кг), пальмітинову (до ( $4,56 \pm 0,005$ ) мг/кг), лінолеву (до ( $2,49 \pm 0,005$ ) мг/кг) та стеаринову (до ( $1,76 \pm 0,002$ ) мг/кг).

3. Застосування кріоекстрактів з ембріонів курей у щурів з гострим експериментальним гепатитом призводило до збільшення показників їх виживаності у порівнянні з тваринами контрольної групи (від 60% до 91% для KE1 і до 80% для KE2 відповідно), сприяло нормалізації клінічних, білоксинтетичних показників, стимулювало процеси репарації ушкодженого органу. Введення KE1 і KE2 щурам з експериментальним токсичним гепатитом сприяло зниженню активності АлАТ (в 1,7 раз і 1,3 рази відповідно) та АсАТ (в 1,6 і 1,5 разів відповідно), зменшенню інтенсивності процесів пероксидації ліпідів, про що свідчить вірогідне зниження рівня ДК (до ( $4,86 \pm 0,42$ ) ммоль/г та ( $5,12 \pm 0,54$ ) ммоль/г), ТБК-активних продуктів (до ( $102,44 \pm 10,4$ ) ммоль/г та ( $105,23 \pm 10,7$ ) ммоль/г) та рівня відновленого глутатіону (до ( $23,01 \pm 2,5$ ) у.о. та ( $21,18 \pm 2,2$ ) у.о. відповідно). Встановлено, що KE1 проявляє найбільшу біологічну активність у порівнянні з KE2 і E.



4. Застосування KE1 у щурів з хронічним токсичним гепатитом сприяло відновленню біохімічних показників, а саме призвело до зниження активності АлАТ і АсаТ (в 1,7 та 1,6 разів відповідно), зниження рівня ДК (до  $(4,34 \pm 1,17)$  ммоль/г) і ТБК-активних продуктів (до  $(119,66 \pm 21,11)$  ммоль/г), підвищення рівня відновленого глутатіону (до  $(34,49 \pm 9,00)$  у.о.).

5. Показано, що введення KE1 сприяло активації відновних процесів в печінці, про що свідчить велика кількість гіпертрофованих гепатоцитів з поліплоїдизацією їх ядер. Порівняно з результатами у тварин контрольної групи, на 8 добу після введення KE1 виявлені ознаки нормалізації будови печінкової тканини, відновлення архітектоніки та нормалізації судинного русла органу, зменшення об'єму сполучної тканини. Показано позитивний вплив застосування KE1 на селезінку щурів з експериментальним гепатитом, що виражався у відновленні функції центрів лейкопоезу в органі. Встановлено, що екстракти з ембріонів курей ефективно відновлюють лейкоцити в крові лабораторних тварин після моделювання лейкопенії (від  $5300$  кл/мм<sup>3</sup> до  $14000$  кл/мм<sup>3</sup>).

6. Експериментально визначена ефективність застосування кріоекстрактів з ембріонів курей для корекції токсичного гепатиту вказує на доцільність використання даного біоматеріалу для отримання нових препаратів з метою вивчення їх складу та механізмів дії і застосування у ветеринарній та медичній практиці.

### **ПЕРЕЛІК РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ**

1. Кузнецова В.Г. Действие экстрактов из эмбриональных тканей кур на мишей с экспериментальной лейкопенией / В.Г. Кузнецова, Г.Ф. Жегунов // Проблемы криобиологии. – 2008 р. – Т.18, №3. – С. 328–331.

2. Кузнецова В.Г. Изучение иммуностимулирующего эффекта экстракта из эмбриональных тканей кур / В.Г. Кузнецова, Г.Ф. Жегунов // Вісник проблем біології та медицини. – 2009. – Вип.3. – С. 35–38.

3. Кузнецова В.Г. Влияние различных экстрактов из эмбриональных тканей кур на иммунную систему и сердце крыс / В.Г. Кузнецова, Г.Ф. Жегунов // Вісник проблем біології та медицини. – 2010. – Вип.1. – С. 56–60.

4. Тимохіна Ю.А. Антиоксидантные свойства экстракта из эмбрионов кур / Ю.А. Тимохіна, В.Г. Кузнецова // Актуальные вопросы ветеринарной биологии. – 2013. – №4 (20). – С. 17–20.

5. Кузнецова В.Г. Дослідження вмісту амінокислот та жирних кислот в екстракті з ембріонів курей / В.Г. Кузнецова, Г.Ф. Жегунов, М.С. Погоріла // Вісник проблем біології і медицини. – 2014. – Вип.4, Т.3 (115). – С.60–65.

6. Кузнецова В.Г. Дослідження впливу екстрактів з ембріонів курей на процеси цитолізу, перекисного окислення ліпідів та антиоксидантного захисту в умовах експериментального гепатиту / В.Г. Кузнецова, Г.Ф., Жегунов // Вісник проблем біології і медицини. – 2015. – Вип.2, Т.4 (121). – С. 61–64.

7. Кузнецова В.Г. Изучение иммуностимулирующей активности экстрактов из эмбрионов кур / В.Г. Кузнецова, Г.Ф. Жегунов // Проблеми зоінженерії та ветеринарної медицини. – 2009. – Т.2, Ч.2., вип. 19. – С. 116–119.

8. Кузнецова В.Г. Влияние криоекстрактів эмбрионов кур на мишей и крыс с

експериментальної лейкопенії / В.Г. Кузнецова, Г.Ф. Жегунов // Загальна патологія та патологічна фізіологія. – 2009. – Т.4, №4. – С. 64–72.

9. Кузнецова В.Г. Влияние экстрактов из эмбрионов кур на некоторые биохимические и электрокардиологические показатели лабораторных животных / В.Г. Кузнецова // Перспективи медицини та біології. – 2011. – Т.ІІІ, №1. – С. 70–75.

10. Кузнецова В.Г. Эффективность восстановления лейкоцитов у лабораторных животных с экспериментальной лейкопенией после введения экстрактов из эмбрионов кур / В.Г. Кузнецова, Г.Ф. Жегунов // Проблеми зооінженерії та ветеринарної медицини. – 2010. – Т.3, Ч.2, Вип.22. – С. 67–73.

11. Кузнецова В.Г. Влияние гидрокортизона ацетата и экстрактов из эмбрионов кур на количество лейкоцитов и лейкоцитарную формулу крови мышей / В.Г. Кузнецова // Південноукраїнський медичний науковий журнал. – 2013. – Вип.1. – С. 85–87.

12. Кузнецова В.Г. Гістологічне дослідження печінки щурів після введення екстрактів з ембріонів курей в умовах експериментального гепатиту / В.Г. Кузнецова // Молодий вчений. – 2015. – №5, Ч.1. – С. 30–34.

13. Пат на корисну модель 85646 Україна, А01N 1/99, С12N5/073. Отримання екстракту з ембріонів курей / Г.Ф. Жегунов, В.Г. Кузнецова, Ю.О. Тимохіна [та ін.]. Заявник та патентообладач Харківська державна зооветеринарна академія 201307028; заявл. 04.06.2013; опубл. 25.11.2013, Бюл. № 22.

14. Кузнецова В.Г. Действие экстрактов из тканей эмбрионов кур на иммунную систему мышей / В.Г. Кузнецова, Г.Ф. Жегунов // Проблемы криобиологии. – 2008 р. – Т 18.– № 2. – С. 198. (тези доповіді).

15. Kuznetsova V.G. Investigation of immunogenic effect of chicken embryos extracts on mice with experimental leucopenia / V.G. Kuznetsova, G.F. Zhegunov // Biodiversity. Ecology. Adaptation. Evolution. Materials of IV International Young Scientist conference. 2009 р.: тези доп. – Одеса, 2009. – С. 154–155.

16. Кузнецова В.Г. Влияние экстрактов из эмбриональных тканей кур на иммунную систему и сердце крыс. / В.Г. Кузнецова, Г.Ф. Жегунов // Актуальні питання створення нових лікарських засобів. Матеріали всеукраїнської науково-практичної конференції студентів та молодих вчених, 21–22 квітня. – 2010: тези доп. – НфаУ, 2010. – С. 255.

17. Кузнецова В.Г. Гистологическое исследование некоторых внутренних органов лабораторных животных, которым вводили экстракты из эмбрионов кур / В.Г. Кузнецова // Способи захисту та збереження здоров'я людини в сучасних умовах. Міжнародна науково-практична конференція, 23–24 листопад, 2012 р.: тези доп. – Одеса, 2012. – С. 12–14.

18. Изучение состава экстрактов из эмбрионов кур / В.Г. Кузнецова // Сучасні чинники розвитку медичних наук. Міжнародна науково-практична конференція, 16–17 листопада, 2012 р.: тези доп. – Львів, 2012. – С. 93–96.

19. Тимохіна Ю.А. Действие экстрактов из эмбрионов кур на уровень лейкоцитов при экспериментальной гипоксии с гиперкапнией / Ю.А. Тимохіна, В.Г. Кузнецова // Актуальні питання сучасної медицини. Тези міжнародної наукової конференції студентів та молодих вчених, 19-20 квітня 2015 р.: тези доп. –

Харків, 2015. – С. 144–145.

20. Кузнецова В.Г. Амінокислотний та жирнокислотний склад нативного екстракту з курячих ембріонів / В.Г. Кузнецова, М.С. Погоріла, Г.Ф. Жегунов // Фундаментальні та прикладні дослідження в біології. III Міжнародна конференція студентів, аспірантів та молодих учених: тези доп. – Донецьк, 2014. – С 212–213.

### АНОТАЦІЯ

**Кузнецова В.Г. Отримання кріоекстрактів з ембріонів курей та їх біологічна дія у щурів з експериментальним токсичним гепатитом. – Рукопис.**

*Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.19 – кріобіологія. – Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків – 2016.*

Дисертаційна робота присвячена отриманню кріоекстрактів з ембріонів курей, вивченню їх складу та біологічної дії.

Застосування кріоекстрактів з ембріонів курей у щурів з експериментальним гепатитом підвищувало виживаність експериментальних тварин, сприяло нормалізації клінічних, біохімічних і гематологічних показників, стимулювало процеси репарації ушкодженої печінки та гальмувало патологічний процес. Введення кріоекстракту щурам з тетрахлорметановим гепатитом сприяло зниженню активності ферментів АлАТ в 1,7 рази та АсАТ в 1,6 разів відповідно.

Гістологічне дослідження печінки щурів з хронічним токсичним гепатитом показало, що введення експериментальним тваринам кріоекстракту сприяло активації відновних процесів в органі. Встановлено позитивний вплив кріоекстракту на селезінку щурів з експериментальним гепатитом.

Показано, що екстракти з ембріонів курей здатні відновлювати лейкопоез у мишей з експериментальною лейкопенією.

*Ключові слова: екстракти з ембріонів курей, низькомолекулярні пептиди, токсичний гепатит, гістологічне дослідження.*

### АНОТАЦІЯ

**Кузнецова В.Г. Получение криоэкстрактов из эмбрионов кур и их биологическое действие у крыс с экспериментальным токсическим гепатитом. – Рукопись.**

*Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.19 – кріобіологія. – Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харьков – 2016.*

Диссертация посвящена получению криоэкстрактов из эмбрионов кур, изучению их состава и биологического действия на модели токсического гепатита у крыс.

Разработан способ получения криоэкстрактов из эмбрионов кур, который заключается в замораживании эмбрионов в жидком азоте (-196°C) с разным сроком экспозиции – 60 мин и 30 мин. Показано, что криоэкстракты содержат в своем составе большое количество низкомолекулярных пептидов с молекулярной массой от 0,520±1,0 кДа до 5,710±1,0 кДа. Установлен качественный и количественный состав аминокислот. В наибольшем количестве в криоэкстрактах содержатся

глутамин (до  $9,43 \pm 0,008$  мг/кг), аспарагиновая кислота (до  $6,54 \pm 0,005$  мг/кг), серин (до  $4,91 \pm 0,003$  мг/кг) и лейцин (до  $4,88 \pm 0,005$  мг/кг). В составе криоэкстрактов были идентифицированы жирные кислоты: олеиновая (до  $8,18 \pm 0,007$  мг/кг), пальмитиновая (до  $4,56 \pm 0,005$  мг/кг), линолевая (до  $2,49 \pm 0,005$  мг/кг) и стеариновая (до  $1,76 \pm 0,002$  мг/кг). Изучена острая и хроническая токсичность полученных криоэкстрактов. Установлено, что согласно существующей классификации криоэкстракты можно отнести к нетоксическим веществам.

Применение криоэкстрактов из эмбрионов кур у крыс с экспериментальным токсическим гепатитом способствовало повышению выживаемости животных, нормализации клинических, биохимических и гематологических показателей, стимулировало процессы репарации поврежденной печени и замедлению патологического процесса. Введение криоэкстракта крысам с тетрахлорметановым гепатитом способствовало нормализации биохимических показателей, а именно: снижению активности ферментов АЛТ в 1,7 раза и АсАТ в 1,6 раза; снижению уровня диеновых конъюгатов (до  $4,34 \pm 1,17$  ммоль/г); снижению уровня ТБК-активных продуктов (до  $119,66 \pm 21,11$  ммоль/г); повышению уровня восстановленного глутатиона (до  $34,49 \pm 9,00$  у.е.).

Гистологическое исследование печени крыс с хроническим токсическим гепатитом показало, что введение экспериментальным животным криоэкстракта способствовало активации восстановительных процессов в органе. На 8-мые сутки после введения криоэкстракта обнаружены признаки нормализации сосудистого русла и восстановления архитектоники органа, уменьшение объема соединительной ткани. Установлено положительное влияние криоэкстракта на селезенку крыс с экспериментальным гепатитом, которое выразалось в восстановлении функций центров лейкопоеза в органе.

Показано, что криоэкстракты из эмбрионов кур способны восстанавливать лейкопоез у мышей с экспериментальной лейкопенией. Количество лейкоцитов в крови лабораторных животных восстанавливалось от  $5300$  кл/мм<sup>3</sup> до  $14000$  кл/мм<sup>3</sup>).

*Ключевые слова: экстракты из эмбрионов кур, низкомолекулярные пептиды, токсический гепатит, гистологическое исследование.*

## SUMMARY

**V.G. Kuznetsova. Deriving of extracts and cryoextracts from chicken embryos, study of their structure and biological effect in experimental model of hepatitis in rats. - Manuscript.**

*The dissertation for the candidate of biological sciences (PhD) degree in specialty 03.00.19 - cryobiology. - Institute of Cryobiology and Cryomedicine Ukraine, Kharkov, 2016.*

The thesis is devoted to the advancement of extracts from embryos of hens, study their composition and biological effects.

The use of the extracts derived from embryos and cryoextracts derived from chicken embryos in rats with experimental hepatitis contributed to arise of the animals' survival, normalization of clinical, biochemical and hematological parameters, stimulated the reparative processes of the injured liver and slowing down of pathological process. Introduction of the extract and cryoextract to the rats with tetrachloromethane hepatitis

reduced the activity of ALT enzymes in 1.3 and 1.7 times and that of AST did in 1.5 and 1.6 times, respectively.

Histological examination of liver of the rats with chronic toxic hepatitis has shown that the introduction to experimental animals of the extract and cryoextract contributed to activate regenerative processes in the body. The positive effect of the extract and cryoextract on spleen of the rats with experimental hepatitis, has been found.

The extracts of chicken embryos are shown to be able of stimulating leucopoiesis in mice with experimental leukopenia.

**Keywords:** extracts from chicken embryos, low molecular peptides, toxic hepatitis, histological study.



**СПИСОК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ:**

KE1 – кріоекстракт 1 з курячих ембріонів

KE2 – кріоекстракт 2 з курячих ембріонів

E – екстракт з ембріонів курей

ІК – група інтактного контролю

КП – група контрольної патології

АлАТ – аланінамінотрансфераза

АсАТ – аспартатамінотрансфераза

ПОЛ – перекисне окиснення ліпідів

ДК – дієнові кон'югати

ТБК АП – ТБК-активні продукти

GSH – відновлений глутатіон

ГА – гідрокортизону ацетат