

УДК 611.018.54:615.014.41:616-001.18/19-002

Г.А. Ковалев<sup>1</sup>, И.О. Ищенко<sup>1</sup>, Л.Н. Тыныныка<sup>1\*</sup>, И.А. Ефимова<sup>2</sup>,  
Б.П. Введенский<sup>3,4</sup>, Б.П. Сандомирский<sup>1</sup>

## Влияние криоконсервированной сыворотки кордовой крови на системные проявления воспаления на модели холодовых ран

UDC 611.018.54:615.014.41:616-001.18/19-002

G.A. Kovalov<sup>1</sup>, I.O. Ischenko<sup>1</sup>, L.N. Tynynyka<sup>1\*</sup>, I.A. Iefimova<sup>2</sup>,  
B.P. Vvedenskiy<sup>3,4</sup>, B.P. Sandomirskiy<sup>1</sup>

## Effect of Cryopreserved Cord Blood Serum on Systemic Inflammatory Responses in Experimental Cold Wound

**Реферат:** В работе изучено влияние криоконсервированной сыворотки кордовой крови (КСКК) на системные проявления воспаления при криодеструкции кожи. Было проведено исследование показателей воспалительной реакции: скорости оседания эритроцитов (СОЭ), показателей лейкоцитарной формулы крови, уровня С-реактивного белка (СРБ) и ТБК-активных продуктов (ТБК АП) в сыворотке крови при введении КСКК человека животным с холодовыми ранами. Показано, что криоповреждение кожи крыс приводит к воспалительной реакции, которая сопровождается увеличением СОЭ в 2 раза, СРБ – в 1,5 раза на 7 и 14-е сутки наблюдения, изменением лейкоцитарной формулы; повышением уровня перекисных процессов в 1,4 раза на 7-е сутки, в 2,5 раза на 9-е сутки, в 1,9 раза на 14-е сутки и 1,5 раза на 21-е сутки. Применение КСКК сопровождалось уменьшением интенсивности воспалительного ответа на криодеструкцию кожи у экспериментальных животных, о чем свидетельствовали снижение уровня СРБ в 1,5 раза на 7 и 9-е сутки и его нормализация на 14-е сутки; уменьшение СОЭ в 2 раза на 7-е сутки и его нормализация на 14-е сутки; нормализация лейкоцитарной формулы крови на 7-е сутки; снижение уровня ТБК АП в 1,4 раза на 7-е сутки и его нормализация на 9-е сутки.

**Ключевые слова:** криоповреждение, криоконсервированная сыворотка кордовой крови, С-реактивный белок, лейкоцитарная формула, скорость оседания эритроцитов, перекисные процессы.

**Реферат:** У роботі вивчено вплив криоконсервованої сироватки кордової крові (КСКК) на системні прояви запалення при криодеструкції шкіри. Було проведено дослідження показників запальної реакції: швидкості осідання еритроцитів (ШОЕ), показників лейкоцитарної формули крові, рівня С-реактивного білка (СРБ) і ТБК-активних продуктів (ТБК АП) у сироватці крові при введенні КСКК людини тваринам із холодовими ранами. Показано, що криопшкодження шкіри щурів призводить до запальної реакції, яка супроводжується збільшенням ШОЕ в 2 рази, СРБ – в 1,5 рази на 7 і 14-ту добу спостереження, зміною лейкоцитарної формули; підвищенням рівня перекисних процесів у 1,4 рази на 7-му добу, в 2,5 рази на 9-ту добу, в 1,9 рази на 14-ту добу і в 1,5 рази на 21-шу добу. Застосування КСКК супроводжувалося зменшенням інтенсивності запальної відповіді на криодеструкцію шкіри у експериментальних тварин, про що свідчили зниження рівня СРБ в 1,5 рази на 7-му та 9-ту добу і його нормалізація на 14-ту добу; зменшення ШОЕ в 2 рази на 7-му добу і його нормалізація на 14-ту добу; нормалізація показників лейкоцитарної формули крові на 7-му добу; зниження рівня ТБК АП у 1,4 рази на 7-му добу і його нормалізація на 9-ту добу.

**Ключові слова:** криопшкодження, криоконсервована сироватка кордової крові, С-реактивний білок, лейкоцитарна формула, швидкість осідання еритроцитів, перекисні процеси.

**Abstract:** The effect of cryopreserved cord blood serum on systemic inflammatory responses following skin cryodestruction was studied. The investigation comprised the assessment of inflammation response indices: erythrocyte sedimentation rate, leukogram, amount of C-reactive protein and TBA reactive substances in blood serum after the treatment with the human cryopreserved cord blood serum of animals with cold wounds. It has been shown that cryodamage of rat skin led to an inflammation response accompanied with a two-fold erythrocyte sedimentation rate, 1.5 elevation of C-reactive protein to observation days 7 and 14, changes in leukogram; 1.4 rise in the level of peroxidation processes to day 7, 2.5 times to day 9, 1.9 times to day 14 and 1.5 times to day 21. Application of cryopreserved cord blood serum resulted in a reduced intensity of inflammation response to skin cryodestruction in experimental animals, that was confirmed by a 1.5 time decrease in the level of C-reactive protein to days 7 and 9, and its normalization to day 14; 2.0 times diminishing of erythrocyte sedimentation rate to day 7 and its normalization to day 14; normalization of leukogram to day 7; 1.4 times reduction of TBA reactive product level to day 7 and its normalization to day 9.

**Key words:** cryodamage, cryopreserved cord blood serum, C-reactive protein, leukogram, erythrocyte sedimentation rate, peroxidation processes.

<sup>1</sup>Отдел экспериментальной криомедицины, Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

<sup>2</sup>Харьковская областная клиническая травматологическая больница, г. Харьков

<sup>3</sup>Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина, г. Харьков

<sup>4</sup>ХКБ ЖДТ №2 Филиала «ЦЗ» ПАО «Укрзалізниця», г. Харьков

\*Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:

ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61016;  
тел.: (+38 057) 373-74-35, факс: (+38 057) 373-59-52,  
электронная почта: cryo@online.kharkov.ua

Поступила 27.09.2016

Принята в печать 31.01.2017

<sup>1</sup>Department of Experimental Cryomedicine, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

<sup>2</sup>Kharkiv Regional Clinical Traumatological Hospital, Kharkiv, Ukraine

<sup>3</sup>V.N. Karazin Kharkiv National University, Kharkiv, Ukraine

<sup>4</sup>Kharkiv Railway Clinical Hospital №2, Health Care Center Branch of the Ukrainian Railways PJSC, Kharkiv, Ukraine

\*To whom correspondence should be addressed:

23, Pereyaslavskaya str., Kharkiv, Ukraine 61016;  
tel.: +380 57 3737435, fax: +380 57 373 5952,  
e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Received October, 27, 2016

Accepted January, 31, 2017

Известно, что холодовые повреждения у человека и животных являются тяжелой формой патологии. Они проявляются в развитии локальных сосудисто-тканевых изменений и сопровождаются системным воспалительным ответом, интенсивность которого зависит от степени повреждения тканей [6, 9]. В последнее время по данным ВОЗ установлена тенденция к увеличению числа пострадавших от холодовой травмы в регионах с умеренным климатом. Лечение таких пациентов на сегодняшний день является сложной и многоплановой медико-социальной проблемой, поскольку отморожения приводят к потере трудоспособности, требуют длительной реабилитации и зачастую являются причиной пожизненной инвалидности. Лечение таких больных основано на местном и системном применении препаратов, выбор которых зависит от тяжести холодовой травмы и стадии патологического процесса [6, 9]. Местное воздействие (антисептики, протеолитические ферменты, мази, лазерное излучение, УФ-лучи) способствует репарации тканей, а общее (иммуно- и биостимуляторы, витамины, производные пиримидинов, антиоксиданты) повышает неспецифическую резистентность организма. Однако такой вид терапии имеет ряд недостатков: опасность развития аллергических реакций, необходимость контроля показателей коагулограммы, риск нарушений системы гомеостаза [1, 2, 6, 9]. Один из возможных путей решения указанных проблем – применение криоконсервированной сыворотки кордовой крови (КСКК), которая обладает потенциальной способностью стимулировать пролиферацию и дифференцировку клеток [5, 7]. Так, использование КСКК при лечении синдрома диабетической стопы позволяет уменьшить дозу вводимого инсулина, способствует коррекции тяжелых биохимических и иммунологических нарушений. Отмечена эффективность КСКК при лечении острого панкреатита за счет стимуляции процессов репарации тканей поджелудочной железы [5, 7].

Анализ показателей системной воспалительной реакции в крови имеет диагностическое и прогностическое значение, по их динамике можно судить об эффективности проводимой терапии. Так, выраженность воспалительной реакции организма на возникновение и развитие различных патологических состояний традиционно оценивается по скорости оседания эритроцитов (СОЭ) [6, 9, 13]. Изменение показателей лейкоцитарной формулы (ЛФ) и уровня перекисного окисления липидов (ПОЛ) в крови является стандартным критерием, характеризующим активность воспалительного ответа. Мониторинг уровня С-реактивного белка (СРБ) в сыворотке крови – важный скрининговый

Cold injuries in humans and animals refer to severe pathological states. They are manifested in development of local vascular and tissue changes and accompanied with a systemic inflammatory response, the intensity of which depends on severity of tissue damage [9, 13]. According to the WHO data there is recent trend of increasing the number of people suffering of cold trauma observed in the regions with a temperate climate. The treatment of these patients is to date a complicated and diverse problem in terms of medicine and every day life, since the frostbites lead to a disability, require a long term rehabilitation and are often the cause of lifelong disability. The treatment of these patients is based either on local or/and systemic application of the drugs, the choice of those depends on the severity of tissue damage [9, 13]. Local treatment (antiseptics, proteolytic enzymes, ointments, laser, UV rays) contributes to the regeneration of tissues and a general one (immune and biostimulants, vitamins, pyrimidine derivatives, antioxidants) increases the nonspecific resistance of the body. However, this type of therapy has a number of disadvantages, *e. g.* the risk of development of allergic reactions, the need of constant monitoring of coagulogram indices, risk of disordered homeostasis, required prevention of microbial contamination [1, 3, 9, 13]. One of the ways of solving these problems is the use of cryopreserved cord blood serum (CCBS), which was reported as possessing the potential to stimulate cell proliferation and differentiation [6, 11]. In particular, the application of CCBS in treatment of diabetic foot syndrome can reduce the dose of insulin expenditure, and contributes to the correction of severe biochemical and immunological disorders. The effectiveness of CCBS in treatment of acute pancreatitis was associated with stimulation of reparative processes in pancreatic tissues [6, 11].

The analysis of the indices of systemic inflammatory reaction in blood is of diagnostic and prognostic significance, and the success of performed therapy can be likely judged by their dynamics. For example, the severity of the body's inflammatory response to the onset and development of various pathologies is assessed using one of the standard laboratory methods, the erythrocyte sedimentation rate (ESR) [5, 9, 13]. The change in parameters of the leukogram (LG) and the level of lipid peroxidation (LPO) in the blood is the standard criterion, characterising the activity of inflammatory response. Monitoring the level of C-reactive protein (CRP) in serum is an important screening test in the diagnosis of organic lesions of organs and tissues, as well as in determining the activity of the inflammatory process. Thus, the monitoring of laboratory indices can be used to estimate the inflammation activity and grounds for the combined therapy.



тест в диагностике органических поражений органов и тканей, а также в определении активности воспалительного процесса. Таким образом, мониторинг лабораторных показателей может быть использован для оценки активности воспаления и обоснования комплексной терапии [1, 3, 13].

Целью работы является комплексное исследование показателей воспалительной реакции: скорости оседания эритроцитов, показателей лейкоцитарной формулы крови, уровня С-реактивного белка и содержания ТБК-активных продуктов в сыворотке крови при введении КСКК человека животным с холодowymi ранами.

### Материалы и методы

Работу выполняли на крысах породы «Сфинкс» в соответствии с требованиями комитета по биоэтике (ИПКК НАН Украины, Харьков), согласованными с директивой Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22.09.2010.

Раны моделировали на латеральной поверхности бедра, для чего использовали криоинструмент с активноохлаждаемым аппликатором ( $-195^{\circ}\text{C}$ ) с диаметром 8,0 мм. Длительность криодействия составляла 60 с.

Животные были разделены на три группы по 10 особей в каждой. Контрольной группе (КГ) крыс вводили физиологический раствор (0,15 М раствор хлорида натрия, «Юрия-Фарм», Украина), экспериментальной группе (ЭГ) – КСКК человека (предоставлена низкотемпературным банком ИПКК НАН Украины). Животные интактной группы (ИГ) никаким воздействиям не подвергались. Схема введения соответствовала инструкции для применения медицинского иммунобиологического препарата «Криоцелл-криокорд» (ГП «Межведомственный научный центр криобиологии и криомедицины НАН, АМН и МОЗ Украины»), содержащего сыворотку кордовой крови. Инъекции начинали на 3-и сутки после криодеструкции через день по 0,1 мл/кг массы тела внутримышечно (в здоровую лапу) на протяжении 9 дней. Дозировку рассчитывали, как описано в работе Ю.Р. Рыболовлева [8].

Скорость оседания эритроцитов в крови крыс измеряли микрометодом Панченкова [4, 11]. Показатели ЛФ определяли путем подсчета 500 клеток (микроскоп «Granum R 4003», Китай) в мазках, окрашенных азур-эозином по методу Романовского-Гимзы [4]. Уровень СРБ в сыворотке крови определяли методом латексной агглютинации, используя наборы «Гранум» (Украина). Уровень продуктов ПОЛ в сыворотке крови крыс оценивали по содержанию активных продуктов реакции с тиобарбитуровой кислотой (ТБК АП) на спектрофотометре «Hitachi-U3210» (Япония) [10].

The research aim was a comprehensive study of inflammatory response parameters: erythrocyte sedimentation rate, blood leukogram, C-reactive protein level and TBA-reactive substances' content in blood serum following treatment with human CCBS of the animals with cold wounds.

### Materials and methods

The work was carried out on in Sphinx rats in accordance with the requirements of the Committee in Bioethics (Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv), coordinated with the Directive of the European Parliament and the Council of the European Union dated of September 22<sup>nd</sup>, 2010.

The wounds were modeled on lateral surface of the femur, using a cryoinstrument with an actively cooled applicator ( $-195^{\circ}\text{C}$ ) with a diameter of 8.0 mm. The duration of cryoexposure was 60 seconds.

The animals were divided into three groups of 10 individuals each. The control group (CG) of the rats were injected with physiological saline (0.15 M sodium chloride solution, Yuriya-Pharm, Ukraine), the experimental group (EG) was treated with human CCBS (procured according to technological regulations, developed at the IPC&C of the National Academy of Sciences of Ukraine). The animals of intact group (IG) were not subjected to any influences. The administration protocol was in accordance with the instructions for the application of the medical immunobiological preparation Cryocell-Cryocord (Interdepartmental Scientific Center of Cryobiology and Cryomedicine of the NAS, AMS and Ministry of Health Care of Ukraine) containing the serum cord blood. The injections were started on the 3<sup>rd</sup> day after cryodestruction every other day by 0.1 ml/kg of body weight intramuscularly (into a healthy paw) for 9 days. The dosage was calculated as described by Yu.R. Rybolovlev [10].

The erythrocyte sedimentation rate in the blood of rats was measured by Panchenkov's micromethod [8, 12]. The parameters of blood leukogram were determined by counting 500 cells (using microscope Granum R 4003, China) in the smears stained with azur-eosin, according to Romanowsky-Giemsa [3]. The level of C-reactive protein in the blood serum was determined by latex agglutination using the Granum kits (Ukraine). The level of lipid peroxidation products in the blood serum of rats was evaluated by the content of the products reacting with thiobarbituric acid (TBARS) using a spectrophotometer Hitachi-U3210 (Japan) [2].

The statistical processing was performed using the Excel 2003 software (Microsoft, USA), SPSS v.10.0 (SPSS Inc., USA) and the nonparametric Mann-Whit-



Статистическую обработку выполняли с помощью пакета программ «Excel 2003» («Microsoft», США), «SPSS v.10.0» («SPSS Inc.», США), используя непараметрический критерий Манна-Уитни. Различия между выборками считали значимыми при  $p < 0,05$ .

### Результаты и обсуждение

Результаты измерения СОЭ у животных в разные сроки наблюдения представлены на рис 1. На 7-е сутки эксперимента во всех группах были зафиксированы значения СОЭ, статистически значимо превышавшие показатели в ИГ, что можно считать проявлением ответа острофазных белков при воспалительной реакции на криповреждение покровных тканей. В крови животных КГ значение СОЭ составляло  $(12,9 \pm 0,9)$  мм/ч, что в 4,7 раза превышало исследуемый показатель в ИГ. После введения КСКК показатель СОЭ снизился в 2,0 раза по сравнению с таковым у животных КГ. На 14-е сутки эксперимента данный показатель статистически значимо уменьшился в крови животных как в КГ, так и ЭГ. На 14-е сутки наблюдения в КГ он составил  $(7,6 \pm 0,8)$  мм/ч, что в 2,8 раза больше, чем у животных ИГ. Введение КСКК способствовало нормализации исследуемого показателя, который был в 2,2 раза меньше, чем у животных КГ. На 21-е сутки эксперимента значения СОЭ у животных КГ и ЭГ нормализовались. Таким образом, о терапевтической эффективности введения КСКК свидетельствовали уменьшение значения СОЭ в крови крыс на 7-е сутки и его нормализация на 14-е сутки наблюдения.

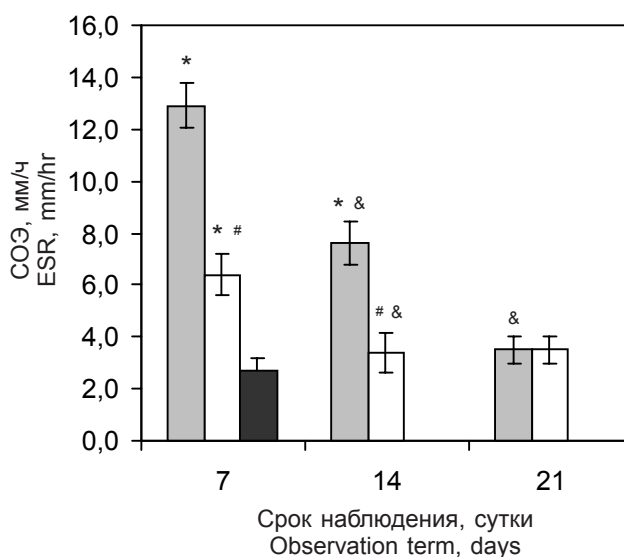
Результаты исследования показателей ЛФ крови экспериментальных животных представлены в таблице. На 7-е сутки эксперимента суммарное количество нейтрофилов в крови животных КГ было в 1,5 раза больше, чем в ИГ. Имело место увеличение количества как сегментоядерных (в 1,5 раза), так и палочкоядерных (в 1,6 раза) форм клеток. На фоне увеличения количества нейтрофилов была зафиксирована относительная лимфопения – количество лимфоцитов было в 1,2 раза меньше, чем в ИГ. У животных ЭГ исследуемый показатель был в пределах нормы. Установлено, что у крыс КГ и ЭГ на 14-е сутки ЛФ крови соответствовала значениям ИГ. Таким образом, на 14-е сутки эксперимента зафиксирована нормализация процентного соотношения лейкоцитов, даже при отсутствии лечения, что подтверждает у крыс активность процессов репарации. После введения КСКК крысам с холодowymi ранами показатели ЛФ крови соответствовали норме уже на 7-е сутки эксперимента.

Результаты исследований уровня СРБ в сыворотке крови показали, что на 7-е сутки наблюдения

не различались. Различия между образцами были рассмотрены как значимые при  $p < 0,05$ .

### Results and discussion

The results of measuring the ESR in animals at different observation terms are shown in Fig. 1. To day 7 of the experiment, the ESR values in all the group significantly exceeded the indices in the IG, and this can be considered as a manifestation of acute phase proteins during the inflammatory response to cryodamage of integumentary tissues. In the blood of the CG animals, the value of ESR was  $(12.9 \pm 0.9)$  mm/hr, which was 4.7 times higher than that of the IG. After the CCBS administration, the coefficient of ESR decreased twice if compared to that of the CG animals. To day 14 of the experiment, this index was significantly decreased in the blood of animals in both CG and EG. On the 14<sup>th</sup> day of observation it was  $(7.6 \pm 0.8)$  mm/hr in CG, and it was 2.8 times higher comparing to the IG animals. Introduction of the CCBS contributed to the normalization of the studied index, which was 2.2 times less than in the CG animals. To day 21 of the experiment, the values of ESR in the CG and EG animals were back to the norm. Thus, the therapeutic efficiency of the CCBS administration was confirmed by a decrease in the ESR value in the blood of rats to day 7 and its normalization on the 14<sup>th</sup> day of observation.



**Рис. 1.** СОЭ в крови животных с холодowymi ранами: ■ – контроль, □ – экспериментальная группа, ■ – интактная группа; \* – отличия статистически значимы по сравнению с интактными животными (\*), контролем (#) и соответствующей группой на предыдущем сроке наблюдения (&),  $p < 0,05$ .

**Fig. 1.** ESR in blood of animals with cold wounds: ■ – control, □ – experimental group, ■ – intact group; \* – difference are significant if compared with intact group (\*), control (#), corresponding group at previous observation term (&),  $p < 0.05$ .



Показатели лейкоцитарной формулы крови у экспериментальных животных, (%)  
Leukogram in blood of experimental animals, (%)

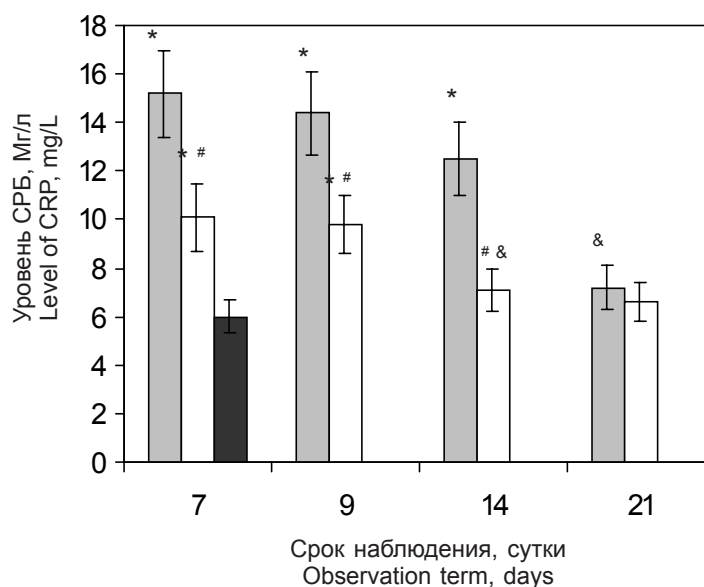
Группа Group	Лейкоциты Leukocytes						
	Всего нейтрофилов Total neutrophils	Палочкоядерные нейтрофилы Band cell	Сегментоядерные нейтрофилы Segmented neutrophils	Эозинофилы Eosinophils	Базофилы Basophils	Лимфоциты Lymphocytes	Моноциты Monocytes
Интактные животные Intact animals	23,0 ± 2,5	2,7 ± 0,4	20,3 ± 2,5	1,6 ± 0,1	0,2 ± 0,4	71,0 ± 2,9	4,2 ± 0,7
7-е сутки Day 7							
Контроль Control	35,1 ± 4,4*	4,2 ± 0,7*	30,9 ± 3,9*	1,6 ± 0,2	0,3 ± 0,5	58,7 ± 4,9*	4,3 ± 0,6
Экспериментальные животные Experimental animals	25,4 ± 4,0 <sup>#</sup>	3,0 ± 0,5 <sup>#</sup>	22,4 ± 3,7 <sup>#</sup>	1,7 ± 0,2	0,1 ± 0,3	68,7 ± 4,3	4,2 ± 0,7
14-е сутки Day 14							
Контроль Control	25,1 ± 3,2 <sup>&amp;</sup>	2,8 ± 0,5 <sup>&amp;</sup>	22,3 ± 3,2 <sup>&amp;</sup>	1,5 ± 0,2	0,2 ± 0,4	68,9 ± 3,1 <sup>&amp;</sup>	4,3 ± 0,6
Экспериментальные животные Experimental animals	25,3 ± 4,2	2,9 ± 0,5	22,4 ± 3,7	1,6 ± 0,2	0,3 ± 0,7	68,4 ± 4,0	4,4 ± 0,5

**Примечание:** \* – отличия статистически значимы по сравнению с интактными животными (\*), контролем (<sup>#</sup>), соответствующей группой на предыдущем сроке наблюдения (<sup>&</sup>),  $p < 0,05$ .

**Note:** \* – the differences are statistically significant if compared with intact group (\*), control (<sup>#</sup>), corresponding group at previous observation term (<sup>&</sup>),  $p < 0.05$ .

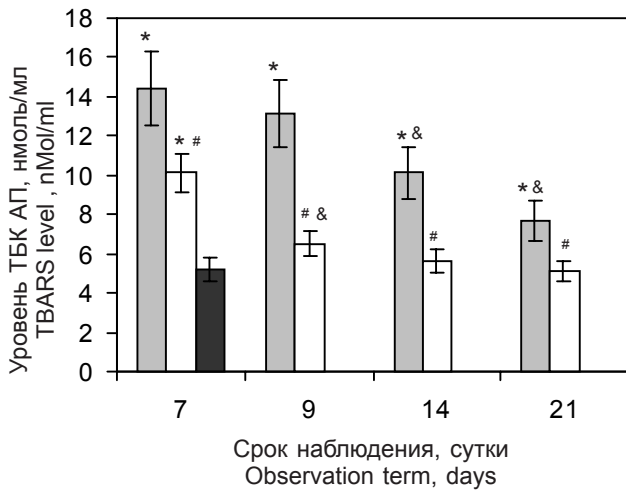
у животных КГ он составил (15,2 ± 1,8) мг/л, что в 2,5 раза выше, чем в ИГ (рис. 2). Введение КСКК способствовало снижению уровня СРБ в 1,5 раза на 7 и 9-е сутки наблюдения. На 14-е сутки его содержание в сыворотке крови животных КГ значительно не отличалось от показателей на 9-е сутки. На 14-е сутки после введения КСКК установлена нормализация данного показателя, о чем свидетельствовало отсутствие статистически значимых отличий по сравнению с ИГ. На 21-е сутки наблюдения уровень СРБ у животных всех групп соответствовал результатам ИГ. Таким образом, позитивное влияние КСКК проявлялось в статистически значимом уменьшении уровня СРБ на 9-е сутки наблюдения с его нормализацией на 14-е сутки.

Изменение уровня ТБК АП в сыворотке крови животных в ходе эксперимента представлено на рис. 3. Исследуемый показатель интактных животных составил (5,21 ± 0,61) нмоль/мл. Уровень ТБК АП в сыворотке крови крыс КГ на 7-е сутки наблюдения был в 2,8 раза выше, чем у животных ИГ. Введение КСКК способст-



**Рис. 2.** Уровень СРБ в сыворотке крови экспериментальных животных: ■ – контроль, □ – экспериментальная группа, ■ – интактная группа; \* – отличия статистически значимы по сравнению с интактными животными (\*), контролем (<sup>#</sup>) и соответствующей группой на предыдущем сроке наблюдения (<sup>&</sup>),  $p < 0,05$ .

**Fig. 2.** Level of CRP in blood serum of experimental animals: ■ – control, □ – experimental group, ■ – intact group; \* – difference are significant if compared with intact group (\*), control (<sup>#</sup>), corresponding group at previous observation term (<sup>&</sup>),  $p < 0.05$ .



**Рис. 3.** Уровень ТБК АП в сыворотке крови экспериментальных животных: ■ – контроль, □ – экспериментальная группа, ■ – интактная группа; \* – отличия статистически значимы по сравнению с интактными животными (\*), контролем (#) и соответствующей группой на предыдущем сроке наблюдения (&),  $p < 0,05$ .

**Fig. 3.** Level of TBARS in blood serum of experimental animals: ■ – control, □ – experimental group, ■ – intact group; \* – difference are significant if compared with intact group (\*), control (#), corresponding group at previous observation term (&),  $p < 0.05$ .

вовало уменьшению исследуемого показателя в 1,4 раза. На 9-е сутки наблюдения уровень ТБК АП в сыворотке крови крыс КГ был в 2,5 раза больше, чем в ИГ. После введения КСКК отмечалась его нормализация, что подтверждалось отсутствием статистически значимых отличий от результатов, полученных в ИГ. У животных ЭГ на 9-е сутки эксперимента были отмечены статистически значимые отличия по сравнению с результатами предыдущего срока наблюдения. На 14-е сутки после введения КСКК уровень ТБК АП в сыворотке крови крыс соответствовал норме. У животных КГ уровень ТБК АП превышал в 1,9 раза значения, полученные в ИГ. В КГ также были отмечены статистически значимые отличия исследуемого показателя по сравнению с предыдущим сроком наблюдения. Введение КСКК способствовало нормализации уровня ТБК АП на 21-е сутки наблюдения. При этом в КГ исследуемый показатель был в 1,5 раза выше, чем в ИГ, и имел статистически значимые отличия по сравнению с результатами предыдущего срока наблюдения. Таким образом, введение КСКК способствовало нормализации уровня ТБК АП в сыворотке крови животных с холодowymi ранами на 9-е сутки эксперимента.

После моделирования холодowych ран на 7, 9 и 14-е сутки эксперимента у животных КГ отмеча-

The results of studying the blood LG values of experimental animals are presented in the Table. To day 7 of the experiment, the total number of neutrophils in blood of the animals was 1.5 times higher than in the IG. The rise in the numbers of both segmented (in 1.5 times) and band neutrophils (in 1.6 times). On the background of an increased number of neutrophils a relative lymphopenia was noticed, *i. e.* the number of lymphocytes was 1.2 times less than in IG. In the EG animals the studied index was normal. It was found that in the rats of CG and EG to day 14 the blood LG corresponded to the values of IG. Thus to day 14 of experiment we observed normalization of the percentage of leukocytes even with no treatment, that confirmed a proceeding active reparation. Thus, after the administration of the CCBS to the rats with cold wounds, the blood LG values corresponded to the norm already to day 7 of the experiment.

The results of studies of the CRP level in blood serum showed that to day 7 of observation it was  $(15.2 \pm 1.8)$  mg/l in the animals of CG, and this was 2.5 times higher than in the IG (Fig. 2). Introduction of the CCBS contributed to a 1.5 times decrease in the level of CRP to days 7 and 9 of observation. To day 14 its content in the blood serum of the CG animals did not significantly differ from the indices to day 9. On the 14<sup>th</sup> day after the administration of the CCBS, the normalization of this index was found, as evidenced by the absence of statistically significant differences in comparison with the IG. To day 21 of observation, the level of CRP in the animals of all groups was consistent with the results of the IG. Thus, a positive effect of the CCBS was manifested in a statistically significant decrease in the level of CRP to day 9 of observation with its coming back to the norm to the 14<sup>th</sup> day.

The change in the level of TBARS in the blood serum of animals during the experiment is shown in Fig. 3. The studied value in the serum of intact animals was  $(5.21 \pm 0.61)$  nmol/ml. The TBARS level in blood serum of the CG rats to day 7 of observation was 2.8 times higher than in animals of the IG. The CCBS introduction contributed to a 1.4 times decrease in the studied index. On the 9<sup>th</sup> day of observation, the level of TBARS in the serum of rats in the CG was 2.5 times higher than in the IG. After the CCBS administration its normalization was noted, which was confirmed by the absence of statistically significant differences comparing to the data obtained in the IG. On the 9<sup>th</sup> day of the experiment we have noted the significant differences in the EG animals comparing to the previous observation period. To day 14 after the administration of CCBS, the level of TBARS in the blood serum of rats was in accordance with the norm. In the CG animals, the level of TBARS exceeded 1.9 times the



лось повышение показателя СОЭ, уровня СРБ и ПОЛ, а после введения КСКК выраженность системных проявлений воспаления в ответ на криодеструкцию кожи снижалась. Это свидетельствовало о нормализации уровня СРБ и СОЭ на 14-е сутки эксперимента, а также о нормализации показателей ЛФ крови на 7-е сутки и уровня ТБК АП на 9-е сутки.

Известно, что нормальные значения СОЭ свидетельствуют об отсутствии воспалительного процесса. При этом увеличение СОЭ, хотя и не является специфическим показателем для какого-либо определенного заболевания, может быть подтверждением эффективности проводимой терапии [11, 12]. Нами было установлено, что после введения КСКК показатель СОЭ снижался в 2 раза уже на 7-е сутки эксперимента. Очевидно, это способствовало элиминации острофазных и фибриноподобных белков с мембраны эритроцита, которые ослабляют на ней электростатический заряд. Одним из основных представителей острофазных белков, определяющих активность воспалительного процесса, является СРБ, участвующий в распознавании потенциально токсичных веществ, и удалении их из крови [11, 13, 14]. Терапевтическая эффективность КСКК может проявляться на любом уровне регуляции (молекулярном, клеточном, системном) в виде угнетения воспалительных процессов в тканях и усиления репарации. Так, влияние КСКК может осуществляться посредством взаимодействия ее компонентов с медиаторами воспаления, что способствует торможению синтеза острофазных белков и частичному восстановлению нативной конформационной формы молекул белков [2,7]. Кроме того, воздействие КСКК на воспалительные процессы в холодовых ранах может проявляться в снижении уровня провоспалительных цитокинов, уменьшении гиперкоагуляции с сопутствующей активацией фибринолиза, а также стимуляции индуктивной и продуктивной фаз иммунного ответа. Учитывая высокую корреляцию уровня СРБ с тяжестью заболевания, этот показатель можно считать более надежным «маркером» воспаления, чем СОЭ и лейкоцитарная формула [12]. Так, различные популяции лейкоцитов участвуют в процессах пато- и саногенеза при различных патологических состояниях, в частности в возникновении и развитии воспалительной реакции. Поскольку нейтрофильные лейкоциты являются основными клетками, которые обеспечивают противомикробную защиту, то увеличение их суммарного количества, особенно количества палочкоядерных нейтрофилов, указывает на активный воспалительный процесс в инфицированных ранах [12]. Обнаруженная лимфопения имеет относительный характер и без определения абсолютного коли-

values obtained in IG. In the CG we have also observed the statistically significant differences compared with the previous observation period. The introduction of the CCBS contributed to the normalization of the TBARS level to day 21 of observation. At the same time the CG had the 1.5 times higher index comparing to the IG, and significant differences comparing with the results of the previous observation period. Thus, the administration of CCBS contributed to the normalization of the level of TBARS in the serum of animals with cold wounds to day 9 of the experiment.

After modeling the cold wounds to days 7, 9 and 14 of the experiment in the animals of the CG we found a rise in the ESR, CRP and LPO indices and after the administration of the CCBS the severity of systemic manifestations of inflammation in response to cryodestruction of the skin was decreased. That testified to the normalization of the level of CRP and the values of ESR in the blood to day 14 of the experiment, as well as in the normalization of blood LG values to day 7 and the TBARS level to day 9.

It is known that normal values of ESR testify to the absence of any inflammation. Thus the restoration of previously decreased ESR may demonstrate the effectiveness of the therapy, although it could not be a specific indicator for any particular disease [7, 12]. We have found that administration of the CCBS was followed by a double decrease of the ESR index already to day 7 of the experiment. Obviously, this facilitated the elimination of acute-phase and fibron-like proteins from the erythrocyte membrane. These proteins are weakening a membrane electrostatic charge. One of the main representatives of acute-phase proteins, determining the activity of inflammatory process, is CRP, which activity lies in detection of potentially toxic substances, and their removal from blood [5, 7, 12]. Therapeutic effectiveness of CCBS can be manifested at any level of regulation (molecular, cellular, systemic) in the form of suppression of inflammatory processes in tissues and enhancement of the reparation. For example, the action of CCBS can be mediated by the interaction of the serum components with mediators of inflammation, that contributes to an inhibition of the synthesis of acute-phase proteins and partial restoration of native pentameric conformational form of the protein molecules [3, 11]. In addition, the effect of the CCBS on inflammatory processes in cold wounds is manifested in a decrease of the proinflammatory cytokines level, reduced hypercoagulation accompanied by concomitant activation of fibrinolysis, and stimulation of inductive and productive phases of an immune response. A high correlation of the CRP level with the disease severity can be considered a more reliable marker of inflammation if compared with the parameters of ESR and the

чества лимфоцитов диагностической ценности не представляет.

Концентрация ТБК АП в сыворотке крови свидетельствует об активности процессов ПОЛ в организме, сопровождающихся повреждением клеточных мембран, а, следовательно, нарушением активного и пассивного транспорта ионов, затруднением переноса протонов по дыхательной цепи митохондрий и, в итоге, развитием гипоксических изменений в тканях [1]. Лейкоциты, особенно нейтрофилы, являясь богатым источником различных активных форм кислорода (супероксид анион, гидроксилрадикал, синглетный кислород, перекись водорода), также вносят вклад в повышение активности перекисных процессов в сыворотке крови [12]. Возникновение и развитие воспаления, в том числе при холодовой травме, сопровождаются появлением микросреды с повышенной прооксидантной активностью и, соответственно, нарушением баланса между продукцией свободных радикалов и механизмами антиоксидантного контроля. Это может приводить к деполяризации клеточных мембран, гипертрофии, апоптозу, некрозу ткани [1, 3]. Окисление липидов сопровождается появлением хемоаттрактантов, усиливающих миграцию макрофагов в очаг воспаления [2, 5]. В конечном итоге повреждающее действие продуктов ПОЛ приводит к деструкции клеток, снижению репарационных возможностей тканей.

Таким образом, позитивное влияние КСКК может быть обусловлено действием биологически активных веществ, входящих в ее состав и обладающих разной активностью. Обнаруженный терапевтический эффект может быть обусловлен влиянием КСКК на процессы клеточного метаболизма (стимуляция поступления кислорода, активация окислительного фосфорилирования и транспорта глюкозы в клетки, повышение энергообразования, угнетение процессов ПОЛ), прямой антиоксидантной активностью, способностью стабилизировать биомакромолекулы, определяющие активность регуляторных систем [2].

## Выводы

У крыс после криоповреждения кожи на 7 и 14-е сутки развивалась воспалительная реакция, которая сопровождалась увеличением СОЭ (в 2 раза), СРБ (в 1,5 раза), изменением лейкоцитарной формулы, повышением уровня перекисных процессов на 7-е сутки (в 1,4 раза), 9-е сутки (в 2,5 раза), 14-е сутки (в 1,9 раза), 21-е сутки (в 1,5 раза).

У экспериментальных животных после применения КСКК снижалась интенсивность воспали-

leukogram [7]. Various populations of leukocytes are involved into patho- and sanogenesis under several pathological conditions, as well as in the onset and development of an inflammatory reaction. Since neutrophilic leukocytes are the main cells that provide antimicrobial protection, an increase in their total number, in particular that of band neutrophils, indicates an active inflammation in infected wounds [7]. The found lymphopenia has a relative character and does not have diagnostic value without determining an absolute number of lymphocytes.

The concentration of TBARS in blood serum reflects the activity of LPO processes in an organism, which are accompanied with cell membranes damage, and, consequently, the disorder of active and passive ion transport, the complications in proton transfer through the mitochondrial respiratory chain and, finally, the development of hypoxic changes in tissues [1]. Leukocytes, especially neutrophils, being a rich source of various active species of oxygen (superoxide anion, hydroxyl radical, singlet oxygen, hydrogen peroxide), also contribute to an increase in the activity of peroxide processes in blood serum [7]. The emergence and development of inflammation, including the one accompanying cold trauma, results in an active prooxidant milieu and, accordingly, an impaired balance between the production of free radicals and the mechanisms of antioxidant control. This can lead to depolarization of cell membranes, hypertrophy, apoptosis, tissue necrosis [1, 4]. Oxidation of lipids is accompanied with appearance of chemoattractants enhancing the migration of phagocytes into the inflammation focus [3, 6]. Ultimately, the damaging effect of LPO products leads to cell destruction, a reduction in the repair capabilities of tissues.

Thus positive effect of CCBS can be caused by biologically active substances, being its components and having a versatile activity. The revealed therapeutic effect can be stipulated by the effect of CCBS on the processes of cell metabolism (stimulation of oxygen supply, activation of oxidative phosphorylation and transport of glucose into cells, increased energy production, inhibition of LPO processes), direct antioxidant reactivity of CCBS, the capability to stabilize biomacromolecules, determining the activity of regulatory systems [3].

## Conclusions

Cryo-injury of rats' skin resulted in an inflammatory reaction to days 7 and 14, and it was accompanied with an increased ESR (two times), CRP (in 1.5 times), a change in the leukogram, an increase in the level of peroxidation processes to day 7 (in 1.4 times), to day 9 (in 2.5 times), on the 14<sup>th</sup> day (in 1.9 times), and on 21<sup>st</sup> days (in 1.5 times).





тельного ответа на криодеструкцию кожи, что проявлялось в снижении уровня СРБ в 1,5 раза на 7 и 9-е сутки и его нормализации на 14-е сутки; снижении СОЭ в 2 раза на 7-е сутки и ее нормализации на 14-е сутки; нормализации показателей формулы крови на 7-е сутки; снижении уровня ТБК АП в 1,4 раза на 7-е сутки с нормализацией на 9-е сутки эксперимента.

Перспективой дальнейших исследований может быть изучение влияния КСКК на заживление ран различного генеза.

*Выражаем благодарность заведующему отделом криобиологии систем репродукции ИПКиК НАН Украины, д-ру мед. наук, проф. О.С. Прокопюк за консультативную и организационно-методическую помощь.*

## Литература

1. Андреева Н.Н., Соловьева Т.И., Баландина М.В., Яковлева Е.И. Исследование активности процессов перекисного окисления липидов, антиоксидантной системы и ультраструктуры органов в отдаленные сроки постресuscitaионного периода // *Соврем. технол. мед.* – 2012. – №2. – С. 37–43.
2. Гулевский А.К., Абакумова Е.С., Щенявский И.И. Использование биопрепаратов в терапии ишемического повреждения сердца // *Biotechnol. Acta.* – 2013. – №2. – С. 43–57.
3. Ищенко И.О., Тыныныка Л.Н., Ковалев Г.А., Ефимова И.А. и др. Влияние криоконсервированной сыворотки кордовой крови на биохимические маркеры деструкции тканей // *Эксперимент. і клін. медицина.* – 2016. – Т. 7, №1. – С. 19–25.
4. Клиническая лабораторная аналитика: в 3 т. – Т. II. Частные аналитические технологии в клинической лаборатории / Под ред. В.В. Меньшикова. – М.: Лабинформ-РАМЛД, 1999. – 352 с.
5. Липина О.В., Мусатова И.Б., Трифонов Ю.В., Прокопюк О.С. Препарат сыворотки кордовой крови людини: клінічне застосування // *Світ медицини та біології.* – 2009. – Т. 5, №4. – С. 36–38.
6. Олейник Г.А. Патофизиология холодового шока // *Медицина неотложных состояний.* – 2013. – Т. 50, №3. – С. 16–21.
7. Прокопюк О.С., Липина О.В., Мусатова И.Б. О клинической эффективности криоконсервированной сыворотки кордовой крови человека // *Проблемы криобиологии.* – 2008. – Т. 18, №4. – С. 535–537.
8. Рыболовлев Ю.Р., Рыболовлев Р.С. Дозирование веществ для млекопитающих по константе биологической активности // *Журнал докладов АМН СССР.* – 1979. – Т. 247, №6. – С. 1513–1516.
9. Ушакова Т.А., Алексеев А.А., Крутиков М.Г., Бобровников А.Э. Маркеры воспаления в диагностике ожогового сепсиса // *Камбустиология.* – 2015. – Т. 54, №1. – С. 84–91.
10. Чевари С., Андел Г., Штрэнгер Я. Определение АО параметров крови // *Лаб. дело.* – 1991. – Т. 10. – С. 9–14.
11. Шиффман Ф.Дж. Патофизиология крови. – М.-СПб.: БИНОМ-Невский Диалект, 2000. – 448 с.
12. Lucas V., Barrera R., Duque F. et al. Effect of exercise on serum markers of muscle inflammation in Spanish Greyhounds // *Am. J. Vet. Res.* – 2015. – Vol. 76, №7. – P. 637–643.

The intensity of inflammatory response to cryo-destruction of the skin of experimental animals decreased, and this was manifested in 1.5 times reduction of CRP content to days 7 and 9, and its normalization to the 14<sup>th</sup> day; 2.0 times decrease in ESR to day 7 and its normalization to the 14<sup>th</sup> day; normalization of the blood count to day 7; the level of TBARS was 1.4 times reduced to day 7 with its normalization to the 9<sup>th</sup> day.

The prospect of further research may be associated with study of the CCBS effect on the healing of wounds of different genesis.

*We express our gratitude to the Head of the Department of Cryobiology of Reproductive Systems of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine Prof. Olga S. Prokopyuk, MD for advisory assistance.*

## References

1. Andreeva N.N., Solovyova T.I., Balandin M.V., Yakovlev E.I. Research activity of lipid peroxidation, antioxidant system and ultrastructure of organs in long-term of postresuscitative time. *Modern Tehnol Med* 2012; (2); 37–43.
2. Chevare S., Anel G., Strenger Ya. Determination of AO blood parameters. *Lab Delo* 1991; 10; 9–14.
3. Gulevsky A.K., Abakumova E.S., Schenyavsky I.I. Use of biologic preparations in the treatment of ischemic heart damage. *Biotechnol Acta* 2013; 6(2); 43–57.
4. Ischenko I.O., Tynnyka L.N., Kovalov G.A., Iefimova I.A., Sandmirsky B.P. Effect of cryopreserved cord blood serum on biochemical markers of destruction of tissues. *Experimental and Clinical Medicine* 2016; 70(1); 19–25.
5. Karamanos D., Karkos C., Kambroudis A. et al. The effect of Antithrombin-III on routine hematological and biochemical parameters in an experimental animal model of skeletal muscle ischemia-reperfusion injury. *Hippokratia* 2014; 18 (3); 234–239.
6. Lipina O.V., Musatova I.B., Trifonov Yu.V., Prokopyuk O.S. Preparation of human cord blood serum: clinical use. *Svit Meditsiny i Biologii* 2009; 5(4); 36–38.
7. Lucas V., Barrera R., Duque F. et al. Effect of exercise on serum markers of muscle inflammation in Spanish Greyhounds. *Am J Vet Res* 2015; 76 (7); 637–643.
8. Menshikov V.V., editor. *Clinical laboratory analytics. Vol. II. Special analytical technologies in clinical laboratory.* Moscow: Labinform, 1999.
9. Oleinik G.A. Pathophysiology of cold shock. *Emergency Medicine* 2013; 50(3); 16–21.
10. Rybolovlev Yu.R., Rybolovlev R.S. Dosage of substances for mammals on biological activity constant. *Zhurnal Dokladov AN SSSR* 1979; 247(6); 1513–1516.
11. Prokopyuk O.S., Lipina O.V., Musatova I.B. About clinical efficacy of cryopreserved human cord blood serum. *Probl Cryobiol* 2008; 18 (4); 535–537.
12. Schiffman F.J. *Pathophysiology of blood.* – Moscow, St. Petersburg: Benom-Nevsky Dialect, 2000. – 448 p.
13. Ushakova T.A., Alekseeva A.A., Krutikov M.G., Bobrovnikov A.E. Inflammatory markers in the diagnosis of burn sepsis. *Kambustiologiya* 2015; 54(1); 84–91.



13. Karamanos D., Karkos C., Kamaroudis A. et al. The effect of Antithrombin-III on routine hematological and biochemical parameters in an experimental animal model of skeletal muscle ischemia-reperfusion injury // Hippokratia. – 2014. – Vol. 18, №3. – P. 234–239.
14. Watson J.D., Gifford S.M., Clouse W.D. Biochemical markers of acute limb ischemia, rhabdomyolysis, and impact on limb salvage // Semin. Vasc. Surg. – 2014. – Vol. 27, №3–4. – P. 176–181.

