

UDC 616.5-001.19-092.4:615.472.832.9

Г.А. Ковалев^{1*}, А.А. Власов², М.С. Мирошніченко³, Б.П. Сандомирский¹

Экспериментальная модель криодеструкции кожи

UDC 616.5-001.19-092.4:615.472.832.9

G.O. Kovalov^{1*}, O.O. Vlasov², M.S. Myroshnychenko³, B.P. Sandomirskiy¹

Experimental Model of Skin Cryodestruction

Реферат: В работе предлагается экспериментальная модель криодеструкции кожи *in vivo*, пригодная для изучения процессов, возникающих после криохирургического лечения новообразований кожи. Для создания модели разработан оригинальный способ низкотемпературного воздействия криоинструментом – аккумулятором холода, обеспечивающим температуру в месте контакта рабочей поверхности аппликатора и кожи ниже порога криоустойчивости тканей. Представленная модель характеризуется развитием процессов деструкции и воспаления на местном и системном уровнях. Морфологические проявления на местном уровне соответствуют первой фазе раневого процесса. Отмечены признаки деструкции и воспаления с наличием зоны первичного некроза (прямое термическое повреждение), демаркационного лейкоцитарного вала, зоны вторичного некроза (результат гемодинамических нарушений). Процессы репарации поврежденных тканей проявлялись развитием грануляционной ткани. На системном уровне криодеструкция тканей сопровождалась развитием окислительного стресса (повышение содержания продуктов перекисного окисления липидов, угнетение ферментативного звена системы антиоксидантной защиты) и увеличением содержания церулоплазмينا и С-реактивного белка в сыворотке крови.

Ключевые слова: модель криодеструкции кожи, криоинструмент, температура, морфологическая характеристика тканей, окислительный стресс, церулоплазмин, С-реактивный белок.

Реферат: У роботі пропонується експериментальна модель криодеструкції шкіри *in vivo*, яка придатна для вивчення процесів, що виникають після криохірургічного лікування новоутворень шкіри. Для створення моделі розроблено оригінальний спосіб низкотемпературного впливу криоінструментом – акумулятором холоду, що забезпечує температуру в місці контакту робочої поверхні аплікатора і шкіри нижче порога криостійкості тканин. Представлена модель характеризується розвитком процесів деструкції та запалення на місцевому і системному рівнях. Морфологічні прояви на місцевому рівні відповідають першій фазі раневого процесу. Відзначалися ознаки деструкції і запалення з наявністю зони первинного некрозу (пряме термічне ушкодження), демаркаційного лейкоцитарного валу, зони вторинного некрозу (результат гемодинамічних порушень). Процеси репарації пошкоджених тканин виражалися розвитком грануляційної тканини. На системному рівні криодеструкція тканин супроводжувалася розвитком оксидантного стресу (підвищення вмісту продуктів перекисного окислення ліпідів, пригнічення ферментативної ланки системи антиоксидантного захисту) та збільшенням вмісту церулоплазміну та С-реактивного білка в сироватці крові.

Ключові слова: модель криодеструкції шкіри, криоінструмент, температура, морфологічна характеристика тканин, оксидантний стрес, церулоплазмін, С-реактивний білок.

Abstract: We suggest the *in vivo* experimental model of skin cryodestruction, suitable for studying the processes, occurring after skin neoplasm cryosurgery. To develop the model we have used low-temperature exposure using a cryoprobe, providing the temperature below the tissue cryoresistance threshold in the area of contact between the applicator working surface and skin. The initiation of destructive and inflammatory processes, both local and systemic, was observed in this model. Local morphological manifestations corresponded to the first phase of wound-healing process. We noted the destructive and inflammatory signs accompanied by primary necrosis (due to direct thermal damage), and a leukocyte bank and secondary necrosis (resulting from hemodynamic disorders). The reparative processes in injured tissues were manifested in developed granulation tissue. At a system level, the tissue cryodestruction was accompanied by the oxidative stress development (an increased content of lipid peroxidation products, a suppressed enzymatic component of antioxidant defense system) and an increased content of ceruloplasmin and C-reactive protein in blood serum.

Key words: skin cryodestruction, model, cryoprobe, temperature, tissue morphology, oxidative stress, ceruloplasmin, C-reactive protein.

В современной медицинской практике криодеструкция патологических образований кожи является общепризнанным методом хирургического лечения. Разработка новых и усовершенствование существующих способов криодеструк-

In current medical practice, the cryodestruction of skin neoplasms is a well-recognized method in surgical therapy. The designing of novel cryodestructive techniques and improving the existing ones are impossible without using *in vivo* experimental models.

¹Відділ експериментальної кріомедицини, Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

²Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна

³Харківський національний медичний університет МОЗ України

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

²V.N. Karazin Kharkov National University, Kharkiv, Ukraine

³Kharkiv National Medical University, Kharkiv, Ukraine

*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:

вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61016;
тел.: (+38 057) 373-74-35, факс: (+38 057) 373-59-52
електронна пошта: g.o.kovalyov@nas.gov.ua

*To whom correspondence should be addressed:

23, Pereyaslavka str., Kharkiv, Ukraine 61016;
tel.: +380 57 373 7435, fax: +380 57 373 5952
e-mail: g.o.kovalyov@nas.gov.ua

Надійшла 06.02.2018

Прийнята до друку 18.02.2019

Received February, 06, 2018

Accepted February, 18, 2019

© 2019 G.A. Kovalov, et al. Published by the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ции невозможны без проведения экспериментов с применением моделей *in vivo*.

Для выполнения криодеструкции кожи необходимо использовать инструмент, адекватный поставленной в исследовании задаче. С практической точки зрения наиболее удобны инструменты, конструкция которых обеспечивает устойчивую температуру криоаппликатора в процессе работы (за счет непрерывного охлаждения его рабочей поверхности), что позволяет поддерживать стабильный режим криовоздействия. Такие инструменты представляют собой высокотехнологичные устройства – криохирургические системы. Как правило, они имеют вмонтированные датчики рабочей температуры криоаппликатора и электронагреватель для экстренного отогрева [1, 15, 23]. Однако использование криохирургических систем в экспериментальных работах ограничено их высокой стоимостью, что особенно актуально при проведении исследований с небольшим бюджетом.

Конструкция инструментов, не обеспечивающих поддержание температуры аппликатора в процессе криовоздействия на заданном уровне, относительно проста, а стоимость сравнительно невысока, что определяет их доступность для исследователей. Одним из типов таких инструментов являются криоинструменты – аккумуляторы холода, холодопроизводительность которых определяется объемом и физико-химическими свойствами их рабочего тела [1]. При этом отвод тепла от зоны криовоздействия происходит за счет повышения температуры рабочего тела – хладоносителя. Охлаждение рабочего тела происходит непосредственно перед применением инструмента. Основным недостатком криоинструментов – аккумуляторов холода является то, что в процессе работы возможно быстрое повышение температуры рабочей поверхности аппликатора, что сказывается на температурном режиме воздействия.

Результативность криодеструкции патологических образований кожи обеспечивают скорость, длительность и конечная температура охлаждения [13, 14, 27]. Для получения экспериментальных моделей *in vivo*, пригодных для изучения процессов, которые возникают после криохирургического лечения патологических образований кожи у людей, необходим способ криодеструкции, обеспечивающий поддержание температуры тканей ниже порога их криоустойчивости.

Цель работы – разработка способа низкотемпературного воздействия с применением криоин-

The instrument suitable for the research task should be used for skin cryodestruction. From the practical point of view, the most convenient instruments are those, the design of which ensures a stable temperature of cryoapplicator during operation (due to continuous cooling of its working surface), which allows maintaining a stable regimen of cryoexposure. These instruments are the high-technology devices, *i. e.* the cryosurgical systems. Usually, they have the built-in sensors of cryoapplicator operating temperature and an electric heater for rapid heating [2, 5, 23]. However, the use of cryosurgical systems in experimental work is limited by their high cost, that is of especial importance for low-budget research.

The design of the instruments, which do not maintain the applicator temperature during cryoexposure at the fixed level, is quite simple, and their cost is comparatively low, that determines their availability for researchers. The cryoprobes, which cooling capacity is determined by the volume and physicochemical properties of their working body, belong to this type of instruments [2]. Herewith, the heat is removed from the cryoexposure zone due to increasing the temperature of cryoprobe body. The working body is cooled immediately before the use. The main disadvantage of cryoprobes is a possible rapid temperature increase of the applicator working surface during work, affecting thereby the temperature regimen of the exposure.

The efficiency of skin neoplasms cryodestruction is provided by the rate, duration and final temperature of cooling [1, 4, 27]. To obtain the *in vivo* experimental models suitable to study the processes, occurred after cryosurgical therapy of human skin neoplasms, it is necessary to use such a cryodestruction, which could maintain the tissues temperature below their cryoresistance threshold.

This research was aimed to design the method of low-temperature exposure using the cryoprobe, which enabled simulating the processes occurred after skin neoplasm cryosurgery.

Materials and methods

The study was performed in 6-month-old hairless male rats in accordance with the Law of Ukraine On the Protection of Animals Against Cruelty (№ 3447-IV of February 21, 2006), in compliance with the requirements of the Bioethics Committee of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the NAS of Ukraine, agreed to the statements of European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986).

струмента – аккумулятора холода, который позволяет воспроизвести процессы, возникающие после криохирургического лечения новообразований кожи.

Материалы и методы

Исследование выполняли на 6-месячных бесшерстных крысах-самцах в соответствии с законом Украины «О защите животных от жестокого обращения» (№ 3447-IV от 21.02.2006 г.) при соблюдении требований комитета по биоэтике Института проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины (г. Харьков), согласованных с положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986). Животные были разделены на две группы по 10 особей в каждой: экспериментальная – криодеструкция кожи на латеральной поверхности бедра, контрольная (интактная) – животные, которые не подвергались никаким воздействиям.

Низкотемпературное влияние на кожу осуществляли криоинструментом – аккумулятором холода [7]. Инструмент представлял собой медный цилиндр массой 590 г, который в нижней части имел криоапликатор диаметром 10 мм. Для удобства манипулирования к верхней части цилиндра прикреплен рукоятка в виде скобы. Перед использованием криоинструмент помещали в емкость с жидким азотом и выдерживали в нем до прекращения активного кипения.

Время криовоздействия составляло 120 с. В качестве температурного датчика использовали медь-константановую термопару, подключенную к модулю аналогового ввода «ОВЕН МВ-110», с которого данные передавались на преобразователь интерфейсов «ОВЕН АС4» и далее – на персональный компьютер. Данные записывали и анализировали с помощью программ «Owen Process Manager 1.2» и «Owen Report Viewer 1.2». Все оборудование и программное обеспечение произведено компанией «Овен» (Россия). Температуру измеряли в одной точке, датчик размещали на поверхности кожи под криоапликатором, примерно в центре зоны контакта его рабочей поверхности с кожей. Таким образом фактически определяли температуру рабочей поверхности апликатора в процессе криовоздействия.

Морфологическую картину в области криовоздействия и биохимические параметры в сыворотке крови, характеризующие деструктивно-воспалительные процессы, оценивали на 7-е сутки эксперимента.

The animals were divided into two groups of 10 animals each: the experimental group comprised the animals with skin cryodestruction on lateral surface of femur, the animals which had no treatment were the control (intact) group.

The low-temperature exposure on skin was done by the cryoprobe [14]. The instrument consisted of a copper cylinder, weighing 590g with a cryoapplicator of 10 mm diameter in its lower part. The bracket-shaped handle was attached to the upper part of cylinder for easy manipulation. Prior to use, the cryoprobe was placed into a container with liquid nitrogen and kept in it until the active boiling ceased.

The cryoexposure time was 120 s. As a temperature sensor we used a copper-constantan thermocouple, connected to the analogue input module 'Owen MV-110', from which the data were transferred to interface converter 'Owen AC4' and further to PC. The data were recorded and analyzed using the Owen Process Manager 1.2 and Owen Report Viewer 1.2 software. All the equipment and software were produced by Owen Company (Russia). The temperature was measured at one point, the sensor was placed on skin surface under cryoapplicator, approximately in the center of contact area of its working surface with skin. Thus, we actually determined the temperature of applicator working surface during cryoexposure.

The morphological changes in the cryoexposure area and biochemical indices in blood serum, characterizing the destructive and inflammatory processes, were assessed to day 7 of the experiment.

The specimens for histological study was fixed in 10% neutral formalin, processed in alcohol and embedded into paraffin, the 5–6- μ m-thick sections were stained with hematoxylin and eosin [12]. The content of primary and secondary lipid peroxidation (LPO) products was determined by the level of diene conjugates (DC) [21] and the products, reactive with thiobarbituric acid, *i. e.* TBA-reactive substances [11], respectively. Antioxidant system was assessed by superoxide dismutase (SOD) [13] and catalase (CAT) [3] activity. The levels of C-reactive protein (CRP) and ceruloplasmin in blood serum were determined using the commercial test systems 'Vektor BEST', (Russia) and 'Reagent' (Ukraine), respectively, in accordance with the manufacturers' instructions. We used the immunoassay analyzer Labline – 90 (Labline Diagnostics, Austria) and a semi-automatic biochemical analyzer Rayto – RT 1904C (Rayto, China).

Statistical data were processed using the Excel 2003 software package (Microsoft, USA), SPSS v.10.0 (SPSS Inc., USA) using the non-parametric



Материал для гистологического исследования фиксировали в 10%-м нейтральном формалине, подвергали спиртовой проводке и парафиновой заливке, срезы толщиной 5–6 мкм окрашивали гематоксилином и эозином [8]. Количество первичных и вторичных продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) определяли по уровню диеновых конъюгатов (ДК) [11] и продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой, – ТБК-активных продуктов [4] соответственно. Состояние антиоксидантной системы оценивали по активности супероксиддисмутазы (СОД) [9] и каталазы (КАТ) [2]. Уровень С-реактивного белка (СРБ) в сыворотке крови определяли с помощью коммерческой тест-системы фирмы «Вектор БЕСТ» (Россия), церулоплазмина фирмы «Реагент» (Украина) в соответствии с инструкцией производителя. Использовали иммуноферментный анализатор «Labline-90» («Labline Diagnostics», Австрия) и полуавтоматический биохимический анализатор «Rayto-RT 1904 c» («Rayto», Китай).

Статистическую обработку данных 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

Параметры низкотемпературного воздействия.

Типичная кривая, полученная при измерении температуры, представлена на рис. 1. В первые секунды криовоздействия отмечалось резкое снижение температуры до $(-75,5 \pm 7,9)^\circ\text{C}$, затем постепенное повышение, через 120 с она была $(-59,1 \pm 6,5)^\circ\text{C}$. При выполнении криохирургических операций необходимо поддержание температуры, достаточной для разрушения клеток патологических образований. На момент прекращения криовоздействия температура повысилась в 1,3 раза (на $16,4^\circ\text{C}$) по сравнению с минимальной, но не превышала порога -50°C , достижение которого считается необходимым для гибели большинства клеток, включая опухолевые [13, 14, 17, 18].

Повышение температуры связано с постепенным нагревом аппликатора криоинструмента вследствие его контакта с окружающим воздухом и кожей. Контакт

Mann-Whitney test. Differences between the samples were considered significant at $p < 0.05$.

Results and discussion

Parameters of low-temperature exposure. The Fig. 1 demonstrates the typical curve, obtained by measuring the temperature. Within the first seconds of cryoexposure a sharp temperature decrease down to $(-75.5 \pm 7.9)^\circ\text{C}$ was observed, then it increased gradually, and after 120 s it made $(-59.1 \pm 6.5)^\circ\text{C}$. When performing cryosurgeries it is necessary to maintain the temperature, which is sufficient for cell destruction in neoplasms. When the cryoexposure was ceased, the temperature increased 1.3 times (by 16.4°C) as compared to the minimum one, but did not exceed the threshold of -50°C , which is considered to be indispensable for death of most cells, including tumor ones [1, 4, 7, 8].

The temperature increase was associated with a gradual heating of the cryoprobe applicator due to its contact with surrounding air and skin. The contact with skin, apparently, provided the highest heat transfer, that was stipulated by a constant heat flux to a cooled zone. In terms of whole body, the working surface of the cryoprobe was a point source of cold. The thermal resistance of tissues, stipulated by activation of metabolic processes, rapidly compensated the temperature decrease perifocally from the exposure area. The stability of blood flow under low temperature impact indicated the stability of metabolic processes, that should be taken into account when evaluating the thermal relationship between the cryoprobe and tissue [20]. The nature of temperature dependence testified to the fact that a high cooling rate within the first seconds of

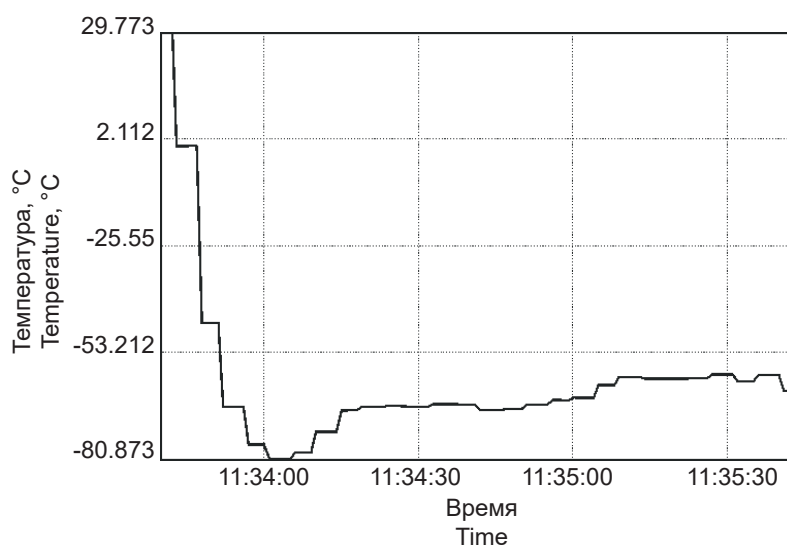


Рис. 1. Типичная температурная кривая.

Fig. 1. Typical temperature curve.

с кожей, по-видимому, обеспечивает наибольший теплообмен, что обусловлено постоянным притоком тепла к охлаждаемой зоне. Для организма рабочая поверхность криоинструмента является точечным источником холода. Тепловое сопротивление тканей, обусловленное активацией метаболических процессов, быстро компенсирует снижение температуры периферически от области воздействия. Стабильность кровотока при действии низкой температуры указывает на устойчивость метаболических процессов, что необходимо принимать во внимание при оценке тепловых взаимоотношений криоинструмента и ткани [12]. Характер температурной кривой свидетельствует о том, что высокая скорость охлаждения в первые секунды воздействия обеспечивает блокаду микроциркуляторного русла, вследствие чего приток тепла к области криовоздействия резко уменьшается. Вследствие быстрого замерзания определенного объема тканей формируется своеобразный «аккумулятор холода», который, по-видимому, вносит вклад в стабильность температурного режима криовоздействия.

Полученные результаты доказывают, что холодопроизводительность используемого в работе инструмента достаточна для поддержания температуры ниже порога криоустойчивости кожи на протяжении всего времени воздействия. Предлагаемый способ низкотемпературного воздействия предусматривает скорость охлаждения, время экспозиции и температурный диапазон, при которых возможна криодеструкция большинства новообразований кожи.

Морфологическая характеристика тканей.

Морфологическое исследование показало типичное послойное строение кожи крыс контрольной группы (рис. 2). Эпидермис имел равномерную толщину и был представлен базальным слоем мелких эпителиоцитов, которые в некоторых участках черепицеобразно накладывались, двумя-тремя рядами шиповатых эпителиоцитов, зернистыми клетками и расположенными над ними роговыми эпителиоцитами.

Между эпидермисом и подлежащей дермой располагалась базальная мембрана. Дерма состояла из сосочкового и сетчатого слоев, которые не имели между собой четкой границы. Сосочковый слой дермы выглядел сглаженным, сосочки в нем располагались редко. Оба слоя дермы были представлены местами рыхлой, а местами плотной неоформленной соединительной тканью. Волокна соединительной ткани имели разное направление: параллельно поверхности кожи и

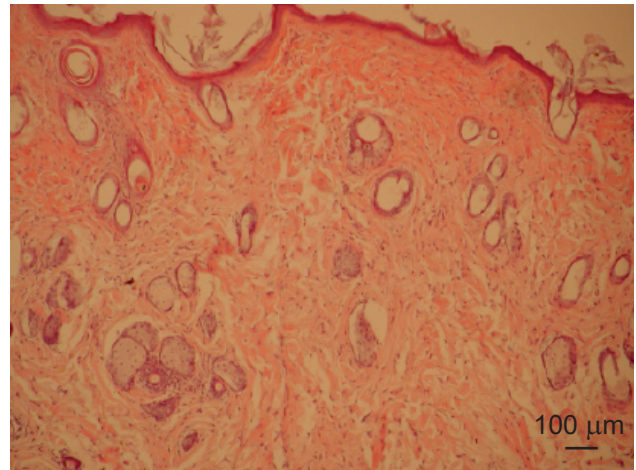


Рис. 2. Типичное послойное строение кожи (эпидермис и дерма), контрольная группа. Окрашивание гематоксилином и эозином.

Fig. 2. Typical layered skin structure (epidermis and dermis), the control group. H&E staining

exposure provided the blockage of microvasculature, resulting in a sharp decrease of heat inflow to cryoexposure area.

Since the freezing of tissue volume occurred in this case rapidly, this volume became a kind of cold ‘accumulator’. This cold accumulating ability contributed to the stability of temperature regimen of cryoexposure.

Our findings proved the cooling capacity of the probe we used here to be sufficient for maintaining the temperature below the skin cryoresistance threshold during the entire time of exposure. The proposed way for low-temperature exposure foresees the cooling rate, the exposure time and temperature range to be sufficient for cryodestruction of most skin neoplasms.

Tissue morphology. The morphological assessment showed a typical layered skin structure of the control group’s rats (Fig. 2). The epidermis had a uniform thickness and consisted of a basal layer of small epithelial cells, which were overlapped in a tile-like manner in several areas, *i. e.* there were observed two or three rows of spinous and granular cells and horny, which were above them.

Basal membrane was between epidermis and underlying dermis. The dermis consisted of papillary and reticular layers, which had no distinct boundary in-between. The papillary dermis looked flattened with rarely located papillae in it. Both dermal layers consisted of areolar tissue (either loose or dense in various areas). The connective tissue fibers were differently oriented: parallel to



под углом к ней. В дерме между соединительно-тканными волокнами располагались сосуды микроциркуляторного русла, нервные волокна, кожные железы и корни волос. Из клеточных элементов дермы в основном определялись немногочисленные клетки фибробластического ряда и макрофаги.

Дерма без четкой границы переходила в подкожную жировую клетчатку (гиподерму), представленную жировыми клетками – адипоцитами, которые имели округлую либо овальную форму и формировали дольки разного размера. Между адипоцитами во всех направлениях выявлялись тонкие волокна рыхлой соединительной ткани, которая продолжалась из дермы. В строении жировой ткани определялись сосуды микроциркуляторного русла и нервные волокна без признаков патологии.

Глубже гиподермы отмечались волокна поперечнополосатой мышечной ткани, цитоплазма которых равномерно окрашивалась эозином. Между мышечными волокнами располагались тонкие волокна соединительной ткани, сосуды микроциркуляторного русла и нервные волокна.

В коже всех животных, выведенных из эксперимента на 7-е сутки после криодеструкции (экспериментальная группа), определялся распространенный как по глубине, так и по площади раневой дефект. В области краев дефекта имело место утолщение многослойного плоского ороговевающего эпителия, которое можно рассматривать как проявление репаративных процессов, реализуемых через краевую эпителизацию, обеспечивающую уменьшение площади раны (рис. 3).

Вся поверхность раневого дефекта покрыта массивными бесструктурными массами, представленными некротически измененными фрагментами эпидермиса, дермы и гиподермы – зона первичного некроза, возникновение которой связано с первичным низкотемпературным повреждением тканей, находившихся непосредственно под криоаппликатором. В некротических массах определялось большое количество погибших лейкоцитов (рис. 4). Гнойно-некротические массы окружены демаркационным лейкоцитарным валом, имеющим местами четкие, а местами размытые границы.

За демаркационным валом располагался слой некротически измененных тканей – зона вторичного некроза (рис. 5). Зона вторичного некроза окружена тонким слоем молодой грануляционной ткани с наличием клеточного, сосудистого и волокнистого компонентов, среди которых преобладал клеточный. В грануляционной ткани

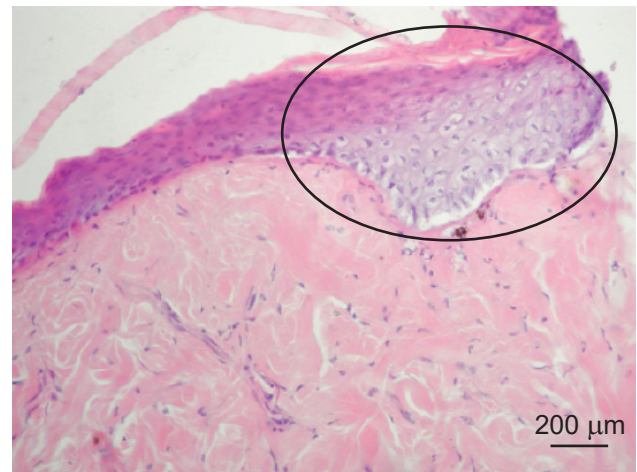


Рис. 3. Утолщение эпидермиса в области краев раневого дефекта (обведено), экспериментальная группа. Окрашивание гематоксилином и эозином.

Fig. 3. Thickening of epidermis in the edge area of wound defect (circled), experimental group. H&E staining.

skin surface and at an angle to it. The microcirculatory vessels, nerve fibers, skin glands and hair roots were located in dermis between connective tissue fibers. Rare cells of fibroblast lineage and macrophages were the majority of cell elements of the dermis.

The dermis with no distinct boundary was transitioned to a subcutaneous tissue (hypodermis), consisted of fat cells, *i. e.* adipocytes, which had either a rounded or oval shape, and formed the lobules of various sizes. Thin fibers of loose connective tissue, which continued from the dermis, were found between adipocytes in all the directions. Microcirculatory vessels and nerve fibers with no pathological signs were found in adipose tissue stroma.

The fibers of striated muscle tissue, the cytoplasm of which was uniformly stained with eosin, were noted next to hypodermis. Thin fibers of connective tissue, microcirculatory vessels and nerve fibers were located between the muscle fibers.

Skin of all the animals, sacrificed to day 7 after cryodestruction (experimental group), had the wound defect, which was deep and wide. The edge area of the defect had a thickening of multilayer flat keratinizing epithelium, which might be considered as the manifestation of reparative processes, which was implemented through the edge epithelialization and provided the wound area reduction (Fig. 3).

The entire surface of the wound defect was covered with large non-structured mass, comprised necrotically modified fragments of epidermis, dermis and hypodermis, *i. e.* primary necrosis area, the occurrence of which was associated with the

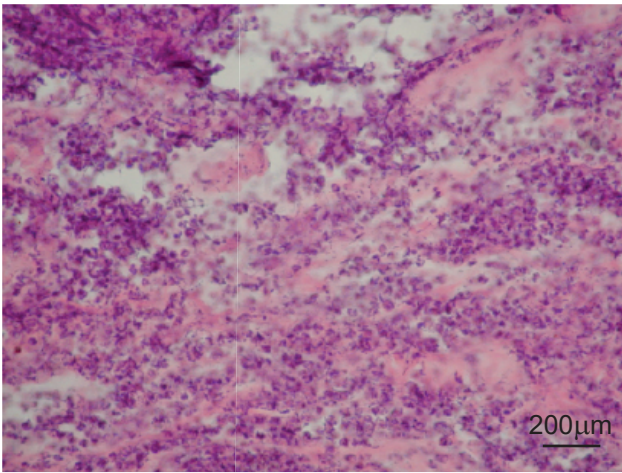


Рис. 4. Большое количество погибших лейкоцитов среди некротических масс, экспериментальная группа. Окрашивание гематоксилином и эозином.

Fig. 4. Large number of dead leukocytes among necrotic masses, an experimental group. H&E staining.

клеточный компонент представлен значительным количеством лейкоцитов, умеренным количеством макрофагов и клеток фибробластического ряда, сосудистый компонент – мелкими тонкостенными сосудами капиллярного типа, стенки которых местами утолщены и отечны; волокнистый компонент – немногочисленными тонкими волокнами соединительной ткани.

Появление грануляционной ткани и утолщение эпителиального пласта в области краев раны свидетельствовали о развитии репаративных процессов в зоне криовоздействия.

В окружающих раневой дефект тканях дермы, гиподермы с подлежащей поперечнополосатой мышечной тканью определялась местами выраженная (ближе к раневому дефекту), местами умеренная (дальше от раневого дефекта) клеточная инфильтрация (рис. 6), характеризующаяся наличием лейкоцитов, лимфоцитов, макрофагов и клеток фибробластического дифферона. Также в окружающих раневой дефект мягких тканях отмечались дистрофические изменения в нервных волокнах, гемодинамические нарушения (эритростаз, лейкостаз, микротромбоз, отек). В дерме и гиподерме в некоторых полях зрения выявлены сосуды, лишенные эндотелиальной выстилки, местами с фибриноидным некрозом стенки. Указанные патоморфологические изменения свидетельствуют о ведущей роли ишемического фактора в возникновении зоны вторичного некроза тканей после криовоздействия.

В мышечной ткани, подлежащей к зоне дефекта, волокна располагались рыхло с наличием альтеративных изменений, представленных дистрофией и некрозом. На разных участках в

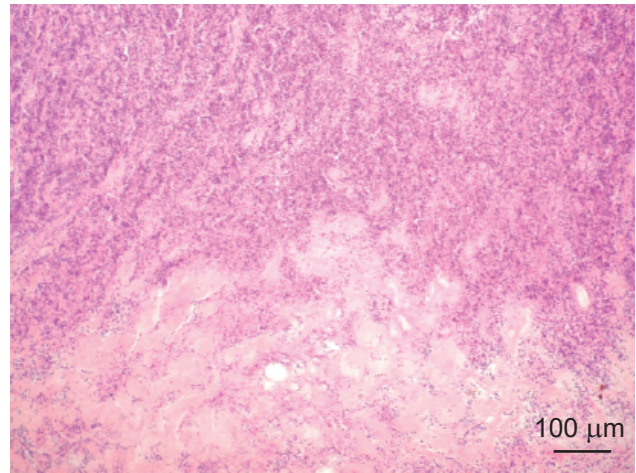


Рис. 5. Демаркационный лейкоцитарный вал (верхняя часть рисунка) с прилежащим слоем некротически измененных тканей (нижняя часть рисунка), экспериментальная группа. Окрашивание гематоксилином и эозином.

Fig. 5. Leukocyte bank (top of the Figure) with an adjacent layer of necrotically changed tissues (bottom of the Figure), experimental group. H&E staining.

primary low-temperature injury of tissues, located next to cryoapplicator. In necrotic masses, a large number of dead leukocytes was observed (Fig. 4). The purulent-necrotic masses were surrounded by a leukocyte bank, which had either distinct or blurred boundaries.

A layer of necrotically modified tissues, *i. e.* secondary necrosis area, was located beyond the leukocyte bank (Fig. 5). The secondary necrosis area was surrounded by a thin layer of young granulation tissue with present of cell, vascular and

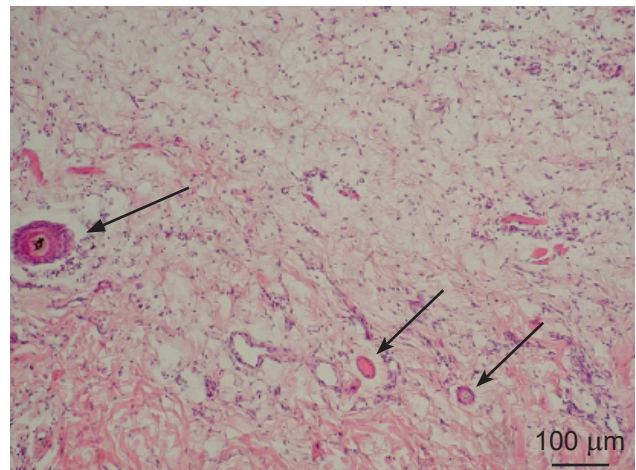


Рис. 6. Клеточная инфильтрация и гемодинамические нарушения (стрелки) в пограничных с дефектом тканях, экспериментальная группа. Окрашивание гематоксилином и эозином.

Fig. 6. Cell infiltration and hemodynamic disorders (arrows) in tissues adjacent to the defect, experimental group. H&E staining.



мышечных волокнах определялись расширения и вздутия, контрактильные изменения. Часть мышечных волокон утратила поперечную исчерченность. Некоторые мышечные клетки не содержали ядер.

Таким образом, морфологические изменения в области криовоздействия соответствовали первой фазе раневого процесса. Были обнаружены зоны первичного (вызванного прямым повреждающим воздействием низких температур) и вторичного (развившегося в результате сосудистых нарушений) некроза тканей. Процессы репарации характеризовались утолщением в области краев раны многослойного плоского ороговевающего эпителия, появлением на границе с зоной некротических изменений молодой грануляционной ткани. Полученные нами результаты соответствуют описанию известных механизмов повреждающего влияния низких температур на биологические ткани [12, 14, 18, 19, 27] и отвечают описанным нами ранее морфологическим особенностям ран, вызванных криодеструкцией с помощью инструмента с активноохлаждаемым аппликатором [5].

Биохимические параметры сыворотки крови.

Для оценки системного ответа на криодеструкцию кожи измеряли уровень ПОЛ, церулоплазмينا и СРБ в сыворотке крови экспериментальных животных.

Известно, что ПОЛ – свободнорадикальный процесс, который постоянно происходит в организме и контролируется системой антиоксидантной защиты. Усиление свободнорадикального процесса на фоне развития патологии приводит к нарушению существующего в физиологических условиях прооксидантно-антиоксидантного равновесия и развитию окислительного стресса [20, 26].

Как видно из данных, представленных в таблице, криодеструкция тканей сопровождалась статистически значимым увеличением содержания ДК и ТБК-активных продуктов (в 1,7 раза) в сыворотке крови животных, уменьшением активности СОД (в 2,3 раза) и КАТ (в 2,1 раза). Иными словами, отмечено повышение уровня как первичных, так и вторичных продуктов ПОЛ на фоне снижения активности основных звеньев ферментативной системы антиоксидантной защиты. Описанные изменения в сыворотке крови можно рассматривать как следствие лавинообразного усиления продукции свободных радикалов в ответ на влияние комплекса повреждающих факторов, вызванных криовоздействием, компенсировать которое «местная» система антиокси-

fibrous components, among which the cells prevailed. In granulation tissue, the cells were represented by a significant number of leukocytes, the macrophages and fibroblast cells were rare; a vascular component consisted of small thin-walled capillary-type vessels, the walls of which were somewhere thickened or swollen; rare thin fibers of connective tissue represented a fibrous component.

The appearance of granulation tissue and thickened epithelial layer in the wound edge area testified to the development of reparative processes in cryoexposure zone.

Wound defect was surrounded by dermal tissues, and hypodermis with underlying striated muscle tissue, which contained the pronounced (closer to the wound defect), or moderate (far from the wound defect) cell infiltration (Fig. 6), characterized by the presence of leukocytes, lymphocytes, macrophages and cells of fibroblast lineage. Dystrophic changes in nerve fibers, hemodynamic disorders (erythrosthesis, leukostasis, microthrombosis, edema) were also observed in soft tissues surrounding the wound defect. The vessels, deprived of endothelial lining, somewhere with fibrinoid necrosis of the wall, were found in dermis and hypodermis. These pathomorphological changes testified to a leading role of ischemic factor in appearance of secondary tissue necrosis after cryoexposure.

In the muscle tissue, next to the defect area, the fibers were arranged loosely, and some changes were present, *e. g.* dystrophy and necrosis. In several sites in muscle fibers we detected the extensions and bulges, as well as contractile changes. Some muscle fibers lost their cross striation and certain muscle cells had no nuclei.

Thus, the morphological changes in cryoexposure area corresponded to the first phase of wound-healing process. The primary tissue necrosis (caused by direct damaging effect of low temperatures) and the secondary one (resulting from vascular disorders) were found. The reparative processes were characterized by thickening of stratified squamous keratinized epithelium in the wound edge area, the appearance of young granulation tissue at the boundary of necrotic changes area. Our findings corresponded to the known described mechanisms of damaging impact of low temperatures on biological tissues [4, 8, 9, 20, 27] and complied with the morphological features of wounds we reported earlier, caused by cryodestruction using the instrument equipped with an actively cooled applicator [15].

Biochemical parameters in blood serum. To assess the systemic response to skin cryodestruction,

Показатели прооксидантно-антиоксидантного баланса в сыворотке крови животных
Indices of prooxidant-antioxidant balance in blood serum of animals

Группа Group	ДК, мкмоль/мл DC, $\mu\text{mol/ml}$	ТБК-активные продукты, нмоль/мл TBA-reactive substances, nmol/ml	СОД, усл.ед./мл SOD, arb. units/ml	КАТ, усл.ед./мл CAT, arb. units/ml
Контрольная Control	27,31 \pm 3,38	5,12 \pm 0,60	4,95 \pm 0,53	3,61 \pm 0,46
Экспериментальная Experimental	47,05 \pm 5,00*	8,86 \pm 1,20*	2,14 \pm 0,28*	1,71 \pm 0,21*

Примечание: * – отличия статистически значимы по сравнению с контролем, $p < 0,05$.

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

дантной защиты не способна. Подтверждением такой точки зрения являются данные о высоком содержании ТБК-активных продуктов в коже крыс после криодеструкции [3].

Повышение активности процессов ПОЛ, по видимому, происходит как в клетках тканей, граничащих с зоной некроза, так и в клетках крови, реализующих макрофагальную функцию в очаге воспаления, в первую очередь, нейтрофильных лейкоцитах, большое количество которых было выявлено при морфологическом исследовании зоны криодеструкции.

Механизмы возникновения и дальнейшего развития окислительного стресса до конца не изучены. Известно, что наиболее подвержены действию активных форм кислорода жирные кислоты, содержащие двойные связи. При избыточном образовании свободнорадикальных форм кислорода самоиндуцирующийся процесс ПОЛ сопровождается разрушением ненасыщенных липидов, нарушением структуры и функции белков, нуклеиновых кислот и других молекул, что может привести к необратимому повреждению субклеточных структур и гибели клеток [25, 26]. Некроз клеток, в свою очередь, вызывает развитие воспалительной реакции в тканях, которая сама по себе индуцирует образование свободных радикалов.

В митохондриях «производится» наибольшее количество активных форм кислорода в клетке, поэтому одной из основных причин возникновения окислительного стресса считается митохондриальная дисфункция [25]. На наш взгляд, такой механизм может реализоваться в клетках, граничащих с зоной некроза и подвергшихся сублетальному повреждению вследствие дисциркуляторных изменений микрососудистого русла тканей. Другими важными факторами развития окислительного стресса являются цитозольные и ядерные ферменты, гиперактивация которых возможна в тканях, окружающих зону криодеструкции.

we measured the level of LPO, ceruloplasmin and CRP in blood serum of experimental animals.

LPO is known as a free radical process that constantly occurs in a body under control of antioxidant defense system. The strengthening of free radical process under pathological conditions entails the disorder in prooxidant-antioxidant balance, existing under physiological conditions, and oxidative stress development [17, 26].

The Table data demonstrated the tissue cryodestruction to be accompanied by a statistically significant increase in the content of DC and TBA-reactive substances (1.7 times) in blood serum of animals, a decrease in SOD (by 2.3 times) and CAT (2.1 time) activity. In other words, we observed the augmentation of the level of both primary and secondary LPO products at the background of a decreased activity of the main components of enzyme system of antioxidant protection. The described changes in blood serum may be considered as resulting from the avalanche-like enhancement of free radical production in response to the impact of a complex of damaging factors, caused by cryoexposure, which compensation by the 'local' antioxidant defense system is impossible. This point of view is confirmed by the data on a high content of TBA-reactive substances in rat skin after cryodestruction [10].

An increased activity of LPO processes apparently occurs both in cells of the tissues, adjacent to necrosis zone and in blood cells, implementing the macrophage function in inflammation area, primarily neutrophilic leukocytes, a large number of which was revealed during morphological study of cryodestruction zone.

The mechanisms of onset and further development of oxidative stress have not been fully studied yet. The fatty acids, containing double bonds are known as most affected by reactive oxygen species. With an excessive formation of the oxygen free radicals, the self-induced LPO process

Фермент СОД катализирует дисмутацию одного из основных прооксидантов – супероксида – в кислород и пероксид водорода, КАТ – разложение образующегося в процессе биологического окисления пероксид водорода на воду и молекулярный кислород. Таким образом, оба энзима играют важнейшую роль в антиоксидантной защите практически любых клеток. Снижение их активности в сыворотке крови животных после криодеструкции кожи, по-видимому, вызвано длительным поступлением в кровоток большого количества активных форм кислорода и свидетельствует об истощении резервов ферментативного звена системы антиоксидантной защиты уже на системном уровне. Кроме того можно допустить, что синтез СОД и КАТ снижается в результате влияния высокого уровня свободных радикалов на генетический аппарат клетки. Такое предположение подтверждается тем фактом, что избыток активных форм кислорода способен вызывать прямое разрушение нуклеиновых кислот и оказывать многоуровневое модулирующее влияние на хроматин, в результате подавляется транскрипция и репликация ДНК [20].

Установленный в настоящей работе факт развития окислительного стресса в ответ на криодеструкцию кожи согласуется с полученными ранее данными о повышении уровня продуктов ПОЛ в сыворотке крови животных с холодowymi ранами [6].

Определение содержания СРБ в сыворотке крови является общепринятым лабораторным тестом для оценки выраженности процессов воспаления и деструкции на системном уровне. Молекула СРБ принадлежит к эволюционно древнему семейству белков – пентраксинам, синтез которых осуществляется клетками печени и регулируется различными воспалительными цитокинами. Содержание СРБ в сыворотке крови быстро повышается в ответ на травму, воспаление и инфекцию.

Уровень СРБ в сыворотке крови животных интактной группы составляет $(1,24 \pm 0,13)$ мг/мл, экспериментальной группы – $(3,51 \pm 0,45)$ мг/мл. Таким образом, вследствие повреждения тканей, вызванного криовоздействием, уровень СРБ повысился в 2,8 раза. Известно, что СРБ может связывать фосфохолин, в основном присутствующий в бактериальных мембранах, клеточной мембране и липопротеинах. Кроме того, он может распознавать ядерные антигенные эпитопы поврежденных клеток. Подобно иммуноглобулину G, он активирует комплемент, связывается с Fc-рецепторами, т. е. действует как опсонин

is accompanied by destruction of unsaturated lipids, disorder in structure and function of proteins, nucleic acids and other molecules, which may entail an irreversible injury of subcellular structures and cell death [25, 26]. The cell necrosis, in turn, causes the development of an inflammatory reaction in tissues, which itself induces the free radical formation.

The mitochondria ‘produce’ the largest number of reactive oxygen species in cell, therefore, a mitochondrial dysfunction is considered to be one of the main causes of oxidative stress occurrence [25]. We believe this mechanism may be implemented in cells, adjacent to necrotic area and subjected to sublethal damage due to dyscirculatory changes in tissue microvasculature. Cytosolic and nuclear enzymes, which may be hyperactivated in tissues nearby the cryodestruction zone, are the other important factors in oxidative stress development.

The SOD enzyme catalyzes the dismutation of one of the main prooxidants, *i. e.* superoxide into oxygen and hydrogen peroxide, the CAT does the decomposition of hydrogen peroxide, formed during biological oxidation, into water and molecular oxygen. Thus, both enzymes play a crucial role in antioxidant protection of almost any cells. A decrease in their activity in blood serum of animals after skin cryodestruction is apparently caused by a long-term entry into bloodstream of a large number of reactive oxygen species and testifies to the depletion of stocks of enzymes of antioxidant defence system even at the system level. In addition, we may assume that SOD and CAT synthesis reduction is a result of the impact of a high level of free radicals on genetic apparatus of cell. This assumption is confirmed by the fact that an excess of reactive oxygen species may induce a direct destruction of nucleic acids and cause a multi-level modulating effect on chromatin, resulting in suppression of DNA transcription and replication [17].

The fact we established here about the oxidative stress development in response to skin cryodestruction is consistent with the previous findings on an increased level of LPO products in blood serum of animals with cold wounds [16].

Determination of CRP content in blood serum is a common laboratory test to assess the severity of inflammatory and destructive processes at a system level. The CRP molecule belongs to the evolutionarily ancient family of proteins, pentraxins, which are synthesized by liver cells and regulated by various inflammatory cytokines. The CRP content in blood serum increases rapidly in response to trauma, inflammation and infection.

для различных патогенов. Взаимодействие СРБ с Fc-рецепторами приводит к образованию провоспалительных цитокинов, усиливает фагоцитоз антигенов и микроорганизмов, стимулирует образование активных форм кислорода эффекторными клетками иммунной системы [22]. В отличие от IgG, который специфически распознает различные антигенные эпитопы, СРБ взаимодействует с чужеродными и измененными собственными молекулами [16].

Очевидно, что установленное повышение уровня СРБ после криодеструкции вызвано комплексом факторов, имеющих различную степень влияния. На наш взгляд, первым по значимости является летальное и сублетальное повреждение тканей в зоне воздействия, вследствие которого большое количество клеток подвергаются апоптозу и некрозу [16]. Как некроз, так и апоптоз играют ключевую роль в патогенезе низкотемпературного повреждения тканей [14]. По-видимому, в результате криовоздействия произошла денатурация внеклеточных белков, из поврежденных клеток выделились цитозольные и ядерные антигенные эпитопы, что послужило сигналом для повышения продукции СРБ в печени. Вторым существенным фактором можно считать появление в зоне криовоздействия значительного количества микробных антигенов, третьим – возникновение и развитие процессов воспаления.

Роль СРБ в патогенезе воспаления до конца не изучена, однако известно, что он является полифункциональным белком острой фазы, способным оказывать как противо-, так и провоспалительное влияние. Считается, что молекула СРБ существует, по меньшей мере, в двух конформационно различных формах: нативный пентамерный СРБ и модифицированный/мономерный СРБ. Нативная форма молекулы СРБ является циркулирующим предшественником мономерного СРБ. Указанные изоформы обладают различными функциональными свойствами. Молекула нативного СРБ в зависимости от ситуации обладает про- и противовоспалительным действием, тогда как мономерный СРБ оказывает сильное провоспалительное влияние, реализуемое через эндотелиальные клетки, эндотелиальные клетки-предшественники, лейкоциты и тромбоциты [24]. Можно предположить, что грубые нарушения микроциркуляторного русла после криодеструкции кожи, зафиксированные в результате морфологического исследования, отчасти вызваны провоспалительным влиянием мономерной формы СРБ. Молекула нативного СРБ может диссоциировать на активированных

The CRP level in blood serum of animals from intact and experimental groups made (1.24 ± 0.13) and (3.51 ± 0.45) mg/ml, respectively. Thus, due to the tissue injury, caused by cryoexposure, the CRP level increased 2.8 times. It is known that CRP may bind phosphocholine, mainly present in cell membrane and lipoproteins. In addition, it may recognize nuclear antigenic epitopes of injured cells. Like immunoglobulin G, it activates the complement, binds to Fc-receptors, *i. e.* acts as opsonin for various pathogens. The interaction of CRP with Fc-receptors leads to formation of proinflammatory cytokines, increases the phagocytosis of certain antigens and microorganisms, stimulates the reactive oxygen species formation by effector cells of immune system [22]. In contrast to IgG, which specifically recognizes different antigenic epitopes, the CRP interacts with alien and own altered molecules [6].

Obviously, the established increase in CRP level after cryodestruction is induced by a complex of factors with different impact rate. We believe that the most important are the lethal and sublethal tissue injuries in the impact zone, as a result of which a large number of cells undergo the apoptosis and necrosis [6]. Both necrosis and apoptosis play a key role in pathogenesis of low-temperature tissue injury [4]. Apparently, as a result of cryoexposure, the extracellular proteins were denatured, cytosolic and nuclear antigenic epitopes were released from injured cells, that served as a signal for increasing the CRP production in liver. The emergence of a significant amount of microbial antigens in the cryoexposure area, and the occurrence and development of inflammatory processes may be considered as the second and third significant factors, respectively.

The CRP role in the inflammation pathogenesis has not been fully understood yet, but CRP is known to be a polyfunctional acute-phase protein, capable to cause both anti- and pro-inflammatory effects. It is believed that the CRP molecule exists in at least two different conformation: native pentamer CRP and modified/monomeric CRP. The native form of CRP molecule is a circulating precursor of monomeric CRP. These isoforms have different functional properties. The native CRP molecule is capable to have both pro- and anti-inflammatory effects, while the monomeric CRP causes a strong pro-inflammatory effect through endothelial cells, endothelial progenitor cells, leukocytes and platelets [24]. It may be assumed that strong disorders of microcirculatory bed after skin cryodestruction, recorded as a result of a morphological study, are partly induced by pro-inflammatory effect of



тромбоцитах и других клетках, вовлеченных в воспалительный ответ и связанных с усилением провоспалительного потенциала. Отложения мономерного СРБ обнаруживаются в очагах воспаления. Известно, что диссоциация нативного СРБ происходит в воспалительном микроокружении, а вновь образованный мономерный СРБ может способствовать локализации воспалительного ответа [22].

Таким образом, область криовоздействия, в которой летальное и сублетальное повреждение тканей, сопровождающееся некрозом и апоптозом большого количества клеток и развитием септического воспалительного процесса, можно рассматривать как «целевую зону» для циркулирующего в крови нативного СРБ. Повышение уровня СРБ в сыворотке крови, по-видимому, обеспечивает реализацию его про- и противовоспалительного потенциала в области криодеструкции. Полученные нами результаты согласуются с данными о повышении уровня СРБ в сыворотке крови животных с холодowymi ранами [6].

Церулоплазмин является эндогенным модулятором воспалительного ответа, а повышение его уровня в сыворотке крови – системным маркером воспаления. Известно, что уровень церулоплазмина в сыворотке крови повышается не только на фоне воспаления, но и при инфекции, повреждении и некрозе тканей [21]. В сыворотке крови животных интактной группы его уровень соответствует $(108,41 \pm 11,30)$ мг/мл, а после криовоздействия на кожу – $(288,88 \pm 32,64)$ мг/мл (в 2,7 раза выше). Молекула церулоплазмина представляет собой β -глобулин плазмы крови, функциями которого являются транспорт меди, мобилизация сывороточного железа для кроветворения, ингибирование ПОЛ, участие в острой фазе воспаления, регуляция уровня биогенных аминов в сыворотке крови [10].

На наш взгляд, повышение уровня церулоплазмина в сыворотке крови после криодеструкции кожи в основном связано с тем, что он является аттрактантом острой фазы воспаления. Кроме того, поскольку криодеструкция тканей сопровождалась повышением в сыворотке крови содержания первичных и вторичных продуктов ПОЛ, можно предположить, что повышение уровня церулоплазмина связано с его антиоксидантными свойствами и обусловлено необходимостью уменьшения выраженности оксидативного стресса.

Таким образом, увеличение уровня церулоплазмина в сыворотке крови у экспериментальных животных свидетельствует об активности

monomeric form of CRP. The native CRP molecule may dissociate on the activated platelets and other cells, involved in inflammatory response and associated with the enhanced pro-inflammatory potential. The monomeric CRP deposits are found in the inflammatory areas. The dissociation of native CRP is known to occur in inflammatory microenvironment, and the newly formed monomeric CRP may contribute to localization of inflammatory response [22].

Thus, the cryoexposure area may be considered as a 'target zone' for circulating in blood native CRP, where the lethal and sublethal tissue lesion, accompanied by necrosis and apoptosis of a large number of cells and developed septic inflammatory process were present. An increased CRP level in blood serum apparently provides its pro- and anti-inflammatory potential in cryodestruction area. Our findings are consistent with the data on an increased CRP level in blood serum of animals with cold wounds [16].

Ceruloplasmin is an endogenous modulator of inflammatory response, and an increase in its level in blood serum is a systemic marker of inflammation. It is known that the ceruloplasmin level in blood serum augments not only at the background of inflammation, but during infection, tissue injury and necrosis as well [18]. In blood serum of intact group animals its level corresponded to (108.41 ± 11.30) mg / ml, and after skin cryoexposure it made (288.88 ± 32.64) mg / ml (2.7 times higher). The ceruloplasmin molecule is the blood plasma β -globulin, the functions of which are the copper transport, serum iron mobilization for hematopoiesis, LPO inhibition, participation in acute phase of inflammation and regulation of biogenic amine level in blood serum [19].

We believe that an increase in ceruloplasmin level in blood serum after skin cryodestruction is mainly associated with its functioning as an attractant of acute inflammatory phase. In addition, since the tissue cryodestruction was accompanied by an increased content of primary and secondary LPO products in blood serum, the augmentation of ceruloplasmin level might be assumed as associated to its antioxidant properties and stipulated by the need to reduce the oxidative stress severity.

Thus, an increase in ceruloplasmin level in blood serum of experimental animals testified to the activity of destructive and inflammatory processes in cryoexposure area.

Conclusions

The way of low-temperature exposure we presented here enabled to obtain an experimental model



процессов деструкции и воспаления в зоне крио-воздействия.

Выводы

Представленный в работе способ низкотемпературного воздействия позволяет получить экспериментальную модель криодеструкции кожи, пригодную для изучения процессов, возникающих после криохирургического лечения новообразований кожи у людей.

Использованный в работе криоинструмент – аккумулятор холода позволял поддерживать температуру рабочей поверхности аппликатора не выше -50°C в течение всего периода воздействия.

Примененный режим криодействия на кожу приводил к развитию процессов деструкции и воспаления на местном и системном уровнях.

На местном уровне изменения проявлялись в развитии раневого дефекта распространенного как по глубине, так и по площади, с наличием зоны первичного некроза, вызванного прямым повреждающим воздействием температурного фактора, демаркационного лейкоцитарного вала, зоны вторичного некроза, развившегося в результате гемодинамических изменений, и тонкого слоя грануляционной ткани.

На системном уровне обнаружено развитие окислительного стресса, проявлявшегося повышением содержания первичных и вторичных продуктов ПОЛ на фоне угнетения ферментативного звена системы антиоксидантной защиты: снижение активности СОД и КАТ, а также повышение содержания церуллоплазмينا и СРБ в сыворотке крови животных.

Перспективой дальнейших исследований может быть изучение возможности использования предлагаемой экспериментальной модели для изучения процессов альтерации и репарации после криохирургического лечения патологических процессов кожи.

Литература

1. Архаров АМ, Архаров ИА, Антонов АН, и др. Машины низкотемпературной техники. Криогенные машины и инструменты. Москва: МГТУ им. Н.Э. Баумана; 2011. 582 с.
2. Барабой ВА, Орел ВЭ, Карнаух ИМ. Методические особенности исследования перекисного окисления. В: Барабой ВА, редактор. Перекисное окисление и радиация. Киев: Наукова думка; 1991. с. 52–75.
3. Ищенко ИО, Тыныныка ЛН, Ковалев ГА, и др. Влияние криоконсервированной сыворотки кордовой крови на биохимические маркеры деструкции тканей. Экспериментальна і клінічна медицина. 2016; 1(70): 19–25.
4. Карпищенко АИ. Спектрофотометрическое определение продуктов перекисного окисления липидов. В: Карпищенко АИ,

of skin cryodestruction suitable for studying the processes occurred after skin neoplasm cryosurgery in humans.

The cryoprobe we used here allowed to maintain the temperature of applicator working surface no higher than -50°C during the entire exposure time. The applied regimen of skin cryoexposure entailed the development of destructive and inflammatory processes at both local and systemic levels.

At the local level, the changes were manifested in the wound defect development, which were deep and wide. The accompanying primary necrosis was caused by a direct damaging effect of temperature factor, leukocyte bank, and the secondary necrosis was resulted from hemodynamic changes, and a thin layer of granulation tissue.

At the system level, we revealed the oxidative stress development, manifested in an increased content of the primary and secondary LPO products at the background of inhibited enzymatic component of antioxidant defense system, *i. e.* a decrease in SOD and CAT activity, as well as an increase in ceruloplasmin and CRP content in blood serum of animals.

The described experimental model will possibly enable a further study of the alterative and reparative processes after skin neoplasm cryosurgery.

References

1. Andrews MD. Cryosurgery for common skin conditions. Am Fam Physician. 2004; 69(10): 2365–72.
2. Arkharov AM, Arkharov IA, Antonov AN, et al. [Low-temperature machinery. Cryogenic machines and tools]. Moscow: Bauman Moscow State Technical University; 2011. 582 p. Russian.
3. Baraboy VA, Orel VE, Karnaukh IM. [Methodological features of the study of peroxidation]. In: Baraboy VA, editor. [Peroxidation and radiation]. Kyiv: Naykova Dumka; 1991. p. 52–75. Russian.
4. Baust JG, Gage AA, Bjerklund Johansen TE, Baust JM. Mechanisms of cryoablation: clinical consequences on malignant tumors. Cryobiology. 2014; 68(1): 1–11.
5. Breitbart EW. Cryosurgery: method and results. Hautarzt. 1983; 34(12): 612–19.
6. Du Clos TW. Function of C-reactive protein. Ann Med. 2000; 32(4): 274–8.
7. Gage A, Baust J. Mechanisms of tissue injury in cryosurgery. Cryobiology. 1998; 37(3): 171–86.
8. Gage AA., Baust JM., Baust JG. Experimental cryosurgery investigations *in vivo*. Cryobiology. 2009; 59(3): 229–43.
9. Gangy A. Percutaneous Spinal Tumor Management. Neuroradiology Journal. 2009; 22(1): 131–9.
10. Ischenko IO, Tynnyka LN, Kovaliev GA, et al. [Effect of cryopreserved cord blood serum on biochemical markers of destruction of tissues]. Experimental and Clinical Medicine. 2016; 70(1), 19–25. Russian.
11. Karpischenko AI [Spectrophotometric determination of lipid peroxidation products]. In: Karpischenko AI, editor. [Medical



- редактор. Медицинская лабораторная диагностика (программы и алгоритмы). СПб.: Интермедика; 1997. с. 48–52.
5. Ковалев ГА, Ищенко ИО, Наумова ОВ, Сандомирский БП. Морфологическая характеристика ран, вызванных криодеструкцией. Научные ведомости БелГУ. Серия Медицина. Фармация. 2015; (22): 107–14.
 6. Ковалев ГА, Ищенко ИО, Тыныныка ЛН, и др. Влияние криоконсервированной сыворотки кордовой крови на системные проявления воспаления на модели холодовых ран. Проблемы криобиологии и криомедицины. 2017; 27(1): 71–80.
 7. Ковальов ГО, Гальченко СЄ, винахідники; Інститут проблем криобіології і криомедицини НАН України, патентовласник. Пристрій для моделювання криодеструкції шкіри. Патент України № 126641, МПК G09B 23/28. 25.06.2018.
 8. Коржевский ДЭ, Гиляров АВ. Основы гистологической техники. С-Пб.: СпецЛит; 2010. 96 с.
 9. Костюк ВА, Потапович АИ, Ковалева ЖВ. Простой и чувствительный метод определения активности супероксид-дисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина. Вопр. мед. химии. 1990; 36(2): 88–91.
 10. Санина ОЛ, Бердинских НК. Биологическая роль церулоплазмина и возможности его клинического применения (обзор литературы). Вопр. мед. химии. 1986; 32(5): 7–14.
 11. Скорняков ВИ, Кожемякин ЛА, Смирнов ВВ. Продукты перекисного окисления липидов в спинномозговой жидкости у больных с черепнозговой травмой. Лаб. дело. 1988; (8): 14–16.
 12. Шафранов ВВ, Борхунова ЕН, Костылев МА, и др. Механизм разрушения биологических тканей при локальной криодеструкции. Вестник Российской академии естественных наук. 2012; (1): 68–76.
 13. Andrews MD. Cryosurgery for common skin conditions. Am Fam Physician. 2004; 69(10): 2365–72.
 14. Baust JG, Gage AA, Bjerklund Johansen TE, et al. Mechanisms of cryoablation: clinical consequences on malignant tumors. Cryobiology. 2014; 68(1): 1–11.
 15. Breitbart EW. Cryosurgery: method and results. Hautarzt. 1983; 34(12): 612–19.
 16. Du Clos TW. Function of C-reactive protein. Ann Med. 2000; 32(4): 274–8.
 17. Gage A, Baust J. Mechanisms of tissue injury in cryosurgery. Cryobiology. 1998; 37(3): 171–86.
 18. Gage AA, Baust JM, Baust JG. Experimental cryosurgery investigations in vivo. Cryobiology. 2009; 59(3): 229–43.
 19. Gangy A. Percutaneous Spinal Tumor Management. Neuro-radiology Journal. 2009; 22(1): 131–9.
 20. Kreuz S, Fischle W. Oxidative stress signaling to chromatin in health and disease. Epigenomics. 2016; 8(6): 843–62.
 21. Natesha RK, Natesha R, Victory D, et al. A prognostic role for ceruloplasmin in the diagnosis of indolent and recurrent inflammation. J Natl Med Assoc. 1992; 84(9): 781–4.
 22. Thiele JR, Zeller J, Bannasch H, et al. Targeting C-Reactive Protein in Inflammatory Disease by Preventing Conformational Changes. Mediators of Inflammation [Internet]. 2015 [cited 10.01.2018]; 2015: 372432. Доступно на: <https://www.hindawi.com/journals/mi/2015/372432/>.
 23. Weimar T, Lee AM, Ray S, et al. Evaluation of a novel cryoablation system: in vitro testing of heat capacity and freezing temperatures. Innovations (Phila). 2012; 7(6): 403–9.
 24. Wu Y, Potempa LA., El Kebir D, Filep JG. C-reactive protein and inflammation: conformational changes affect function. Biol Chem. 2015; 396(11): 1181–97.
 25. Yan MH, Wang X, Zhu X. Mitochondrial defects and oxidative stress in Alzheimer disease and Parkinson disease. Free Radic Biol Med. 2013; (62): 90–101.
 26. Ye Z, Zhang J, Townsend D, Tew K. Oxidative stress, redox regulation and diseases of cellular differentiation. Biochim Biophys Acta. 2015; 1850(8): 1607–21.
 27. Zimmerman E, Crawford P. Cutaneous cryosurgery. Am Fam Physician. 2012; 86(12): 1118–24.
 - laboratory diagnostics (protocols and algorithms)]. St. Petersburg: Intermedica; 1997. pp. 48–52. Russian.
 12. Korzhevskiy DE, Gilyarov AV. [The basics of histological technology]. St.-Petersburg: SpetsLit; 2010. 96. Russian.
 13. Kostyuk VA, Potapovich AI, Kovaleva ZhV. [A simple and sensitive method of determination of superoxide dismutase activity based on the reaction of quercetin oxidation]. Vopr Med Khim. 1990; 36(2): 88–91.
 14. Kovalov G, Halchenko S, inventors; Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine, NAS of Ukraine, patent holder. [Device for modeling cryodestruction of the skin]. Patent № 126641, IPC G09V 23/28. June 25, 2015. Ukrainian.
 15. Kovalov GA, Ischenko IO, Naumova OV, Sandomirsky BP. [Morphological characteristics of wounds caused by cryodestruction]. Belgorod State University Scientific Bulletin. Medicine Pharmacy. 2015; (22): 107–14. Russian.
 16. Kovalov GA, Ischenko IO, Tynynyka LN, Iefimova IA, Vvedenskiy BP, Sandomirskiy BP. Effect of cryopreserved cord blood serum on systemic inflammatory responses in experimental cold wound. Probl Cryobiol Cryomed. 2017; 27(1): 71–80.
 17. Kreuz S, Fischle W. Oxidative stress signaling to chromatin in health and disease. Epigenomics. 2016; 8(6): 843–62.
 18. Natesha RK, Natesha R, Victory D, et al. A prognostic role for ceruloplasmin in the diagnosis of indolent and recurrent inflammation. J Natl Med Assoc. 1992; 84(9): 781–4.
 19. Sanina OL, Berdinskikh NK. [Biological role of ceruloplasmin and its possible therapeutic use (review)]. Vopr Med Khim. 1986; 32(5): 7–14. Russian.
 20. Shafranov VV, Borkhunova EN, Kostylev MA, et al. [The mechanism of destruction of biological tissues in local cryodestruction]. Bull Russ Acad Nat Sci. 2012; (1): 68–75. Russian.
 21. Skorniakov VI, Kozhemiakin LA, Smirnov VV, Poliakova MA, Chulkevich GF. Products of lipid peroxidation in the cerebrospinal fluid of patients with cranio-cerebral trauma. Lab Delo. 1988; (8): 14–16.
 22. Thiele JR, Zeller J, Bannasch H, et al. Targeting C-Reactive Protein in Inflammatory Disease by Preventing Conformational Changes. Mediators of Inflammation [Internet]. 2015 [cited 10.01.2018]; 2015: 372432. Доступно на: <https://www.hindawi.com/journals/mi/2015/372432/>.
 23. Weimar T, Lee AM, Ray S, et al. Evaluation of a novel cryoablation system: in vitro testing of heat capacity and freezing temperatures. Innovations (Phila). 2012; 7(6): 403–9.
 24. Wu Y, Potempa LA., El Kebir D, Filep JG. C-reactive protein and inflammation: conformational changes affect function. Biol Chem. 2015; 396(11): 1181–97.
 25. Yan MH, Wang X, Zhu X. Mitochondrial defects and oxidative stress in Alzheimer disease and Parkinson disease. Free Radic Biol Med. 2013; (62): 90–101.
 26. Ye Z, Zhang J, Townsend D, Tew K. Oxidative stress, redox regulation and diseases of cellular differentiation. Biochim Biophys Acta. 2015; 1850(8): 1607–21.
 27. Zimmerman E, Crawford P. Cutaneous cryosurgery. Am Fam Physician. 2012; 86(12): 1118–24.