

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І КРІОМЕДИЦИНИ**

ІЩЕНКО ІРИНА ОЛЕГІВНА

УДК: 611.018.54:615.014.41:616-001.18/.19

**ВИКОРИСТАННЯ КРІОКОНСЕРВОВАНОЇ СИРОВАТКИ КОРДОВОЇ КРОВІ
В ЛІКУВАННІ ХОЛОДОВИХ РАН
(ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ)**

14.01.35 – кріомедицина

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата медичних наук

Харків-2016

Дисертацією є рукопис

Робота виконана в Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України

Науковий керівник: доктор медичних наук, професор, Заслужений діяч науки і техніки України **САНДОМИРСЬКИЙ Борис Петрович**, Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, завідувач відділу експериментальної кріомедицини, м. Харків.

Офіційні опоненти: доктор медичних наук, професор, лауреат Державної премії України, Заслужений діяч науки і техніки України, **ФУРМАНОВ Юрій Олександрович**, Національний інститут хірургії та трансплантології ім. О.О. Шалімова АМН України, керівник відділу експериментальної хірургії, м. Київ

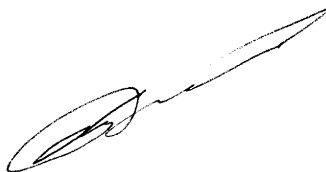
доктор медичних наук, професор, **ОЛІЙНИК Григорій Анатолійович**, Харківська медична академія післядипломної освіти МОЗ України, завідувач кафедри комбустіології, реконструктивної та пластичної хірургії, м. Харків.

Захист дисертації відбудеться «27» вересня 2016 р. о 13³⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 64.242.01 в Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України за адресою 61015, Харків, вул. Переяславська, 23.

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України за адресою 61015, Харків-15, вул. Переяславська, 23

Автореферат розісланий «26» вересня 2016 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради,
доктор біологічних наук, професор



Л.Ф. Розанов

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Рани складають істотну частку хірургічної патології і є серйозною медичною проблемою у всьому світі (Demidova-Rice T. et al., 2012; Mehanni S. et al., 2013; Фомін П.Д., 2015).

Завдяки цілому ряду переваг порівняно з традиційними методами хірургічного лікування, кріохірургія є високоефективним засобом терапії доброякісних і злоякісних новоутворень шкіри (Andrews M. et al., 2004; Гюнтер В.Э., 2010; Соловьева О.В., 2011; Дегтев М.В. и др., 2012; Пустынский И.Н. и др., 2013; Kutlubay Z. et al., 2013). Після кріохірургічних втручань, так само як і після будь-яких інших хірургічних операцій залишається рана. Успішне загоєння таких холодкових ран має величезне значення, оскільки розвиток серйозних ускладнень раньового процесу може певною мірою перекреслити результати навіть блискуче виконаного хірургічного втручання.

Загоєння ран можна описати як комплексний процес, в якому окремі клітини є інтегрованими в складний механізм саногенезу, що реалізовується на всіх рівнях організації живої матерії (Аксенова В.И. и др., 2011; Wijesinghe D. et al., 2013; Shilo S. et al., 2013; Liu S. et al., 2014). У поняття раньовий процес вкладається сукупність взаємопов'язаних судинних, клітинних, біохімічних, імунних і тканинних реакцій організму. У патогенезі раньового процесу знаходять відображення проблеми запалення, регенерації, напрацювання антитіл, хімії біологічно активних речовин і багато інших.

Відновлення дефекту тканин внаслідок їх пошкодження відбувається завдяки репаративній регенерації. Основним елементом регенеративного процесу є живі клітини з вираженим прогеніторним потенціалом, що потрапляють в осередок пошкодження з прилеглої тканини або з віддалених джерел (Young A. et al., 2011; Safferling K. et al., 2013; Mehanni S. et al., 2013). Якою мірою дефект буде замінено сполучною тканиною залежить від величезної кількості різноманітних чинників, внесок кожного з яких не однозначний і до кінця не з'ясований (Имашева А.К. и др., 2009; Luo X. et al., 2013; Zheng Q. et al., 2013).

Не дивлячись на безумовний прогрес у розробці нових і вдосконаленні існуючих методів лікування, перспектива поліпшення результатів лікування ран залишається актуальною. На сьогодні з усіх засобів регенеративної медицини у системному лікуванні ран застосовується лише специфічна і неспецифічна імуноткоригуюча терапія (Абаев Ю.К., 2006; Иванов В.А. и др., 2008; Савельев В.С. и др., 2008). Таким чином, величезний арсенал засобів регенеративної медицини в лікуванні ран практично не застосовується.

В останнє десятиліття в регенеративній медицині інтенсивно розвивається новий напрям – застосування біопрепаратів із тканин і клітин фето-плацентарного комплексу (Хасанов А.Г. и др., 2008, Грищенко В.И. и др., 2010; Гольцев А.Н. и др., 2013; Sun T. et al., 2013; Kanno H., 2013). Оскільки позитивний вплив клітинної терапії реалізується зокрема за рахунок комплексу біологічно активних речовин (БАР), стабільно високий інтерес до безклітинних стимуляторів регенеративно-пластичних процесів є закономірним (Грищенко В.И. и др., 2010; Бабаєва Г.Г. та ін., 2012; Гольцев А.Н. и др., 2013; Яригин В.Н. и др., 2015).

Особливу увагу привертає сироватка кордової крові, яка є природним безклітинним стимулятором регенеративно-пластичних процесів. Її унікальний склад і властивості забезпечують стабільно високий інтерес як з боку дослідників, так і з боку практикуючих лікарів (Прокопюк О.С. и др., 2008; Hao L. et al., 2009; Гулевский А.К. и др., 2009; Введенский Б.П. и др., 2012; Sun T. et al., 2013, Gul A. et al., 2013; Sharma N. et al., 2015). Важливо підкреслити, що в сироватці кордової крові всі компоненти знаходяться у фізіологічно збалансованому співвідношенні. Крім того, її БАР, ймовірно, знаходяться в оптимальному для прояву біологічних ефектів біохімічному оточенні.

Наразі, можна створювати запаси сироватки кордової крові в кріобанках. Можливість мати істотний інтервал часу між одержанням і застосуванням сироватки кордової крові вкрай важлива, оскільки дозволяє проводити її повноцінне тестування на предмет біологічної безпеки і завчасну доставку до лікувальних установ.

Таким чином, враховуючи вже відомий терапевтичний потенціал сироватки кордової крові, застосування кріоконсервованої сироватки кордової крові (КСКК) може виявитися реальним способом впливу на раньовий процес. Проте, через брак експериментальних досліджень питання про перспективи включення КСКК у протоколи лікування ран залишається відкритим.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами і темами. Дослідження було проведено згідно з планом відомчих науково-дослідних робіт Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України у рамках теми «Вплив низьких температур та екстрактів серця і селезінки на процеси некротизації і регенерації міокарду, судин та хряща» (№ держреєстрації 0112U003133).

Мета і завдання дослідження. Метою роботи є визначення впливу кріоконсервованої сироватки кордової крові на загоєння ран після кріодеструкції.

Для досягнення поставленої мети були вирішені наступні завдання:

1. Вивчити вплив кріоконсервованої сироватки кордової крові на швидкість загоєння холододових ран.
2. Дати мікробіологічну характеристику ран при лікуванні кріоконсервованою сироваткою кордової крові.
3. Оцінити вплив кріоконсервованої сироватки кордової крові на рівень маркерів запалення і деструкції тканин у тварин із холододовими ранами.
4. Вивчити вплив кріоконсервованої сироватки кордової крові на швидкість очищення холододових ран, а також на морфологічні прояви деструктивно-запальних, дистрофічних і репаративних процесів в епітелії.
5. Дослідити вплив кріоконсервованої сироватки кордової крові на утворення і визрівання сполучної тканини на моделі холододових ран.

Об'єкт дослідження. Вплив кріоконсервованої сироватки кордової крові на місцеві і системні прояви раньового процесу після кріодеструкції шкіри.

Предмет дослідження. Репаративні процеси в ранах після кріодеструкції.

Методи дослідження. Для вирішення поставлених завдань було потрібно залучення клінічних, бактеріологічних, клініко-лабораторних, біохімічних, морфологічних і статистичних методів.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше доведено можливість застосування КСКК в лікуванні ран після кріодеструкції. Показано, що її терапевтична ефективність вища, ніж у препарату порівняння «Екстракт плаценти» (ЕП).

Вперше виявлено, що системне введення КСКК після кріодеструкції супроводжується збільшенням швидкості загоєння ран.

Вперше показано зниження кількості мікроорганізмів у ранах і ерадикація їх від патогенної мікрофлори під впливом КСКК.

Вперше виявлено, що застосування КСКК знижує рівень маркерів запалення (швидкість осідання еритроцитів (ШОЕ), С-реактивний білок (СРБ), нейтрофільоз) і деструкції тканин у сироватці крові (лактатдегідрогеназа (ЛДГ), аспаратамінотрансфераза (АСТ), аланінамінотрансфераза (АЛТ), тіобарбітурової кислоти (ТБК) - активні продукти) і шкірі (ТБК - активні продукти) у тварин із холодовими ранами.

Вперше виявлено, що введення тваринам із холодовими ранами КСКК супроводжується зменшенням поширеності і вираженості патоморфологічних проявів у ранах.

Вперше показано, що застосування КСКК після кріодеструкції сприяє утворенню і визріванню сполучної тканини, прискорює процес заміщення колагену III типу на колаген I типу, характерний для нормального загоєння ран.

Практичне значення одержаних результатів. Отримані дані сприяють з'ясуванню механізмів регуляції раньового процесу після кріодеструкції. Здатність КСКК стимулювати загоєння ран, утворення і визрівання сполучної тканини може служити експериментальним обґрунтуванням для проведення доклінічних досліджень, спрямованих на вивчення її терапевтичної ефективності в комплексному лікуванні ран. Дані експериментальних досліджень можуть бути використані при розробці нових методів терапії і включені в протоколи лікування ран і відморожень, які ґрунтуються на принципах регенеративно-пластичної медицини.

Особистий внесок здобувача. Представлені до захисту наукові результати отримані, оброблені і проаналізовані дисертантом особисто. Автор самостійно опрацював спеціалізовану літературу за темою дисертації, провів інформаційно-патентний пошук, виконав експериментальні дослідження, брав активну участь в написанні і підготовці до публікації всіх статей і тез за темою дисертаційної роботи, провів статистичну обробку і аналіз отриманих результатів, розробив основні положення і висновки дисертації. В опублікованих із співавторами роботах особистий внесок дисертанта полягає в наступному:

– [1,6,10] – у пошуку і аналізі даних літературних джерел, участі у плануванні експериментів, моделюванні холодових ран, проведенні планіметричного вивчення ран, участі в бактеріологічному дослідженні ран, обробці даних експериментального дослідження, участі в інтерпретації результатів дослідження і формулюванні висновків, підготовці до друку;

– [5,7-9] – у пошуку і аналізі даних літературних джерел, участі в плануванні експериментів, моделюванні холодових ран, у виконанні преаналітичного етапу біохімічних досліджень сироватки крові і шкіри, обробці даних експериментального

дослідження, участі в інтерпретації результатів дослідження і формулюванні висновків, підготовці до друку;

– [2-4,11-13] – у пошуку і аналізі даних літературних джерел, участі в плануванні експериментів, моделюванні холодових ран, участі в морфологічному дослідженні ран, обробці даних експериментального дослідження, участі в інтерпретації результатів дослідження і формулюванні висновків, підготовці до друку.

Апробація результатів дисертації. Матеріали дисертаційної роботи були представлені на: міжнародній заочній науково-практичній конференції «Теоретические и практические аспекты современной криобиологии» (Сиктивкар, Росія – Україна, 2014); міжнародній конференції «IFCC World Lab» (Стамбул, Туреччина, 2014); науково-практичній конференції з міжнародною участю «Актуальні питання клінічної та виробничої трансфузіології» (Харків, Україна, 2014); міжнародній науковій конференції «Freezing biological time» (Лондон, Великобританія, 2014); науково-практичній конференції з міжнародною участю «Наукові та практичні аспекти хронізації неінфекційних захворювань внутрішніх органів» (Харків, Україна, 2014); міжнародній конференції «Central European Conference on Regenerative Medicine» (Бидгосжч, Польща, 2015); конференції «Холод в биологии и медицине: Актуальные вопросы криобиологии, трансплантологии и биотехнологии» (Харків, Україна, 2015); міжнародній конференції «4th International Conference on Tissue Science and Regenerative Medicine» (Рим, Італія, 2015).

Публікації. За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 13 робіт, зокрема 5 статей у спеціалізованих виданнях, із них 1 – в іноземному науковому журналі, 1 – в науковому журналі України, внесеному до міжнародних наукометричних баз, 8 робіт у матеріалах і тезах конференцій.

Об'єм і структура дисертації. Дисертація викладена на 209 сторінках, з них: бібліографічний список, викладений на 28 сторінках, що складається з 258 джерел, з яких 133 – англomовні, та 75 рисунків і 9 таблиць. Робота складається зі вступу, огляду та аналізу літератури, опису матеріалів і методів дослідження, 2 розділів результатів власних досліджень і їх обговорення, узагальнення результатів досліджень, висновків і списку використаної літератури.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали і методи дослідження. Роботу виконували на щурах «Сфінкс» відповідно до вимог комітету з біоетики ІПКіК НАН України, узгодженими з директивою Європейського парламенту і Ради Європейського союзу від 22.09.2010 (Directive 2010/63/EU). Холодові рани моделювали на латеральній поверхні стегна як описано в роботі Богатирьової О.О. та ін. (Богатирьова О.О. та ін., 2012) у модифікації. Застосовували аплікатор діаметром 8,0 мм, який охолоджувався рідким азотом ($t = -195^{\circ}\text{C}$, експозиція 60 с). Тварин було розподілено на групи по 10 особин у кожній. У контрольній групі (КГ) щурам вводили фізіологічний розчин («Юрія-фарм», Україна), в групі порівняння (ГП) – медичний препарат ЕП («Біофарма», Україна), в експериментальній групі (ЕГ) – КСКК (надана низькотемпературним

банком ІПКіК НАН України), в інтактній групі (ІГ) – жодних втручань не проводили.

Ін'єкції починали з 3 доби після кріодеструкції через день по 0,1 мл/кг маси тіла внутрішньом'язово (у здорову лапу) впродовж 9 днів. Дозування розраховували, як описано в роботі Рыболовлева Ю.Р. и др., (Рыболовлев Ю.Р. и др., 1979).

Площу ран визначали способом, описаним в роботі Туровой А.Ю. и др. (Туровая А.Ю. и др., 2014) у модифікації. Вимірювання проводили за допомогою програми Adobe Photoshop CS3 («Adobe Systems», США). Відсоток зменшення площі (ВЗП) ран розраховували за формулою: $VZP = (S_0 - S) / S_0 \times 100\%$, де S_0 – початкова середня площа ран на початок лікування, S – середня площа ран на момент вимірювання (Григорян А.Ю. и др., 2011). Швидкість загоєння (ШЗ) ран обчислювали за формулою: $ШЗ = (VZP_1 - VZP_0) / T$, де VZP_1 – відсоток зменшення площі ран від початкової на момент вимірювання, VZP_0 – відсоток зменшення площі ран при попередньому вимірюванні, T – кількість днів між вимірюваннями (Григорян А.Ю. и др., 2011).

Мікробіологічні дослідження проводили відповідно до вимог по роботі з мікроорганізмами (Vandepitte J. et al., 2003). Із суспензій тканин готували серійні розведення, які висівали на: м'ясо-пептонний, 5% кров'яний, шоколадний, жовтково-сольовий агарі, анаеробний гемагар, агар Мак Конкі, агаризоване середовище Сабуро.

Лейкоцитарну формулу досліджували в мазках за допомогою мікроскопа Granum R 4003 (КНР) як описано в роботі Меньшикова В.В. (Меньшиков В.В., 1999), ШОЕ визначали мікрометодом Панченкова (Меньшиков В.В., 1999).

Вміст СРБ в сироватці крові визначали за принципом латексної аглютинації («Гранум», Україна).

Визначення активності ЛДГ (набір «Erba-lachema», Чеська Республіка), АСТ і АЛТ (набори «Biosystems», Іспанія) в сироватці крові та рівень ТБК - активних продуктів у сироватці крові і шкірі (Чевари С. и др., 1991) проводили методом фотометрії на напівавтоматичному біохімічному аналізаторі Rayto Rt - 9100 (КНР) та спектрофотометрі Hitachi-U3210 (Японія).

Матеріал для гістологічного дослідження фіксували в 10% нейтральному формаліні, піддавали спиртовій проводці і парафіновій заливці, виготовляли зрізи товщиною 5-6 мкм. Препарати забарвлювали гематоксиліном і еозином, фукселіном по Вейгерту з дофарбовуванням пікрофуксином по Ван Гізону. За допомогою ШИК-реакції виявляли нейтральні глікозаміноглікани, дезоксинуклеопротеїди (ДНП) і рибонуклеопротеїди (РНП) виявляли відповідно по Фельгену-Россенбеку і Браше. Ідентифікацію колагену проводили в поляризованому світлі при забарвленні пікросиріусом червоним. Гістологічні і гістохімічні методики виконували за відповідними прописами (Лилли Р., 1960; Пирс Э., 1962; Коржевский Д.Э., 2010). Морфометричним методом визначали глибину зони некрозу, товщину зони регенерату, товщину епідермісу, щільність розташування фібробластів і відносну кількість колагену в зоні регенерату (Автандилов Г.Г., 1990). Мікроскопію проводили на мікроскопі Olympus Vx-41 (Японія). Для мікроскопії в поляризованому світлі застосовували мікроскоп «POLMY-A» (Німеччина).

Для ультраструктурного дослідження матеріал фіксували в 3% розчині глутарового альдегіду на фосфатному буфері Міллоніга (рН 7,3-7,4) і 1% розчині чотириокису осмію (Уикли Б.С., 1975). Після зневоднення зразки заливали в епон-аралдит. Зрізи (0,5 мкм) забарвлювали метиленовим синім і основним фуксином, досліджували під мікроскопом ЛЮМАМ МП-4 (ЛОМО, Росія).

Ультратонкі зрізи контрастували уранілацетатом і цитратом свинцю (Уикли Б.С., 1975), досліджували за допомогою електронного мікроскопа ПЭМ-125К (АТ «SELMI», Україна) при прискорюючій напрузі 75 кВ.

Статистичну обробку даних виконували за допомогою пакету програм «Excel 2003» («Microsoft», США), «SPSS v.10.0» («SPSS Inc.», США). Дані оцінювали за допомогою непараметричного U-критерію Манна – Уїтні і наводили у вигляді $M \pm s$. Вірогідно відмінними вважали результати при $P < 0,05$.

Результати власних досліджень та їх обговорення.

Клініко-лабораторні показники у тварин із холодowymi ранами при лікуванні кріоконсервованою сироваткою кордової крові або екстрактом плаценти. Вивчення клініко-лабораторних показників свідчить про виражений стимулюючий вплив КСКК і ЕП на процеси репарації холодowych ран. Виявлено, що КСКК і ЕП мають схожий вплив, який виражається стимуляцією загоєння переважно у першу фазу раньового процесу, при цьому терапевтична ефективність КСКК вища, ніж у ЕП.

Як можна побачити в таблиці 1, порівняно з даними в КГ площа ран у тварин ЕГ і ГП на 7 добу експерименту менша відповідно в 2,8 і 1,9 рази (ВЗП ран дорівнює 63,6 і 46,9); на 9 добу – в 2,8 і 1,4 рази (ВЗП ран в ЕГ складає 78,0, в ГП і КГ площа ран з 7 по 9 добу не змінюється); на 14 добу – в 6,1 і 2,1 рази (ВЗП дорівнює 91,5 і 74,8). Площа в КГ з 9 по 14 добу не змінюється, відмінності реєструються лише між показниками на 7 і 14 добу спостереження, ВЗП ран за цей відрізок часу дорівнює 48,2. На 21 добу експерименту рани у щурів ЕГ повністю закриваються. Порівняно з результатами в КГ, застосування ЕП приводить до зменшення площі ран в 3,3 рази (ВЗП дорівнює 91,7). В КГ площа ран у цей строк спостереження скорочується на 72,8%.

Таблиця 1

Площа холодowych ран (мм²) у експериментальних тварин ($M \pm s$)

Група	Доба				
	3	7	9	14	21
КГ	168,1±20,9	137,8±19,1	104,1±16,9	87,1±14,2	45,8±6,9 ^{&}
ГП		89,3±13,1 [#]	72,7±9,4 [#]	42,3±7,1 ^{#&}	13,9±1,7 ^{#&}
ЕГ		61,2±8,3 ^{#^}	37,0±4,8 ^{#^&}	14,2±1,8 ^{#^&}	-

Примітка: $P < 0,05$ відносно до: [#] – КГ, [^] – ГП, [&] – відповідної групи на попередній строк спостереження.

Максимальна ШЗ ран в ЕГ і ГП спостерігається з 3 по 7 добу експерименту (15,9 і 11,7 %/д). Надалі ШЗ зменшується: з 7 по 9 добу у тварин ЕГ вона дорівнює 7,2, а у тварин ГП – 4,9 %/д. У період з 9 по 14 добу ШЗ складає в ЕГ – 2,7, а ГП – 3,6 %/д, у період з 14 по 21 добу – 1,2 і 2,4 %/д відповідно.

Із результатами планіметричного дослідження узгоджується динаміка мікробіологічних показників ран. На 7 добу спостереження в ЕГ кількість бактерій у ранах у 3,4 рази менше ніж у КГ, у щурів ГП – в 1,9 рази. На 14 добу експерименту лікування ЕП супроводжується зменшенням кількості мікробів в 1,7 рази, КСКК – майже на два порядки (у 91,1 рази). При цьому, у ГП відбувається ерадикація ран від *S. capitis*, *S. marcescens*, *P. Alcalifaciens*, в ЕГ – від *S. capitis*, *E. faecalis*, *S. marcescens*, *P. alcalifaciens*, *S. pyogenes*. Видовий склад мікрофлори у тварин КГ не змінюється. На 21 добу кількість бактерій в ранах в ГП менша ніж в КГ в 8,4 рази, в ЕГ має місце ерадикація від патогенної мікрофлори.

Лікування щурів із холодowymi ранами ЕП або КСКК супроводжується нормалізацією формули крові на 7 добу експерименту, що опосередковано свідчить про їх протизапальний вплив. В той же час, формула крові у тварин КГ характеризується підвищеною кількістю як сегментоядерних (у 1,5 рази), так і паличкоядерних нейтрофілів (у 1,6 рази).

Застосування КСКК або ЕП сприяє зменшенню ШОЕ: у 2,0 і 1,6 рази на 7 і в 1,6 і 2,2 – на 14 добу експерименту. При цьому, в ЕГ показники ШОЕ повертаються до норми.

Порівняно з результатами в КГ рівень СРБ в сироватці крові на 7 і 9 добу спостереження зменшується (у 1,5 рази) тільки в ЕГ (рис. 1). На 14 добу вміст СРБ в ГП знижується у 1,3 рази, в ЕГ відмічається його нормалізація.

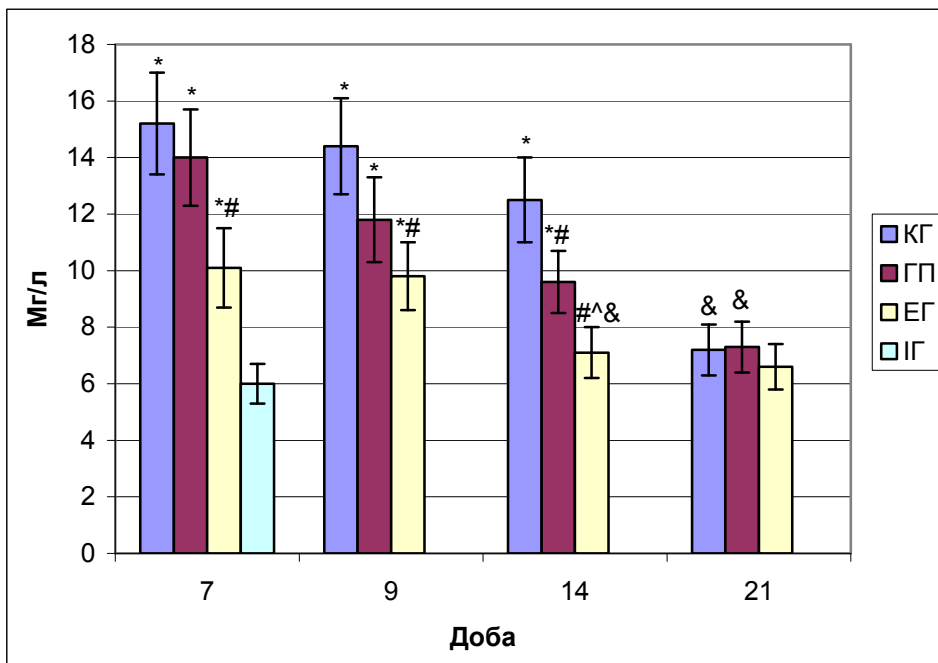


Рис. 1. Рівень СРБ в сироватці крові тварин.

Примітка: тут і далі $P < 0,05$ по відношенню до: * – ІГ, # – КГ, ^ – ГП, & – відповідної групи на попередній строк спостереження.

Визначення біохімічних маркерів пошкодження тканин так само свідчить про позитивний вплив ЕП і КСКК на репарацію холодových ран. Так, на 7 добу спостереження рівень ЛДГ знижується лише в ЕГ (1,5 рази). На 9 добу активність ЛДГ в ГП і ЕГ зменшується відповідно в 1,3 і 1,9 рази. На 14 добу рівень ЛДГ в ГП зменшується в 1,5 рази, в ЕГ реєструється його нормалізація. Лікування ЕП або КСКК приводить до зменшення активності АСТ в 1,4 і 1,7 рази на 7, 1,4 і 2,2 – на 9 добу спостереження. На 14 добу експерименту рівень АСТ в ЕГ не відрізняється від норми. Активність АЛТ на 7 добу експерименту в ГП зменшується в 1,3 рази, в ЕГ – до рівня норми.

Рівень ТБК - активних продуктів найбільше зменшується при лікуванні КСКК. Так, на 7 добу експерименту величина цього показника в шкірі тварин ГП і ЕГ нижче ніж в КГ відповідно в 1,4 і 1,8 рази. На 9 добу реєструється нормалізація вмісту ТБК - активних продуктів в ЕГ. Вплив ЕП або КСКК на рівень ТБК - активних продуктів в сироватці крові на 7 добу експерименту однаковий. Проте, в ЕГ фіксується нормалізація рівня ТБК - активних продуктів вже на 9 добу спостереження.

Морфологічна характеристика холодových ран при лікуванні кріоконсервованою сироваткою кордової крові або екстрактом плаценти. За результатами морфологічного дослідження встановлено, що найбільш виражені пошкодження спостерігаються в тканинах, що контактували безпосередньо з кріоаплікатором.

На 7 добу експерименту в зоні кріовпливу у тварин КГ переважають прояви першої фази раньового процесу. Спостерігаються виражені циркуляторні порушення, формування обширної зони некрозу епідермісу, дерми, гіподерми і м'язової тканини. Ознаки репаративної регенерації проявляються у вигляді формування сполучної тканини, острівців новоутворених судин із гістохімічними ознаками функціональної активності ендотелію. В краях раньового дефекту відмічаються ознаки епідермізації на тлі дистрофічних проявів в епідермісі.

На 14 добу спостереження починають переважати ознаки другої фази раньового процесу. З'являється чітка демаркаційна зона, яка відмежовує некротичний детрит. Проліферативна і синтетична активність фібробластів наростає у напрямку до верхніх відділів зони регенерату. Збільшується відносна кількість колагену III типу. Продовжується епідермізація. В 100% випадків виявляються дистрофічні зміни новосформованого епідермісу, вогнища вторинних некрозів дерми різного розміру.

На 21 добу переважають ознаки третьої фази раньового процесу. Продовжується епідермізація, епітеліальний пласт в зоні регенерату і прилеглих тканинах нерівномірної товщини з вогнищами гіперплазії і гіпертрофії епідермісу з явищами пара- і гіперкератозу, спонгіозу. У прилеглий дермі виявляється багато макрофагів і фібробластів із різною функціональною активністю, переважає колаген III типу. У 50% випадків спостерігаються гнійно-деструктивні ускладнення.

При лікуванні тварин ЕП на 7 добу експерименту одночасно спостерігаються морфологічні ознаки першої і другої фаз раньового процесу. Порівняно з даними в КГ має місце зменшення глибини зони некрозу в 1,2 рази (табл. 2).

Таблиця 2

Глибина (мкм) зони некрозу (M±s)

Група	Доба	
	7	14
КГ	2049,63±29,85	721,83±36,13 ^{&}
ГП	1749,98±13,97 [#]	529,12±23,30 ^{#&}
ЕГ	1655,28±11,42 ^{#^}	420,67±20,04 ^{#^&}

Знижується нейтрофільна і посилюється макрофагально-фібробластична реакція, в 2,0 рази підвищується товщина зони регенерату (табл. 3).

Таблиця 3

Товщина (мкм) зони регенерату (M±s)

Група	Доба		
	7	14	21
КГ	324,80±3,60	897,51±37,49 ^{&}	1545,08±42,89 ^{&}
ГП	657,75±28,10 [#]	1123,01±47,21 ^{#&}	1215,17±45,43 [#]
ЕГ	748,22±16,09 ^{#^}	1290,41±53,29 ^{#^&}	1068,22±81,26 ^{#^&}

При цьому, щільність фібробластів як у центрі, так і на периферії зони регенерату вища, відповідно в 2,0 і 1,9 рази (табл. 4). Виявляється переважання відносної кількості колагену III типу (табл. 5).

Таблиця 4

Щільність розташування фібробластів (екз/мм²) в зоні регенерату (M±s)

Група	Доба					
	7		14		21	
	ПВ	ЦВ	ПВ	ЦВ	ПВ	ЦВ
КГ	1352,94± 63,63	866,87± 41,50	1145,14± 45,12 ^{&}	1250,49± 66,80 ^{&}	824,95± 38,68 ^{&}	1213,77± 49,96
ГП	2627,71± 123,31 [#]	1693,88± 66,69 [#]	2698,15± 123,96 [#]	3724,96± 175,86 ^{#&}	2172,12± 99,50 ^{#&}	2865,02± 105,07 ^{#&}
ЕГ	2877,38± 135,69 [#]	1626,13± 81,99 [#]	2618,34± 155,09 [#]	3488,07± 227,31 ^{#&}	1613,80± 125,59 ^{#^&}	2387,37± 99,81 ^{#^&}

Примітка: ПВ - периферичні відділи, ЦВ - центральні відділи.

Регенеруючий епідерміс на відміну від КГ характеризується зменшенням кількості і розмірів вогнищ гіперплазії і гіпертрофії клітин, в 1,2 рази знижується його товщина (табл. 6).

На 14 добу спостереження, як і в КГ, переважають ознаки другої фази раньового процесу – утворення сполучної тканини і регенерації епітелію. Проте

гнійно-некротичні ускладнення зустрічаються значно рідше (у 50 замість 100% в КГ). Порівняно з даними в КГ товщина зони регенерату більша в 1,3, а щільність розташування фіброblastів у центральних і периферичних відділах – в 2,0 і 2,4 рази відповідно.

Таблиця 5

Відносна кількість колагену (%) в зоні регенерату (M±s)

Група	Тип колагену		
	НЗК I	ЗК I	К III
7 доба			
КГ	-	-	6,86±1,11
ГП	10,16±1,32 [#]	23,96±1,87 [#]	29,43±2,00 [#]
ЕГ	15,11±1,57 ^{#^}	21,45±1,80 [#]	30,21±2,01 [#]
14 доба			
КГ	7,69±1,17 ^{&}	2,44±0,68 ^{&}	13,82±1,51 ^{&}
ГП	8,60±1,23	32,26±2,05 ^{#&}	26,88±1,94 [#]
ЕГ	7,84±1,18 ^{&}	36,86±2,11 ^{#^&}	31,76±2,04 ^{#^}
21 доба			
КГ	22,5±1,83 ^{&}	18,93±1,72 ^{&}	56,07±2,18 ^{&}
ГП	6,78±1,10 [#]	41,53±2,16 ^{#&}	34,75±2,09 ^{#&}
ЕГ	5,36±0,98 ^{#&}	43,90±2,17 ^{#&}	26,34±1,93 ^{#^&}

Примітка: НЗК I – незрілий колаген I типу, ЗК I – зрілий колаген I типу, К III – колаген III типу.

Процес епідермізації носить активніший ніж у КГ характер, проліферативні і дистрофічні зміни епідермісу менш виражені, товщина епідермального пласта як у локусах гіперплазії, так і поза ними нижча в 1,3 рази.

Таблиця 6

Товщина епідермісу (мкм) у експериментальних тварин (M±s)

Група	Доба					
	7		14		21	
	Поза ЛГ	В ЛГ	Поза ЛГ	В ЛГ	Поза ЛГ	В ЛГ
КГ	101,37± 4,73	145,22± 3,96	106,45± 4,75	143,11± 4,93	115,59± 4,43	151,91± 4,76
ГП	86,65± 2,77 [#]	120,55± 4,30 [#]	79,42± 1,75 ^{#&}	111,65± 4,80 [#]	46,66± 1,25 ^{#&}	107,56± 3,78 ^{#&}
ЕГ	70,21± 1,71 ^{#^}	103,53± 3,09 ^{#^}	71,08± 2,96 ^{#^}	98,92± 2,77 ^{#^}	40,39± 1,63 ^{#^&}	103,33± 4,31 [#]

Примітка: ЛГ - локус гіперплазії.

Прилегла до зони регенерату дерма з ознаками фібротизації і лише в 50% спостережень зі стромальними некрозами.

На 21 добу переважають ознаки третьої фази раньового процесу – в зоні попередньої кріотравми сформовано пласт молоді сполучної тканини з ознаками активної колагенізації. Порівняно з КГ відмічається підвищена щільність розташування фіброblastів у центральних і периферичних відділах зони регенерату, відповідно в 2,4 і 2,6 рази. Ознаки перебудови новоутвореної сполучної тканини в процесі її визрівання проявляються зменшенням у 1,3 рази товщини зони регенерату, зниженням відносної кількості колагену III типу (у 1,6 разу) на тлі підвищення кількості зрілого колагену I типу (у 2,2 разу). Зменшується вираженість гіперпластичних і дистрофічних процесів в епідермісі. Товщина епідермального пласта в локусах гіперплазії і поза ними менше ніж у КГ відповідно в 1,4 і 2,5 рази. В той же час у 30% спостережень відмічається нагноєння грануляційної тканини.

У тварин ЕГ на 7 добу експерименту активно протікає друга фаза раньового процесу, травматичне запалення виражене менше (глибина зони некрозу знижується в 1,2 рази). Навколо зони некрозу виявляється широкий шар грануляційної тканини з синтетично і мітотично активними фіброblastами, ознаками активного колагенуутворення і неоваскулогенезу, вираженою макрофагальною реакцією. Товщина зони регенерату збільшується в 2,3 рази, кількість фіброblastів у периферичних і центральних відділах підвищується відповідно в 2,1 і 1,9 рази. Вивчення складу колагену демонструє наявність його I і III типів. Відносна кількість колагену III типу перевищує показники в ГК і ГП відповідно в 4,4 і 1,5 рази. В епідермісі репарація ран характеризується проліферацією з помірно вираженою локальною компенсаторною гіперплазією і гіпертрофією. Порівняно з даними в КГ товщина епідермісу як у локусах гіперплазії, так і поза ними менше в 1,4 рази.

На 14 добу спостерігається активна елімінація некротичного детриту і збільшення об'єму грануляційної тканини. В 1,7 рази зменшується глибина зони некрозу, в 1,4 рази збільшується товщина регенерату. Щільність розташування фіброblastів перевищує показники в КГ у 2,3 і 2,8 рази відповідно в периферичних і центральних відділах. Кількість зрілого колагену I типу і колагену III типу вище відповідно в 15,1 і 2,3 рази. Знижується ступінь прояву дистрофічних і проліферативних ознак в епідермісі, його товщина як в локусах гіперплазії, так і поза ними, зменшується відповідно в 1,5 і 1,4 рази. В той же час зберігаються дистрофічні і запальні зміни, проте лише в 20% спостережень зустрічаються стромальні некрози.

На 21 добу експерименту спостерігається повністю сформована зона регенерату, епідермізація закінчена. Переважають прояви третьої фази раньового процесу – перебудови сполучної тканини. Збільшується вміст волокнистих структур, знижується кількість судин і клітинних елементів, серед яких переважають зрілі фіброblastи. Товщина зони регенерату в 1,5 рази нижче, ніж у КГ. Щільність розташування фіброblastів у центральних і периферичних відділах зони регенерату нижче в 2,0 рази. Зменшення товщини регенерату і зниження щільності розташування у ньому фіброblastів ілюструють пришвидшене визрівання новоутвореної сполучної тканини. Важливо відзначити, що невисока щільність розташування фіброblastів у КГ свідчить не про визрівання сполучної тканини, а про слабку активність репаративних процесів. Результати визначення вмісту колагенів також свідчать, що сполучна тканина в ЕГ більш зріла. Вміст колагену III

типу і незрілого колагену I типу менше, ніж у КГ відповідно в 2,1 і 4,2 рази. В той же час, відносна кількість зрілого колагену I типу вища в 2,3 рази. Отже, процес поступового заміщення колагену III типу на колаген I типу, характерний для нормального загоєння ран, в ЕГ проходить активніше. Товщина епідермісу нижча, ніж у КГ в 2,9 і 1,5 рази відповідно поза локусами і в локусах гіперплазії. У прилеглих до зони регенерату тканинах наявні нерізко виражені ознаки фібротизації, натомість ускладнення гнійно-запального характеру відсутні.

ВИСНОВКИ

Представлено теоретичне і експериментальне узагальнення і нове рішення наукової задачі регенеративної медицини, яка направлена на виявлення шляхів реалізації терапевтичного впливу кріоконсервованої сироватки кордової крові на моделі холодових ран у щурів. Отримані в роботі дані свідчать, що використання кріоконсервованої сироватки кордової крові має позитивний вплив на перебіг раньового процесу, що виявляється зменшенням системних проявів запалення і деструкції тканин, зниженням кількості мікроорганізмів у ранах і ерадикацією їх від патогенної мікрофлори, прискоренням швидкості загоєння ран, стимуляцією утворення і визрівання сполучної тканини. Показано, що терапевтична ефективність кріоконсервованої сироватки кордової крові вище, ніж у медичного препарату «Екстракт плаценти».

1. Введення кріоконсервованої сироватки кордової крові супроводжується збільшенням швидкості загоєння холодових ран. Так, на 7 і 9 добу експерименту зафіксовано зменшення площі ран в 2,8 рази, на 14 добу - в 6,1 рази. На 21 добу експерименту рани повністю закриваються. Порівняно з даними у тварин, що не отримували лікування, максимальна швидкість загоєння ран вища (15,9 проти 6,3 %/д) і відмічається раніше, відповідно з 3 по 7 і з 3 по 9 добу експерименту.

2. Застосування кріоконсервованої сироватки кордової крові сприяє зниженню кількості мікроорганізмів у холодових ранах і їх ерадикації від патогенної мікрофлори. Порівняно з даними у тварин, що не отримували лікування, на 7 і 14 добу експерименту кількість мікроорганізмів зменшується відповідно в 3,4 і 91,1 рази. При цьому, на 14 добу експерименту відбувається ерадикація тканин від *S. capitis*, *E. faecalis*, *S. marcescens*, *P. alcalifaciens*, *S. Pyogenes*, на 21 добу відмічається ерадикація ран від патогенної мікрофлори.

3. Лікування тварин із холодовими ранами кріоконсервованою сироваткою кордової крові знижує рівень маркерів запалення і деструкції тканин. Зменшення вираженості системних проявів запального процесу відображується в нормалізації формули крові на 7 добу, зниженні ШОЕ в 2,0 рази на 7 і - до рівня норми на 14 добу, зменшенні рівня СРБ в 1,5 рази на 7 і 9 добу і - до норми на 14 добу, зниженні рівня ТБК - активних продуктів у сироватці крові в 1,4 рази на 7 і - до рівня норми на 9 добу експерименту. Зниження рівня маркерів деструкції тканин у сироватці крові і шкірі виявляється зменшенням рівня ЛДГ в 1,5 і 1,9 рази відповідно на 7 і 9 добу і - до значень норми на 14 добу експерименту, нормалізацією активності АЛТ на 7 добу, а також зниженням активності АСТ в 1,7 і 2,2 рази на 7 і 9 добу - до нормальних значень на 14 добу експерименту,

зменшенням вмісту ТБК - активних продуктів у шкірі в 1,3 рази на 7 і - до рівня норми на 9 добу експерименту.

4. Введення тваринам із холодowymi ранами кріоконсервованої сироватки кордової крові приводить до більш швидкої, порівняно з тваринами що не отримували лікування, елімінації некротизованих тканин, відповідно в 1,2 і 1,7 рази на 7 і 14 добу експерименту. Відмічається зменшення вираженості вторинних деструктивно-запальних ускладнень раньового процесу в 2,0 і 5,0 разів відповідно на 7 і 14 добу експерименту, на 21 добу - деструктивно-запальні ускладнення не відмічаються. Зменшуються прояви деструктивно-запальних і дистрофічних процесів в епітелії, стимулюється його репаративна регенерація. Так, на 7 добу експерименту дистрофічні зміни епідермісу у вогнищах гіперплазії зустрічаються в 2,0 рази рідше ніж у тварин, що не отримували терапії. Товщина епідермального пласта як в локусах гіперплазії, так і поза ними зменшується відповідно в 1,4 рази на 7, в 1,5 і 1,4 - на 14 і в 2,9 і 1,5 рази - на 21 добу експерименту.

5. Застосування кріоконсервованої сироватки кордової крові супроводжується прискоренням утворення і визрівання сполучної тканини. Порівняно з результатами одержаними у тварин, що не отримували лікування, товщина зони регенерату на 7 і 14 добу експерименту вище відповідно в 2,3 і 1,4 рази. Кількість фібробластів у периферичних і центральних відділах зони регенерату збільшується відповідно в 2,1 і 1,9 рази на 7 і в 2,3 і 2,8 рази на 14 добу експерименту. Прискорення визрівання сполучної тканини виявляється зменшенням вмісту в ній судин, впорядковуванням просторової орієнтації фібробластів, зниженням щільності їх розташування в регенераті на 21 добу експерименту. Активація синтезу колагену I і III типів супроводжується зміною їх співвідношення, яке поступово наближається до показників, що характерні для нормальної шкіри. Це виявляється підвищенням кількості колагену III типу в 4,4 і 2,3 рази відповідно на 7 і 14 добу експерименту, появою на 7 добу незрілого і зрілого колагену I типу, відсутнього у тварин, що не отримували лікування. Відбувається підвищення відносної кількості зрілого колагену I типу на 14 і 21 добу експерименту відповідно в 15,1 і 2,3 рази. Зміна співвідношення колагену I і III типів виявляється зменшенням вмісту колагену III типу і незрілого колагену I типу відповідно в 2,1 і 4,2 рази на 21 добу експерименту.

ПЕРЕЛІК РОБІТ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Влияние криоконсервированной сыворотки кордовой крови и экстракта плаценты на заживление холодových ран / Г.А. Ковалёв, И.П. Высеканцев, И.О. Ищенко, Л.Г. Абрафикова, А.А. Олефиренко, Б.П. Сандомирский // Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2015. – Т. 25, № 1. – С. 57–66.

2. Морфологическая характеристика дермы при лечении ран криоконсервированной сывороткой кордовой крови / Г.А. Ковалев, И.О. Ищенко, О.В. Наумова, Н.В. Репин, Л.Н. Марченко, Т.П. Говоруха, Б.П. Сандомирский // Вісник Української медичної стоматологічної академії

«Актуальні проблеми сучасної медицини». – 2015. – Т. 15, Вип. 3(51), Част. 2. – С. 212–217.

3. Морфологическая характеристика ран вызванных криодеструкцией / Г.А. Ковалев, И.О. Ищенко, О.В. Наумова, Б.П. Сандомирский // Научные ведомости БелГУ. Серия Медицина. Фармация. – 2015. – № 22(219). Вып. 324. – С. 107–114.

4. Влияние биологически активных веществ фето-плацентарного происхождения на эпидермис в условиях криодеструкции / Г.А. Ковалев, И.О. Ищенко, О.В. Наумова, Б.П. Сандомирский // Харківська хірургічна школа. – 2015. – № 6(75). – С. 44–49.

5. Влияние криоконсервированной сыворотки кордовой крови на биохимические маркеры деструкции тканей / И.О. Ищенко, Л.Н. Тыныныка, Г.А. Ковалев, И.А. Ефимова, Б.П. Сандомирский // Експериментальна і клінічна медицина. – 2016. – № 1(70). – С. 19–25.

6. Влияние криоконсервированной сыворотки кордовой крови на заживление ран в эксперименте / И.О. Ищенко, Г.А. Ковалев, Л.Г. Абрафикова, И.П. Высеканцев, Б.П. Сандомирский // Материалы Международной заочной научно-практической конференции «Теоретические и практические аспекты современной криобиологии», Россия – Украина, Сыктывкар, 24 марта 2014 г. – С. 345–347.

7. Iefimova I. Activity of Lactate Dehydrogenase in Treating Soft Tissue Cryolesion with Biogenic Stimulators / I. Iefimova, I. Ishchenko, G. Kovalov, B. Sandomirsky // IFCC World Lab, Turkey, Istanbul, 22-26 June 2014 / Clin. Chem. Lab. Med. – 2014. – Vol. 52, Special Suppl. P. S992.

8. Ищенко И.О. Применение криоконсервированной сыворотки кордовой крови при гонартрозе и ранах / И.О. Ищенко, Г.А. Ковалёв, Б.П. Сандомирский // Актуальні питання клінічної та виробничої трансфузіології: зб. матеріалів наук.-практ. конф. з міжнар. участю, присв. 75-річчю з дня заснування Харківської обл. станції переливання крові (Харків, 5-6 черв. 2014 р.) / ред. кол.: В.В. Яворський (гол. редактор), Б.А. Рогожин, О.І. Малигон, В.І. Гончаренко. – Х.: Золоті сторінки, 2014. – С. 150–155.

9. Effect of cryopreserved cord blood serum on reparation of tissues after cryodestruction / I.O. Ishchenko, B.P. Vvedenskiy, G.A. Kovalov, I.A. Iefimova, O.V. Naumova, N.V. Dedukh, O.S. Prokopyuk, B.P. Sandomirsky // Freezing biological time: 50th Anniversary Celebration, Annual Scientific Conference & AGM 8th-10th October 2014, London. – London, 2014. – P. 36.

10. Влияние экстракта плаценты на репарацию кожи при ее низкотемпературном повреждении в эксперименте / И.О. Ищенко, Г.А. Ковалёв, Л.Г. Абрафикова, И.П. Высеканцев, А.А. Олефиренко, Б.П. Сандомирский // «Наукові та практичні аспекти хронізації неінфекційних захворювань внутрішніх органів»: Матеріали науково-практичної конференції, з міжнародною участю 6 листопада 2014 р. / за ред. Г.Ф. Фадєєнко та ін. – Х., 2014. – С. 148.

11. Wound repair with cryopreserved cord blood serum treatment / O.O. Vlasov, I.O. Ishchenko, G.A. Kovalov, O.V. Naumova, O.S. Prokopyuk,

B.P. Sandomirsky // Central European Conference on Regenerative Medicine 14-15 March 2015, Bydgoszcz, Poland. – P. 50–51.

12. Характеристика холодových ран при лечении криоконсервированной сывороткой кордовой крови / И.О. Ищенко, А.А. Власов, Г.А. Ковалев, О.В. Наумова, Б.П. Сандомирский // Проблемы криобиологии и криомедицины. – 2015. – Т. 25, № 2. – С. 194.

13. Sandomirskiy B.P. Epidermis state after cryodestruction under influence of cryopreserved cord blood serum / B.P. Sandomirskiy, I.O. Ischenko, G.A. Kovalov, O.V. Naumova // 4th International Conference on Tissue Science and Regenerative Medicine, July 27-29, 2015 Rome, Italy – P. 150.

АНОТАЦІЯ

Ищенко І.О. Використання кріоконсервованої сироватки кордової крові в лікуванні холодových ран (експериментальне дослідження) – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.01.35 – кріомедицина. – Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків – 2016.

Дисертаційна робота присвячена визначенню впливу кріоконсервованої сироватки кордової крові (КСКК) на загоєння ран після кріодеструкції. Отримані в роботі дані свідчать, що застосування КСКК має позитивний вплив на перебіг раньового процесу після кріодеструкції шкіри, що виявляється зменшенням системних проявів запалення, зниженням рівня маркерів деструкції тканин в сироватці крові і шкірі, зниженням кількості мікроорганізмів у ранах і їх ерадикацією від патогенної мікрофлори, прискоренням швидкості загоєння ран, стимуляцією утворення і визрівання сполучної тканини. Показано, що терапевтична ефективність КСКК вище, ніж у медичного препарату «Екстракт плаценти».

Дані експериментальних досліджень можуть бути використані при розробці нових методів і включені в проколи лікування ран та відморожень, що ґрунтуються на принципах регенеративно-пластичної медицини.

Ключові слова: кріоконсервована сироватка кордової крові, холодovi рани, шкіра, репарація, раньовий процес.

АННОТАЦИЯ

Ищенко И.О. Применение криоконсервированной сыворотки кордовой крови в лечении холодových ран (экспериментальное исследование). – Рукопись.

Диссертационная работа на соискание научной степени кандидата медицинских наук по специальности 14.01.35 – кріомедицина. – Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків – 2016.

Диссертационная работа посвящена определению влияния криоконсервированной сыворотки кордовой крови (КСКК) на заживление ран после кріодеструкции.

Впервые доказана возможность применения КСКК в лечении ран после криодеструкции. Показано, что ее терапевтическая эффективность выше, чем препарата сравнения «Экстракт плаценты».

Впервые выявлено, что системное введение КСКК после криодеструкции сопровождается увеличением скорости заживления ран.

Впервые показано снижение количества микроорганизмов в ранах и эрадикация их от патогенной микрофлоры под влиянием КСКК.

Впервые обнаружено, что применение КСКК снижает уровень маркеров воспаления и деструкции тканей в сыворотке крови и коже у животных с холодowymi ранами.

Впервые выявлено, что ведение животным с холодowymi ранами КСКК сопровождается уменьшением распространенности и выраженности патоморфологических проявлений в ранах.

Впервые показано, что применение КСКК после криодеструкции способствует образованию и созреванию соединительной ткани, ускоряет процесс замещения коллагена III типа на коллаген I типа, характерный для нормального заживления ран.

Введение КСКК сопровождается увеличением скорости заживления холодowych ран. Так, на 7 и 9 сутки эксперимента зафиксировано уменьшение площади ран в 2,8 раза, на 14 сутки – в 6,1 раза. На 21 сутки раны полностью закрываются. По сравнению с данными у животных не получавших лечения, максимальная скорость заживления ран выше и отмечается раньше.

Применение КСКК способствует снижению количества микроорганизмов в холодowych ранах и эрадикации их от патогенной микрофлоры. По сравнению с данными у животных не получавших лечения, на 7 и 14 сутки эксперимента количество микроорганизмов уменьшается соответственно в 3,4 и 91,1 раза. При этом, на 14 сутки эксперимента происходит эрадикация тканей от *S. capitis*, *E. faecalis*, *S. marcescens*, *P. alcalifaciens*, *S. Pyogenes*, на 21 сутки отмечается эрадикация ран от патогенной микрофлоры.

Лечение животных с холодowymi ранами КСКК снижает уровень маркеров воспаления и деструкции тканей. Уменьшение выраженности системных проявлений воспалительного процесса отражается в нормализации формулы крови на 7 сутки, снижении СОЭ в 2,0 раза на 7 и – до уровня нормы на 14 сутки, уменьшении уровня СРБ в 1,5 раза на 7 и 9 сутки и – до нормы на 14 сутки, снижении уровня ТБК - активных продуктов в сыворотке крови в 1,4 раза на 7 и – до уровня нормы на 9 сутки эксперимента. Понижение уровня маркеров деструкции тканей в сыворотке крови и коже проявляется уменьшением уровня ЛДГ в 1,5 и 1,9 раза соответственно на 7 и 9 сутки и – до значений нормы на 14 сутки эксперимента, нормализацией активности АЛТ на 7 сутки, а также понижением активности АСТ в 1,7 и 2,2 раза на 7 и 9 сутки, – до нормальных значений на 14 сутки эксперимента, уменьшением содержания ТБК - активных продуктов в коже в 1,3 раза на 7 и – до уровня нормы на 9 сутки эксперимента.

Введение животным с холодowymi ранами КСКК приводит к более быстрой, по сравнению с животными не получавшими лечения, элиминации некротизированных тканей, соответственно в 1,2 и 1,7 раза на 7 и 14 сутки

эксперимента. Уменьшается выраженность деструктивно-воспалительных осложнений раневого процесса в 2,0 и 5,0 раз, соответственно на 7 и 14 сутки эксперимента, на 21 сутки – деструктивно-воспалительные осложнения не отмечаются. Снижается выраженность деструктивно-воспалительных и дистрофических процессов в эпителии, стимулируется его репаративная регенерация. Так, на 7 сутки эксперимента дистрофические изменения эпидермиса в очагах гиперплазии встречаются в 2,0 раза реже чем у животных не получавших терапии. Толщина эпидермального пласта как в локусах гиперплазии, так и вне их уменьшается соответственно в 1,4 раза на 7, в 1,5 и 1,4 – на 14 и в 2,9 и 1,5 раза – на 21 сутки эксперимента.

Применение КСКК сопровождается ускорением образования и созревания соединительной ткани. Толщина зоны регенерата на 7 и 14 сутки эксперимента выше соответственно в 2,3 и 1,4 раза. Количество фибробластов в периферических и центральных отделах регенерата увеличивается соответственно в 2,1 и 1,9 раза на 7 и в 2,3 и 2,8 раза на 14 сутки эксперимента. Ускорение созревания соединительной ткани проявляется уменьшением содержания в ней сосудов, упорядочиванием пространственной ориентации фибробластов, снижением плотности их расположения в регенерате на 21 сутки эксперимента. Активируется синтез коллагенов, их соотношение постепенно приближается к показателям характерным для нормальной кожи. Это проявляется повышением количества коллагена III типа в 4,4 и 2,3 раза соответственно на 7 и 14 сутки эксперимента, появлением на 7 сутки незрелого и зрелого коллагенов I типа, отсутствующего у животных не получавших лечения. Происходит повышение относительного количества зрелого коллагена I типа на 14 и 21 сутки, соответственно в 15,1 и 2,3 раза. Изменение соотношения коллагенов I и III типов проявляется уменьшением содержания коллагена III типа и незрелого коллагена I типа соответственно в 2,1 и 4,2 раза на 21 сутки эксперимента.

Ключевые слова: криоконсервированная сыворотка кордовой крови, холодовые раны, кожа, репарация, раневой процесс.

ANNOTATION

Ishchenko I.O. Application of cryopreserved cord blood serum when treating cold wounds (experimental study) – Manuscript.

Dissertation for the candidate of medical science degree in specialty – 14.01.35 – cryomedicine. – Institute for problems of cryobiology and cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv – 2016.

The dissertation is devoted to investigation of the effect of cryopreserved cord blood serum (CCBS) on healing of the wounds after cryodestruction. The obtained in the research data testify to the fact that the use of CCBS has a positive impact on the course of wound process after skin cryodestruction, that is manifested in reduction of systemic signs of inflammation, decrease in the level of tissue destruction markers in blood serum and skin, lowering of the number of microorganisms in wounds and their eradication from pathogenic microflora, acceleration of wound healing rate, stimulation of the connective

tissue formation and maturation. Therapeutic efficiency of CCBS has been shown to be higher than in medical drug “Placenta extract”.

The data of experimental studies can be used when developing the new methods and be included into treatment protocols of wounds and frostbites based on the principles of regenerative plastic medicine.

Key words: cryopreserved cord blood serum, cold wounds, skin, reparation, wound process.