

УДК 616.711/.714-001-085.361:611.013-06:616-008.9]-092.9

Р.М. Борис<sup>1</sup>, А.І. Гоженко<sup>1</sup>, А.М. Гольцев<sup>2\*</sup>

## Вплив введення кріоконсервованих фетальних нервових клітин на прооксидантно-антиоксидантну рівновагу в щурів із експериментальною краніоскелетною травмою

UDC 616.711/.714-001-085.361:611.013-06:616-008.9]-092.9

R.M. Borys<sup>1</sup>, A.I. Gozhenko<sup>1</sup>, A.M. Goltsev<sup>2\*</sup>

## Effect of Treatment with Cryopreserved Fetal Neuronal Cells on Prooxidant-Antioxidant Balance in Rats with Experimental Cranio-Skeletal Injury

**Реферат:** У відповідь на краніоскелетну травму, ускладнену кровотечею, в гомогенаті печінки істотно збільшується вміст первинних і вторинних продуктів перекисного окислення ліпідів (ПОЛ), який досягає максимального рівня на 14-у добу експерименту і вірогідно перевищує контроль упродовж 25 діб спостереження. Накопичення продуктів ПОЛ відбувається через 3–14 діб експерименту на фоні істотного зниження активності супероксиддисмутази (СОД), відсутності змін активності каталази та компенсаторного збільшення вмісту церулоплазміну на 3-ю добу. З 14-ї по 25-у добу після застосування кріоконсервованих фетальних нервових клітин спостерігаються менші відхилення ліпопероксидації за вмістом первинних продуктів ПОЛ (дієнові кон'югати) та з 3-ї по 7-у добу – вторинних (ТБК-активних) продуктів ПОЛ. На 3–14-у добу експерименту вміст каталази знижується та відновлюється до контрольного на 25-у добу, з 14-ї доби відмічається протекторний вплив кріоконсервованих фетальних нервових клітин відносно активності СОД. Корируючий ефект на вміст церулоплазміну в сироватці крові практично відсутній.

**Ключові слова:** краніоскелетна травма, кровотеча, перекисне окислення ліпідів, супероксиддисмутаза, каталаза, церулоплазмін, печінка, кріоконсервовані фетальні нервові клітини.

**Реферат:** В ответ на краниоскелетную травму, осложненную кровотечением, в гомогенате печени существенно увеличивается содержание первичных и вторичных продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ), которое достигает максимального уровня на 14-е сутки эксперимента и достоверно превышает контроль в течение 25 суток наблюдения. Накопление продуктов ПОЛ происходит через 3–14 суток эксперимента при значительном снижении активности супероксиддисмутазы (СОД), отсутствии изменений активности каталазы и компенсаторном увеличении содержания церулоплазмина на 3-е сутки. С 14-х по 25-е сутки после использования криоконсервированных фетальных нервных клеток наблюдаются меньшие отклонения липопероксидации относительно содержания первичных продуктов ПОЛ (диеновые конъюгаты) и с 3-х по 7-е сутки – вторичных (ТБК-активных) продуктов ПОЛ. На 3–14-е сутки эксперимента содержание каталазы снижается, на 25-е сутки повышается, с 14-х суток отмечается протекторное влияние криоконсервированных фетальных нервных клеток относительно активности СОД. Корректирующий эффект на содержание церулоплазмина в сыворотке крови практически отсутствует.

**Ключевые слова:** краниоскелетная травма, кровотечение, перекисное окисление липидов, супероксиддисмутаза, каталаза, церулоплазмин, печень, криоконсервированные фетальные нервные клетки.

**Abstract:** In the response to cranio-skeletal injury, complicated by bleeding, the content of primary and secondary products of lipid peroxidation (LPO) in liver homogenate significantly increased, and achieved a maximum level to the 14<sup>th</sup> day of the experiment and was significantly higher than the control level during 25 days of observation. Within the 3<sup>rd</sup>–14<sup>th</sup> days the accumulation of LPO products occurred on the background of significant decrease of superoxide dismutase (SOD) activity, without any changes in catalase activity and compensatory increase of ceruloplasmin content to the 3<sup>rd</sup> day of the experiment. From 14<sup>th</sup> to 25<sup>th</sup> day following treatment with cryopreserved fetal neuronal cells we observed less pronounced deviations of lipid peroxidation in terms of content of primary LPO products (diene conjugates), and content of secondary LPO products (TBA-active) from the 3<sup>rd</sup> to 7<sup>th</sup> day. Catalase content was reduced through the 3<sup>rd</sup>–14<sup>th</sup> days of the experiment, increased by the 25<sup>th</sup> day; from the 14<sup>th</sup> day we observed a protective effect of cryopreserved fetal neuronal cells in terms of SOD activity. There was virtually no correcting effect found in blood serum ceruloplasmin content.

**Key words:** cranio-skeletal injury, hemorrhage, lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, ceruloplasmin, liver, cryopreserved fetal neuronal cells.

<sup>1</sup>ДП «Український науково-дослідний інститут медицини транспорту МОЗ України», м. Одеса

<sup>2</sup>Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

\*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:

вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61015;  
тел.: (+38 057) 373-41-43, факс: (+38 057) 373-30-84,  
електронна пошта: cryo@online.kharkov.ua

Надійшла 10.07.2013

Прийнята до друку 11.02.2014

<sup>1</sup>R&D Institute of Transport Medicine of Health Ministry of Ukraine, Odesa, Ukraine

<sup>2</sup>Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

\*To whom correspondence should be addressed:

23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015;  
tel.: +380 57 3737 4143, fax: +380 57 373 3084,  
e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Received July 10, 2013

Accepted February 11, 2014

Травматизм є основною причиною інвалідності у осіб віком 15–24 років та смерті – у віці до 35 років [14]. Значні витрати на лікування постраждалих, відсутність ефективних методів корекції системних відхилень, які виникають під час травми та призводять до розвитку поліорганної недостатності, обумовлюють необхідність поглибленого вивчення патогенезу травматичної хвороби.

Серед основних патогенетичних механізмів тяжкої травми, особливо на фоні кровотечі, важливу роль відіграє інтенсифікація перекисного окислення ліпідів (ПОЛ). На ранній стадії хвороби активація процесів ліпопероксидації має адаптивний характер: помірно збільшується проникність клітинних мембран та полегшується трансмембранний обіг речовин [9]. При незначній травмі система антиоксидантного захисту компенсує надлишок утворення активних форм кисню та вільних радикалів і підтримує прооксидантно-антиоксидантний баланс. Однак при важкій травмі, внаслідок розвитку системної відповіді на запалення, посилюється інтенсивність вільнорадикального окислення, порушується антиоксидантний захист, що за часом відповідає гострій фазі запального процесу [1]. Системний характер цих процесів обумовлює необхідність пошуку нових підходів до лікування травм.

Останнім часом значна увага приділяється застосуванню фетальних нервових клітин, які відносять до «поліфункціональних» модуляторів надсистемної дії [2, 3]. Доведено, що терапевтичний потенціал фетальних клітин зумовлений широким спектром продукованих ними біологічно активних речовин, які мають ангіогенний, антиапоптозичний, антиоксидантний і мітогенний ефекти [8]. Це робить їх перспективним засобом для зниження інтенсивності системної реакції організму на запалення, у тому числі порушень вільнорадикального окислення та антиоксидантного захисту в умовах тяжкої травми.

Мета роботи – дослідити динаміку показників ПОЛ та ферментативної ланки антиоксидантного захисту в період ранніх і пізніх проявів травматичної хвороби в умовах експериментальної краніоскелетної травми, ускладненої кровотечею, та після введення кріоконсервованих фетальних нервових клітин.

### Матеріали та методи

Експерименти проводили на 104 нелінійних білих щурах-самцях масою 180–200 г, яких утримували у віварію на стандартному раціоні. Тварин розділили на три групи: контрольну та дві дослідні. До контрольної групи увійшло 8 інтактних щурів. У тварин обох дослідних груп (по 48 щурів у кожній)

Traumatism is a major cause of disability in people aged 15–24 and death in those younger than 35 [12]. Significant expenditures for treating the injured, the lack of effective methods for correcting systemic abnormalities that occur following trauma and lead to the development of multiple organ failures, stipulate the necessity of enhanced study of traumatic disease pathogenesis.

Intensification of lipid peroxidation (LPO) plays an important role among the main pathogenic mechanisms of severe trauma, especially accompanied with bleeding. At early stage of the disease the activation of lipid peroxidation is of adaptive nature: the permeability of cell membranes increases moderately and transmembrane circulation of substances is thereby facilitated [9]. In case of trivial trauma the antioxidant defence system compensates the excessive formation of reactive oxygen species and free radicals and supports the prooxidant-antioxidant balance. And *vice versa*, severe trauma causes a systemic response to inflammation, corresponding increase in the intensity of free radical oxidation, and failed antioxidant defence, that coincides to an acute phase of inflammation [2]. The systemic nature of these processes needs a new approaches to treat injuries.

To date much attention has been paid to the use of fetal neuronal cells which are referred to ‘polyfunctional’ modulators of supra-systemic effect [3, 4]. It has been established that therapeutic potential of fetal cells is caused by a wide range of produced biologically active substances possessing angiogenic, antiapoptotic, antioxidant and mitogenic effects [8]. This makes them a prospective medicine product to reduce the intensity of systemic response to inflammation, including violations of free radical oxidation and antioxidant defence during severe injury.

The research aim was to study the dynamics of LPO indices and enzyme link of antioxidant defence during early and late manifestations of traumatic disease under experimental cranio-skeletal injury complicated by bleeding, and after treatment with cryopreserved fetal neuronal cells.

### Materials and methods

The experiments were performed in 104 outbred white male rats of 180–200g weight, which were kept in vivarium on a standard diet. The animals were divided into three groups: control and two experimental ones. The control group consisted of 8 intact rats. The animals of both experimental groups (48 rats in each group) were narcotized with sodium thiopental (40 mg/kg body mass) and a closed craniocerebral injury was modelled by blow on the skull [14]. Impact energy was 0.375 J, and corresponded to the injury of



під тіопентало-натрієвим наркозом (40 мг/кг маси тіла) моделювали закриту черепно-мозкову травму шляхом нанесення дозованого удару по черепу [4]. Енергія удару становила 0,375 Дж, що відповідало травмі середнього ступеня тяжкості. Крім цього, наносили однократний удар по кожному стегну для одержання закритого перелому стегнових кісток. Додатково у щурів дослідних груп викликали зовнішню кровотечу зі стегнової вени, що становила у середньому 20–22% від об'єму циркулюючої крові. Для відтворення гематоми у порожнину живота вводили 1 мл крові.

Через 12 годин після травмування тваринам першої дослідної групи внутрішньочеревно вводили суспензію кріоконсервованих фетальних нервових клітин (КФНК) щура в дозі  $5 \times 10^6$  клітин на 100 г маси тіла [2]. Суспензію фетальних нервових клітин одержували в Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (м. Харків) шляхом механічної дисоціації фрагментів мозку ембріонів щурів (11 діб гестації). Кріоконсервування проводили за методом, описаним раніше [13]. Другій дослідній групі тварин внутрішньочеревно вводили еквівалентний об'єм фізіологічного розчину. З експерименту щурів виводили через 3, 7, 14 та 25 діб після травми шляхом декапітації після попереднього тіопентало-натрієвого наркозу (60 мг/кг маси тіла тварини) [5].

У щурів оцінювали стан ПОЛ за вмістом у гомогенаті печінки ТБК-активних продуктів та дієнових кон'югатів [11, 15]. Активність ферментативної ланки антиоксидантного захисту визначали за активністю в гомогенаті печінки супероксиддисмутази (СОД) [12], каталази [7] та за вмістом у сироватці крові церулоплазміну [6].

Для проведення статистичного аналізу застосували програму «Statistica 10.0» [10]. При порівнянні двох вибірок використовували t-тест Стьюдента та тест Манна-Уїтні.

Під час роботи з лабораторними тваринами дотримувалися правил «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986) і методичних рекомендацій ДФЦ МОЗ України про «Доклінічні дослідження лікарських засобів» (Київ, 2001).

### Результати та обговорення

Аналіз отриманих результатів показав, що у відповідь на краніоскелетну травму, ускладнену кровотечею, у дослідних щурів відмічалася виражена інтенсифікація процесів ПОЛ. Вміст ТБК-активних продуктів у гомогенаті печінки тварин, яким не проводили клітинну терапію КФНК, у всі терміни

moderate severity. In addition, a single blow was inflicted on each thigh to obtain a closed fracture of thigh. Additionally, in the studied groups of rats there was caused external bleeding from the femoral vein, which was on average 20–22% of the circulating blood volume. To model a hematoma there was injected 1 ml of blood into abdominal cavity.

The suspension of cryopreserved fetal neuronal cells (cFNCs) of rat was injected intraperitoneally to the animals of the first experimental group 12 hours later the injury ( $5 \times 10^6$  cells per 100 g body mass [4]). A suspension of fetal neuronal cells was obtained at the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine (Kharkiv) by mechanical dissociation of brain fragments of rats embryos (11 days of gestation). Cryopreservation was performed according to the method described previously [5]. The second experimental group of animals were intraperitoneally injected with an equivalent volume of physiological solution. The rats were sacrificed to the 3<sup>rd</sup>, 7<sup>th</sup>, 14<sup>th</sup> and 25<sup>th</sup> days after injury by decapitation after a previous thio-pental sodium anaesthesia (60 mg/kg body mass) [15].

Lipid peroxidation was evaluated in rats by measuring the content of TBA-active products and diene conjugates in liver homogenate [11, 13]. Activity of enzymatic link of antioxidant defence was determined by the activity of superoxide dismutase (SOD) [1], and catalase [7] in liver homogenate, as well as by content of ceruloplasmin in blood serum [6].

Statistical analysis was done using Statistica 10.0 software. To compare the samples we applied Student's t-test and Mann-Whitney's test.

All the manipulations with laboratory animals were carried-out in accordance with the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986) and Guidelines of State Pharmacological Center of the Ministry of Health of Ukraine on Preclinical Studies of Medicine Products (Kyiv, 2001).

### Results and discussion

The analysis of the obtained results showed that bleeding-complicated cranio-skeletal injury resulted in a significant intensification of lipid peroxidation processes in the experimental rats. The content of TBA-active products in liver homogenate of animals not treated with cFNCs in all the terms of post-traumatic period was significantly higher than in the control and achieved a maximum to the 14<sup>th</sup> day of observation. After treatment with cFNCs the studied parameter was also significantly higher than the control level in all periods of observation with a maximum to the 14<sup>th</sup> day of observation (Table 1). Analysis of indices dynamics

посттравматичного періоду був значно вищим, ніж у контролі, та досягав максимуму на 14-у добу спостереження. Після застосування КФНК досліджуваний показник також істотно перевищував контрольний рівень у всі терміни спостереження з максимумом на 14-у добу (табл. 1). Аналіз динаміки показників в обох дослідних групах показав, що до 14-ї доби відбувалося статистично значуще збільшення вмісту ТБК-активних продуктів ПОЛ, а до 25-ї доби – значуще його зниження порівняно з попереднім терміном дослідження (14-а доба). Встановлено, що на 3- і 7-у добу посттравматичного періоду після клітинної терапії вміст у гомогенаті печінки ТБК-активних продуктів ПОЛ виявився вірогідно меншим порівняно з групою тварин, яким КФНК не вводили. Разом з тим на 14- і 25-у добу експерименту досліджуваний показник між групами істотно не відрізнявся.

Отже, через 14 діб вміст ТБК-активних продуктів ПОЛ у тварин обох дослідних груп був найбільшим. Застосування КФНК мало протекторний вплив на зростання інтенсивності утворення вторинних продуктів ПОЛ на 3- і 7-у добу посттравматичного періоду.

Вміст дієнових кон'югатів у гомогенаті печінки тварин обох дослідних груп протягом усього посттравматичного періоду був істотно вищим, ніж у контрольних, але на фоні клітинної терапії він вірогідно знижувався на 14- та 25-у добу порівняно з тваринами, яких не лікували КФНК. Максимальний вміст дієнових кон'югатів у тварин обох груп спостерігали на 7-у добу. При аналізі динаміки відхилень досліджуваного показника виявлено, що у гомогенаті печінки тварин обох дослідних груп до 7-ї доби експерименту він суттєво збільшувався. У тварин, яким не проводили терапію КФНК, на 14-у добу спостерігалася тенденція до зменшення вмісту дієнових кон'югатів, при цьому на 25-у добу він вірогідно зни-

in both experimental groups showed that there was a statistically significant increase in the content of TBA-active products of LPO to the 14<sup>th</sup> day, and then a significant reduction to the 25<sup>th</sup> day if compared to the previous observation term (the 14<sup>th</sup> day). It was established that to the 3<sup>rd</sup> and 7<sup>th</sup> day of post-traumatic period and conducted cell therapy the content of LPO TBA-active products in liver homo-genate was significantly lower if compared with the group of animals not treated with cFNCs. However, to the 14<sup>th</sup> and 25<sup>th</sup> day of the experiment there were no significant differences between the experimental groups in terms of this index.

Thus, after 14 days the content of TBA-active products of LPO in animals of both experimental groups was the highest. Application of cFNCs had protective effect on the intensity of formation of LPO secondary products to the 3<sup>rd</sup> and 7<sup>th</sup> day of post-traumatic period.

The content of diene conjugates in liver homogenate of animals of both experimental groups during the post-traumatic period was significantly higher than in the

**Таблиця 1.** Показники перекисного окислення ліпідів у відповідь на краніоскелетну травму, ускладнену кровотечею, та після лікування тварин КФНК (M ± m)

Групи тварин Groups of animals		Строк спостереження, діб Observation term, days			
		3	7	14	25
		ТБК-активні продукти ПОЛ, мкмоль/л TBA-active LPO products, μmol/l			
контроль (здорові тварини) control (healthy animals)		0,635 ± 0,018 (n = 8)			
краніоскелетна травма cranioskeletal injury	мимовільний перебіг spontaneous course	2,008 ± 0,083 <sup>#</sup> (n = 6)	2,193 ± 0,100 <sup>#</sup> (n = 6)	2,808 ± 0,117 <sup>#</sup> (n = 5)	2,410 ± 0,069 <sup>#</sup> (n = 5)
	введення КФНК introduction of CFNCs	0,857 ± 0,050 <sup>*</sup> (n = 7)	1,426 ± 0,074 <sup>#</sup> (n = 8)	2,986 ± 0,140 <sup>#</sup> (n = 7)	2,336 ± 0,089 <sup>#</sup> (n = 7)
		Дієнові кон'югати, ум.од./г Diene conjugates, arb. units/g			
контроль (здорові тварини) control (healthy animals)		0,398 ± 0,01 (n = 8)			
краніоскелетна травма cranioskeletal injury	мимовільний перебіг spontaneous course	1,313 ± 0,071 <sup>#</sup>	1,642 ± 0,078 <sup>#</sup>	1,592 ± 0,103 <sup>#</sup>	1,324 ± 0,047 <sup>#</sup>
	введення КФНК introduction of CFNCs	1,200 ± 0,053 <sup>#</sup> (n = 7)	1,618 ± 0,065 <sup>#</sup> (n = 8)	1,327 ± 0,064 <sup>#</sup> (n = 7)	1,111 ± 0,081 <sup>#</sup> (n = 7)

**Примітка:** значущі відмінності по відношенню до контрольної групи: \* –  $p \leq 0,01$ ; # –  $p \leq 0,001$ .  
**Note:** the differences are statistically significant if compared with the control: \* –  $p \leq 0,01$ ; # –  $p \leq 0,001$ .



жувався порівняно з 7-ю добою. У групі тварин, яким проводили клітинну терапію, даний показник був вірогідно нижчим на 14- та 25-у добу порівняно з 7-ю добою дослідження (табл. 1).

Таким чином, застосування терапії КФНК забезпечує менше накопичення первинних продуктів ПОЛ через 14 і 25 діб з моменту нанесення краніо-скелетної травми, ускладненої кровотечею.

Через 3, 7, 14 і 25 діб після нанесення краніо-скелетної травми, ускладненої кровотечею, показники ферментативної ланки антиоксидантного захисту змінювалися наступним чином.

У групі тварин без введення КФНК активність СОД гомогенату печінки протягом усього дослідження була меншою, ніж у контрольних (табл. 2). На 3-, 7- і 14-у добу експерименту даний показник вірогідно не відрізнявся, а на 25-у добу зростав у порівнянні з попередніми термінами спостереження. На 3- і 7-у добу після застосування КФНК активність СОД була меншою порівняно з контролем, на 14- і 25-у добу підвищувалася, досягаючи рівня контролю, і була вірогідно вищою порівняно з 3- і 7-ю добами. Встановлено, що після введення КФНК на 14- і 25-у добу експерименту активність СОД гомогенату печінки збільшувалася відносно першої групи тварин. Отже, терапія кріоконсервованими фетальними нервовими клітинами сприяла відновленню активності СОД.

Активність каталази гомогенату печінки (табл. 2) у тварин, яким не вводили КФНК, на 3- та 14-у добу спостереження вірогідно не відрізнялася від цього показника у контрольних тварин, а на 25-у добу була нижчою. При застосуванні терапії КФНК активність каталази у гомогенаті печінки тварин на 3- і 7-у добу посттравматичного періоду мала тенденцію до зниження, а на 14-у добу вона була вірогідно нижчою порівняно з контролем. Через 25 діб даний показник істотно не відрізнявся від контрольного. При порівнянні активності каталази у гомогенаті печінки тварин дослідних груп відмічено, що на 7-у добу після введення КФНК вона була нижче за показники тварин з мимовільним перебігом, а на 25-у добу – вище.

Через 3 доби після нанесення травми вміст церулоплазміну у сироватці крові тварин без введення КФНК вірогідно зростав порівняно з контрольними (табл. 2). На 7-, 14- і 25-у добу експерименту він знижувався й істотно не відрізнявся від контролю. Через 3 доби після нанесення травми на фоні застосування клітинної терапії вміст церулоплазміну вірогідно збільшувався порівняно з контрольною групою, а на 7- і 14-у добу повертався до контрольного рівня, проте через 25 діб відмічався повторний підйом досліджуваного показника.

control, but in case of conducted cell therapy it was significantly decreased by the 14<sup>th</sup> and 25<sup>th</sup> day if compared with the animals, not treated with cFNCs. The maximum content of diene conjugates in animals of both groups was observed by the 7<sup>th</sup> day. Analysis of dynamics of studied index changes revealed a significant increase to the 7<sup>th</sup> day of the experiment in liver homogenate of animals of both experimental groups. To the 14<sup>th</sup> day the reduction of content of diene conjugates was observed in the animals, not treated with cFNCs, moreover to the 25<sup>th</sup> day it was significantly lower if compared with the 7<sup>th</sup> day. In the group of animals which underwent cell therapy, this index was significantly lower to the 14<sup>th</sup> and 25<sup>th</sup> days if compared with the 7<sup>th</sup> day of the study (Table 1).

Thus, the use of cFNCs therapy resulted in less accumulation of LPO primary products to the 14<sup>th</sup> and 25<sup>th</sup> days following cranio-skeletal injury complicated by bleeding.

After 3, 7, 14 and 25 days post cranio-skeletal injury complicated by bleeding, the indices of enzymatic link of antioxidant protection were changed as follows.

In the group of animals not treated with cFNCs the SOD activity in liver homogenate was lower than in the control groups during the whole observation period (Table 2). By the 3<sup>rd</sup>, 7<sup>th</sup> and 14<sup>th</sup> days of experiment this index did not differ significantly from the previous observation periods, and to the 25<sup>th</sup> day increased significantly. By the 3<sup>rd</sup> and 7<sup>th</sup> days after cFNCs application the SOD activity was lower if compared with the control, by the 14<sup>th</sup> and 25<sup>th</sup> days it increased, achieving the control level and was significantly higher if compared with the indices assessed by the 3<sup>rd</sup> and 7<sup>th</sup> days. It has been found that introduction of cFNCs resulted in an increase of SOD activity in liver homogenate if compared to the first group of animals to the 14<sup>th</sup> and 25<sup>th</sup> days of the experiment. Thus, treatment with cryopreserved fetal neuronal cells contributed to SOD activity recovery.

Catalase activity in liver homogenate (Table 2) in the animals not treated with cFNCs did not differ significantly from the index in the control animals to the 3<sup>rd</sup>–14<sup>th</sup> observation days, and to the 25<sup>th</sup> day it was lower. Application of cFNCs resulted in insignificant decrease of catalase activity in liver homogenate of the animals to the 3<sup>rd</sup> and 7<sup>th</sup> days of post-traumatic period, and to the 14<sup>th</sup> day it was significantly lower than the control. After 25 days this index did not significantly differ from the control. Comparing the catalase activity in the liver homogenate of animals of the experimental groups showed that to the 7<sup>th</sup> day after administration of cFNCs it was lower than the index in animal with spontaneous course, and to the 25<sup>th</sup> day it was higher.

**Таблиця 2.** Показники ферментативної ланки антиоксидантного захисту у відповідь на краніоскелетну травму, ускладнену кровотечею, та після лікування тварин КФНК ( $M \pm m$ )

**Table 2.** Antioxidant defence enzymatic link indices in response to cranioskeletal injury complicated by bleeding and following treatment of animals with cFNCs ( $M \pm m$ )

Групи тварин Groups of animals		Строк спостереження, діб Observation term, days			
		3	7	14	25
		СОД, мкат/кг SOD, mkat/kg			
контроль(здорові тварини) control (healthy animals)		$0,253 \pm 0,011$ (n = 8)			
краніоскелетна травма cranioskeletal injury	мимовільний перебіг spontaneous course	$0,179 \pm 0,008^3$ (n = 6)	$0,183 \pm 0,006^3$ (n = 6)	$0,170 \pm 0,008^3$ (n = 5)	$0,215 \pm 0,011^1$ (n = 5)
	введення КФНК introduction of CFNCs	$0,172 \pm 0,006^3$ (n = 7)	$0,187 \pm 0,007^3$ (n = 8)	$0,236 \pm 0,011$ (n = 7)	$0,263 \pm 0,011$ (n = 7)
		Каталаза, мкат/кг Catalase, mkat/kg			
контроль(здорові тварини) control (healthy animals)		$6,28 \pm 0,24$ (n = 8)			
краніоскелетна травма cranioskeletal injury	мимовільний перебіг spontaneous course	$6,10 \pm 0,13$ (n = 6)	$6,48 \pm 0,28$ (n = 6)	$6,18 \pm 0,30$ (n = 5)	$4,94 \pm 0,21^2$ (n = 5)
	введення КФНК introduction of CFNCs	$5,75 \pm 0,16^4$ (n = 7)	$5,74 \pm 0,14^4$ (n = 8)	$5,42 \pm 0,30^1$ (n = 7)	$5,84 \pm 0,21$ (n = 7)
		Церулоплазмін, мг/л Ceruloplasmine, mg/l			
контроль(здорові тварини) control (healthy animals)		$9,36 \pm 0,24$ (n = 8)			
краніоскелетна травма cranioskeletal injury	мимовільний перебіг spontaneous course	$11,15 \pm 0,27^3$ (n = 6)	$10,00 \pm 0,63$ (n = 6)	$9,91 \pm 0,21$ (n = 5)	$9,85 \pm 0,10$ (n = 5)
	введення КФНК introduction of CFNCs	$10,66 \pm 0,40^1$ (n = 7)	$9,86 \pm 0,33$ (n = 8)	$9,97 \pm 0,12$ (n = 7)	$10,30 \pm 0,32^1$ (n = 7)

**Примітка:** значущі відмінності по відношенню до контрольної групи: <sup>1</sup> –  $p \leq 0,05$ ; <sup>2</sup> –  $p \leq 0,01$ ; <sup>3</sup> –  $p \leq 0,001$ ; <sup>4</sup> –  $p \leq 0,1$ .

**Note:** the differences are statistically significant if compared with the control: <sup>1</sup> –  $p \leq 0.05$ ; <sup>2</sup> –  $p \leq 0.01$ ; <sup>3</sup> –  $p \leq 0.001$ ; <sup>4</sup> –  $p \leq 0.1$ .

Отже, ферментативна ланка антиоксидантного захисту організму тварин з краніоскелетною травмою, ускладненою кровотечею, зазнавала змін у всі досліджувані терміни. Протягом 14 діб експерименту рівень СОД гомогенату печінки був зниженим, збільшився через 25 діб, проте не досягнув рівня контролю. Активність каталази гомогенату печінки зазнавала змін на 25-у добу спостереження і була нижчою від контролю. Вміст у сироватці крові церулоплазміну збільшувався через 3 доби та надалі повертався до початкового рівня. Після введення КФНК спостерігалось менше порушення активності СОД, яке починалося з 14-ї доби після травми. Активність каталази після клітинної терапії була нижчою протягом періоду з 3- до 14-ї доби, а на 25-у добу – вищою у порівнянні з тваринами, яких не лікували. Динаміка церулоплазміну в сироватці крові тварин після введення КФНК істотно не змінювалася.

The content of ceruloplasmin in blood serum of animals of the group not treated with cFNCs significantly increased 3 days later the injury if compared with the control (Table 2). To the 7<sup>th</sup>, 14<sup>th</sup> and 25<sup>th</sup> days of the experiment it was reduced and did not differ from the control. In the group treated with cFNCs the content of ceruloplasmin was significantly increased to the 3<sup>rd</sup> day post treatment if compared with the control group, to the 7<sup>th</sup> and 14<sup>th</sup> days it returned to the control level, and increased again after 25 days.

Thus, the enzymatic link of antioxidant protection of animal organism with cranio-skeletal injury complicated by bleeding, was changed in all the studied periods. Within 14 days of the experiment the level of SOD in liver homogenate was decreased, then increased after 25 days, but did not achieved the control level. Catalase activity of liver homogenate was changed to the 25<sup>th</sup> observation day and was lower than the control. Content of ceruloplasmin in blood serum increased



## Висновки

1. У відповідь на краніоскелетну травму, ускладнену кровотечею, в гомогенаті печінки тварин на 14-у добу експерименту максимально збільшився вміст первинних і вторинних продуктів ПОЛ і вірогідно перевищував контрольні значення впродовж 25 діб.

2. Накопичення продуктів ПОЛ у гомогенаті печінки групи тварин з мимовільним перебігом відбувалося на фоні істотного зниження активності СОД, відсутності відхилень активності каталази через 3–14 діб експерименту та збільшення вмісту церулоплазміну на 3-ю добу.

3. Застосування кріоконсервованих фетальних нервових клітин зумовило менші (в порівнянні з нелікованими тваринами) відхилення показників ліпопероксидації гомогенату печінки: дієнових кон'югатів (з 14- до 25-ї доби) та ТБК-активних продуктів ПОЛ (з 3- до 7-ї доби). У цих експериментальних умовах відмічені зниження вмісту каталази через 3–14 діб та його відновлення через 25 діб, протекторний вплив на активність СОД з 14-ї доби та відсутність коригуючої дії на вміст церулоплазміну в сироватці крові.

## Література

1. Генинг Т.П., Ксейко Д.А. Показатели перекисного окисления липидов и антиоксидантной защиты в системе «сыворотка крови – эритроцит» при острой циркуляторной гипоксии // Успехи совр. естествознания. – 2004. – №4. – С. 17–20.
2. Гольцев А.Н., Бабенко Н.Н., Сирос М.А., Останкова Л.В. Экспериментальный аллергический энцефаломиелит как модельная патология изучения корригирующей активности эмбриональных нервных клеток // Иммунология та алергологія. – 2005. – №3. – С. 76–77.
3. Гольцев А.Н., Порожан Е.А., Бабенко Н.Н., Останков М.В. Апоптические процессы в тимусе и головном мозге при развитии экспериментального аллергического энцефаломиелита до и после лечения фетальными нервными клетками // Патология. – 2001. – Т. 8, №2. – С. 69–72.
4. Ельский В.Н., Зяблицев С.В. Моделирование черепно-мозговой травмы. – Донецк: Новый мир, 2008. – 140 с.
5. Западнюк И.П., Западнюк В.И., Захария Е.А., Западнюк Б.В. Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте. – К.: Вища шк., 1983. – 383 с.
6. Колб В.Г., Камышников В.С. Справочник по клинической химии. – Минск: Беларусь, 1982. – 311 с.
7. Королюк М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г., Токарев В.Е. Метод определения активности каталазы // Лаб. дело. – 1988. – №1. – С. 16–19.
8. Лебединец Д.В., Овсянников С.Е., Лебединец В.В. и др. Терапия фетальными нервными клетками в остром периоде экспериментального ишемического инсульта (антиоксидантный эффект) // Проблемы криобиологии. – 2010. – Т. 20, №3. – С. 338–347.
9. Петухова О.В., Устьянцева И.М., Агаджанян В.В. Содержание липопротеидов и продуктов перекисного окисления липидов у больных в остром периоде политравмы // Политравма. – 2006. – №3. – С. 65–68.

after 3 days and then returned to the initial level. After introduction of cFNCs there was observed a less changed SOD activity, only from the 14<sup>th</sup> day post injury. Catalase activity after conducted cell therapy was lower through the 3<sup>rd</sup>–14<sup>th</sup> days, and to the 25<sup>th</sup> day it was higher if compared with non-treated animals. Dynamics of ceruloplasmin in serum of animals after administration of cFNCs did not significantly change.

## Conclusions

1. In response to cranio-skeletal injury complicated by bleeding the content of primary and secondary products of LPO in liver homogenate of animals maximally increased to the 14<sup>th</sup> day of the experiment and was significantly higher than the control values within 25 days.

2. The accumulation of lipid peroxidation products was observed in the liver homogenate of group of animals with spontaneous course, which was accompanied with a significant reduction in the activity of SOD, not changed catalase activity through 3–14 days of the experiment and increase of ceruloplasmin content to the 3<sup>rd</sup> day.

3. The application of cryopreserved fetal neuronal cells resulted to the less changes (if compared with non-treated animals) of lipid peroxidation indices of liver homogenate: diene conjugates (from the 14<sup>th</sup> to 25<sup>th</sup> days) and LPO TBA-active products (from the 3<sup>rd</sup> to 7<sup>th</sup> days). In these experimental conditions there was revealed a decrease of catalase content 3–14 days later and its recovery after 25 days, protective effect on SOD activity from the 14<sup>th</sup> day and no corrective effect on the content of ceruloplasmin in blood serum.

## References

1. Chevary S., Chaba I., Sokey J. Role of superoxide dismutase in oxidative processes and its determination method in biological materials. Lab Delo 1985; (11): 678–681.
2. Gening T.P., Kseyko D.A. Indicators of lipid peroxidation and anti-oxidant protection in the system "blood serum - erythrocyte" under acute circulatory hypoxia. Uspekhi Sovr Estestvoznaniya 2004; (4): 17–20.
3. Goltsev A.N., Babenko N.N., Siros M.A., Ostankova L.V. Experimental allergic encephalomyelitis as a model pathology of study of corrective activity of embryonic nerve cells. Alergologiya ta Immunologiya 2005; (3): 76–77.
4. Goltsev A.N., Porozhan Ye.A., Babenko N.N., Ostankov M.V. Apoptotic processes in thymus and brain during experimental allergic encephalomyelitis development before and after treatment with fetal neural cells. Patologiya 2001; 8(2): 69–72.
5. Goltsev A.M., Porozhan E.O., Babenko N.M., Ostankov M.V. Cryopreservation of fetal neuronal cells suspension. Patent of Ukraine N59206, IPC A01N1/02.
6. Kolb V.G., Kamysnikov V.S. Reference book on Clinical Chemistry. – Minsk: Belarus; 1982.
7. Korolyuk M.A., Ivanova L.I., Mayorova I.G., Tokarev V.E. Catalase activity examining method. Lab Delo 1988; (1): 16–19.



- 10.Рокицкий П.Ф. Биологическая статистика. – Минск: Высшая шк., 1973. – 320 с.
- 11.Стальная И.Д. Метод определения диеновой конъюгации ненасыщенных высших жирных кислот // Современные методы в биохимии. – М.: Медицина, 1977. – С. 63–64.
- 12.Чевари С., Чаба И., Сокей Й. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологических материалах // Лаб. дело. – 1985. – №11. – С. 678–681.
- 13.Пат. № 59206, Україна, МПК А01N1/02. Спосіб криоконсервування суспензії фетальних нервових клітин / А.М. Гольцев, Є.О. Порожан, Н.М. Бабенко, М.В. Останков; №u201011763 – заявл. 04.10.2010; опубл.10.05.2011, Бюл. №9.
- 14.Qureshi M. A. Polytrauma epidemiology & prognosis versus traumas core // Professional Med. J. – 2006. – Vol. 13, №1. – P. 57–62.
- 15.Yamamoto Y., Niki E., Eguchi J. et al. Oxidation of biological membranes and its inhibition. Free radical chain oxidation of erythrocyte ghost membranes by oxygen // Biochim. Biophys. Acta. – 1985. – Vol. 819, №1. – P. 29–36.
8. Lebedinets D.V., Ovsyannikov S.Ye., Lebedinets V.V. et al. Therapy with fetal neuronal cells in acute period of experimental ischemic stroke (antioxidative effect). Problems of Cryobiology 2010; 20(3): 65–68.
9. Petukhova A.V., Ustyantseva I.M., Agajanyan V.V. Content of lipoproteins and lipid peroxidation products in patients with acute polytrauma. Polytrauma 2006; (3): 65–68.
- 10.Rokytsky P.F. Biological statistics. Minsk: Vysheyshaya shkola; 1973.
- 11.Stalnaya I.D. Diene conjugation method for determining the unsaturated higher fatty acids. In: Modern methods in biochemistry. Moscow: Meditsyna; 1977.
- 12.Qureshi M. A. Polytrauma epidemiology & prognosis versus traumas core. Professional Med J 2006; 13(1): 57–62.
- 13.Yamamoto Y., Niki E., Eguchi J. et al. Oxidation of biological membranes and its inhibition. Free radical chain oxidation of erythrocyte ghost membranes by oxygen. Biochim Biophys Acta 1985; 819(1): 29–36.
- 14.Yelsky V.N., Zyablytsev S.V. Modeling of cranio-cerebral injury. Donetsk: Novyy Mir; 2008.
- 15.Zapadnyuk I.P., Zapadnyuk V.I., Zakharia E.A., Zapadnyuk B.V. Laboratory animals. Kiev: Vyscha shkola; 1983.

