

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ  
ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І КРІОМЕДИЦИНИ

Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису

**Власов Олександр Олексійович**

УДК:615.361:612.79.015.21.085]:57.086.13+544.77.023.5:546.26-17:616.5-  
001.19-003.9

**ДИСЕРТАЦІЯ**

ВПЛИВ ЕКСТРАКТУ КРІОКОНСЕРВОВАНИХ ФРАГМЕНТІВ  
ШКІРИ ПОРОСЯТ І ФУЛЕРЕНУ C<sub>60</sub> НА АЛЬТЕРАТИВНІ ТА  
РЕПАРАТИВНІ ПРОЦЕСИ В ШКІРІ ПІСЛЯ КРІОДЕСТРУКЦІЇ  
(ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ)

14.01.35 –кріомедицина

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук.  
Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,  
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

\_\_\_\_\_ О.О. Власов

(підпис, ініціали та прізвище здобувача)

Науковий керівник Ковальов Геннадій Олександрович, кандидат  
медичних наук, старший науковий співробітник

Харків 2021

## АНОТАЦІЯ

*Власов О.О.* Вплив екстракту кріоконсервованих фрагментів шкіри поросят і фулерену  $C_{60}$  на альтеративні та репаративні процеси в шкірі після кріодеструкції (експериментальне дослідження).

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.01.35 – «кріомедицина». – Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків, 2021.

Дисертаційна робота присвячена оптимізації лікування ран після кріоабляції шкіри, шляхом застосування комплексу регуляторних сполук тваринного походження, у складі екстракту кріоконсервованих фрагментів шкіри поросят (ЕКФШП) та, в порівняльному аспекті, водного колоїдного розчину не модифікованого фулерену  $C_{60}$ . (ВКРФ  $C_{60}$ ).

Представлена експериментальна модель процесів деструкції і репарації тканин після кріоабляції шкіри у безшерстих щурів, яка характеризується місцевими і системними проявами деструкції і запалення і може бути використана для вивчення процесів, що виникають після кріохірургічного лікування новоутворень.

Параметри охолодження в процесі кріодеструкції шкіри відповідали вимогам до кріохірургічних технологій лікування. У процесі кріовпливу відбувалося різке зниження температури в місці контакту аплікатора і шкіри до  $-75,5 \pm 7,9^{\circ}\text{C}$  з поступовим підвищенням температури до  $-59,1 \pm 6,5^{\circ}\text{C}$ . Відзначалися місцеві і системні прояви деструкції і запалення з наявністю зони первинного некрозу, викликаного прямим термічним впливом, демаркаційного лейкоцитарного валу, зони вторинного некрозу, що розвинувся в результаті гемодинамічних змін, розвитком окисного стресу, що виявлявся підвищенням вмісту первинних і вторинних продуктів ПОЛ та зниженням активності супероксиддисмутази і каталази, а також підвищенням вмісту церулоплазміну і С-реактивного білка в сироватці крові.

Виявлено, що біологічні ефекти введення в черевну порожнину водного колоїдного розчину фулерену  $C_{60}$  в дозі 1мг/кг залежать від його концентрації. Розчин з концентрацією 173 мкмоль/л має меншу активність ніж розчин з концентрацією 34,7 мкмоль/л, що пов'язане з його меншою біодоступністю внаслідок агрегації і випадіння фулерену в осад в місці введення.

Показано, що введення екстракту кріоконсервованих фрагментів шкіри поросят і водного колоїдного розчину фулерену  $C_{60}$  супроводжувалось прискоренням загоювання ран після кріодеструкції шкіри, що проявлялося зменшенням вираженості морфологічних проявів деструкції і запалення і збільшенням проявів репаративних процесів на макро- і мікроскопічному рівні. Фулерени показали більш виражений стимулюючий вплив на репаративні процеси в ранах ніж екстракти, що проявлялося: на 7 добу – більшою товщиною епітелію і шару грануляційної тканини, меншою вираженістю шару вторинного некрозу; на 14 добу – меншою площею ран, більшою товщиною епітеліального пласта, шарів демаркаційного лейкоцитарного валу і грануляційної тканини; на 21 добу – збільшенням шару грануляційної тканини. Після введення фулеренів було відзначено більший вміст судинного компонента і більшу кількість макрофагів, лімфоцитів і клітин фібробластичного диферону в грануляційній тканині в усі терміни спостереження. Проте, в групі з введенням фулеренів спостерігалася найбільша кількість і вираженість акантотичних розростань епідермісу, в яких було зафіксовано підвищення мітотичної активності клітин і, подекуди, помірно виражені диспластичні зміни. Регенерація тканин після введення тваринам з кріодеструкцією шкіри екстрактів є більш органотиповою, що проявлялося формуванням придатків шкіри на 21 добу спостереження. Одночасну наявність ознак дисплазії і підвищеної проліферативної активності клітин епітелію після введення фулерену можна розглядати як потенційну передумову розвитку передракових захворювань шкіри. Регенерація тканин після застосування екстракту була більш

органотиповою, що проявлялося формуванням придатків шкіри на 21 добу спостереження.

Виявлено, що застосування ЕКФШП після кріодеструкції шкіри супроводжувалося збалансованою активізацією процесів проліферації і апоптозу клітин в оточуючих рану епітелії, дермі, гіподермі і м'язовій тканині, а також в грануляційній і сполучній тканинах, що заповнюють ранову порожнину протягом усього експерименту. Введення ВКРФ С<sub>60</sub> супроводжувалося дисбалансом активності процесів проліферації і апоптозу. Це проявлялося більш виразною, порівняно з екстрактами, стимуляцією проліферації клітин: більшою представленістю маркеру проліферації Ki-67 в епітелії і грануляційної тканини на 7 добу; в дермі, гіподермі і м'язовій тканині – на всі строки спостереження. Представленість маркеру апоптозу p53 в епітелії після використання фулерену на 7 і 14 добу не відрізнялась від контролю, а на 21 добу була в 2 рази нижче; в дермі, гіподермі, м'язовій, грануляційній і сполучній тканинах кількість p53 позитивних клітин підвищувалась лише на 7 добу і не відрізнялась від показників після введення екстрактів. Виявлений дисбаланс регуляції ранового процесу після введення фулерену може призвести до надмірного формування сполучної тканини і утворення в подальшому келоїдних рубців, а також, враховуючи диспластичні зміни в епітеліальному шарі, може бути фоном для розвитку пухлин епітеліального походження.

Показано, що ведення ЕКФШП і ВКРФ С<sub>60</sub> у щурів після кріодеструкції шкіри сприяє зниженню в сироватці крові рівня маркерів деструктивних та запалювальних процесів. Встановлено нормалізацію вмісту дієнових кон'югатів і ТБК-активних продуктів (продуктів, що реагують з тіобарбітуровою кислотою) після введення розчину фулеренів починаючи з 14 доби спостереження, та на 21 добу після застосування екстрактів; підвищення активності супероксиддисмутази і каталази на 14 добу, та її нормалізацію на 21 добу експерименту після введення екстрактів і фулеренів. Визначено зниження показників С-реактивного білка і церулоплазміну на всі



строки спостереження з їх нормалізацію на 21 добу, а також зниження вмісту нітратів та нітритів на 14 і 21 добу спостереження після введення екстрактів і фулеренів; зниження вмісту молекул середньої маси на 14 та 21 добу після введення фулеренів.

Вперше показано, що введення ЕКФШП та ВКРФ С<sub>60</sub> після кріодеструкції шкіри прискорює загоювання ран, що проявляється зменшенням вираженості морфологічних проявів деструкції і запалення і збільшенням проявів репаративних процесів.

Вперше доведено, що введення ВКРФ С<sub>60</sub> тваринам після кріодеструкції шкіри призводить до дисбалансу регуляції ранового процесу – гіперстимуляції проліферації клітин зі зниженням їх апоптотичної активності переважно в епітеліальному шарі і клітинах фібробластичного ряду.

Вперше показано, що регенерація тканин за кріодеструкції шкіри після введення ЕКФШП є більш органотиповою, ніж після введення ВКРФ С<sub>60</sub>, що проявляється формуванням придатків шкіри і більшою збалансованістю процесів апоптозу та проліферації.

Вперше встановлено, що застосування ЕКФШП і ВКРФ С<sub>60</sub> у тварин після кріодеструкції шкіри знижувало в сироватці крові рівень маркерів деструктивних та запальних процесів.

Вперше встановлено, що інтраперитоніальне введення ВКРФ С<sub>60</sub> в дозі 1 мг/кг з концентрацією 34,7 мкмоль/л викликало зворотній лейкоцитоз з підвищенням вмісту сегментоядерних нейтрофілів та зростання активності аспаратамінотрансферази (АСТ) і аланінамінотрансферази (АЛТ) в сироватці крові щурів.

Вперше встановлено, що застосування розчину ВКРФ С<sub>60</sub> в концентрації 34,7 мкмоль/л та 173 мкмоль/л супроводжувалось помірним анізоцитозом еритроцитів на всі строки спостереження.

Розроблена експериментальна модель процесів деструкції і репарації тканин після кріоабляції шкіри у безшерстих щурів, яка придатна для вивчення процесів пато- та саногенезу після кріохірургічного лікування

патологічних утворень шкіри. Отримані дані можуть знайти застосування при розробці нових патогенетично обґрунтованих підходів в лікуванні ран. На основі даних дослідження впливу ВКРФ C<sub>60</sub> на процеси перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) та морфологічні показники деструктивних та відновних процесів в тканинах після кріоабляції шкіри було розроблено спосіб лікування ран (патент України UA111022 U).

Отримані дані щодо стимуляції фулеренами проліферації клітин на тлі зниження їх апоптотичної активності можуть бути експериментальним обґрунтуванням доцільності проведення досліджень віддалених наслідків застосування ВКРФ C<sub>60</sub> на різних експериментальних моделях. Отримані дані можуть бути експериментальним обґрунтуванням доцільності проведення досліджень щодо можливості включення ЕКФШП в протоколи лікування ран.

**Ключові слова:** кріодеструкція шкіри, рани, регенерація, екстракт кріоконсервованих фрагментів шкіри поросят, водний колоїдний розчин фулерену C<sub>60</sub>.

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ ТА  
ВІДОМОСТІ ПРО АПРОБАЦІЮ РЕЗУЛЬТАТІВ ДИСЕРТАЦІЇ

**Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати**

**Дисертації**

*Статті у фахових виданнях України*

1. **Власов ОО**, Ковальов ГО, Белочкіна ІВ, Єфімова ІА, Сандомирський БП. Вплив водного колоїдного розчину фулерену C<sub>60</sub> на гематологічні і біохімічні показники крові щурів. Фізіологічний журнал. 2018; 64(3): 70–78.
2. Kovalov GO, **Vlasov ОО**, Myroshnychenko MS, Sandomirskiy BP. Experimental model of skin cryodestruction. Problems of Cryobiology and Cryomedicine. 2019; 29(1): 88–101. (Scopus)
3. **Власов ОО**, Ковальов ГО, Чиж МО, Гальченко СЄ. Динаміка вмісту продуктів перекисного окислення ліпідів та антиоксидантів в крові щурів з кріодеструкцією шкіри та уведенням екстракту кріоконсервованих фрагментів шкіри поросят або водного колоїдного розчину фулерену C<sub>60</sub>. Вісник проблем біології і медицини. 2020; 1(155): 102–106.

*Статті в наукових періодичних виданнях інших країн*

4. **Vlasov ОО**, Kovalov GO, Myroshnychenko MS. Morphological features of a cold skin wound under the influence of an extract of cryopreserved skin fragments of piglets (experimental study). Wiadomości Lekarskie. 2020; 73(2): 306–312. (Scopus)
5. **Vlasov ОО**, Kovalov GO, Myroshnychenko MS. Morphological assessment of wound healing after cryodestruction of skin using an aqueous colloidal solution of C<sub>60</sub> fullerenes. Wiadomości Lekarskie. 2020; 73(4): 642–647. (Scopus)

**Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації**

*Тези наукових доповідей конференцій*

6. **Vlasov OO**, Panov SI, Kovalov GA, Belochkina IV, Nipot EE, Shpakova NM, Iefimova IA, Sandomirsky BP. Effect of C<sub>60</sub> fullerene aqueous colloid solution on biochemical parameters of liver and visco-elastic membrane properties of rat's erythrocytes. In: Central European Conference on Regenerative Medicine; March 14-15, Bydgoszcz. 2015. Bydgoszcz, Poland, 2015. p. 72–74.
7. **Власов ОО**, Панов СІ, Ковальов ГО, Белочкіна ІВ, Ніпот ОЄ, Шпакова НМ, Єфімова ІО, Сандомирський БП. Вплив водного колоїдного розчину фулерену C<sub>60</sub> на стан мембран та біохімічні показники *in vivo*. Проблеми кріобіології і кріомедицини. 2015; 25(2): 195.
8. **Vlasov OO**, Kovalov GA, Belochkina IV, Panov SI, Iefimova IA, Sandomirsky BP. Effect of fullerene C<sub>60</sub> on biochemical parameters of liver and kidneys. Cryobiology. 2015; 71(3): 558.
9. **Vlasov OO**, Panov SI, Nipot OYe, Byelochkina IV, Kovalov GO, Shpakova NM, Synchykova OP, Sandomyrsky BP. Effect of C<sub>60</sub> fullerene aqueous colloid solution on visco-elastic membrane properties of erythrocytes. In: V Ukrainian-German Symposium on Physics and Chemistry of Nanostructures and on Nanobiotechnology; September 21-25, Kyiv. 2015. Kyiv, Ukraine, 2015. P. 114.
10. **Vlasov OO**, Byelochkina IV, Kovalev GA, Panov SI, Prylutskyu YuI, Sandomyrsky BP. Effect of aqueous colloid solution of C<sub>60</sub> fullerene on hematological parameters in rats. In: International research and practice conference: nanotechnology and nanomaterials «NANO-2016»; August 24–27, Lviv. 2016. Lviv, Ukraine, 2016. P. 510.
11. **Власов ОО**, Ковальов ГО, Белочкіна ІВ, Сандомирський БП. Влияние экстрактов криоконсервированных фрагментов кожи поросят на состояние про- и антиоксидантной системы при криодеструкции кожи. Проблеми кріобіології і кріомедицини. 2016; 26(2): 170.

12. **Власов ОО**, Ковальов ГО, Мирошниченко МС. Влияние водного коллоидного раствора фуллерена  $C_{60}$  на эпителий после криодеструкции кожи. Проблемы кріобіології і кріомедицини. 2018; 28(2): 170.

13. **Власов ОО**. Експериментальна модель низькотемпературного впливу на шкіру. В: Матеріали XVI Міжнародної наукової конференції студентів, молодих вчених та спеціалістів «Актуальні питання сучасної медицини»; 28-29 березня, Харків. 2019. М-во освіти і науки України, Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна. Харків, Україна, 2019. С. 57.

14. **Власов ОО**, Ковальов ГО. Інтенсивність вільно-радикальних процесів при локальній холодовій травмі після введення екстракту кріоконсервованих фрагментів шкіри поросят або водного колоїдного розчину фулерену  $C_{60}$ . Проблемы кріобіології і кріомедицини. 2019; 29(2): 167.

15. **Власов ОО**. Показники крові щурів при введенні водного колоїдного розчину фулерену  $C_{60}$  в різних концентраціях. В: Матеріали XVI Міжнародної наукової конференції студентів, молодих вчених та спеціалістів «Актуальні питання сучасної медицини»; 26-27 березня, Харків. 2020. М-во освіти і науки України, Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна. Харків, Україна, 2020. С. 61.

16. **Vlasov ОО**, Kovalov GO, Halchenko SYe, Chyzh MO. Effect of cryopreserved fragments of piglet's skin extract or aqueous colloidal solution of fullerene  $C_{60}$  on wound healing after skin cryoablation. In: 1st International scientific and practical conference «Modern science: problems and innovations»; April 5-7, Stockholm. 2020. Stockholm SSPG Publish; Stockholm, Sweden, 2020. P. 84–87.

17. **Vlasov ОО**, Kovalov GO, Chyzh MO, Galchenko SYe. Influence of cryopreserved piglets skin fragments or aqueous colloidal solution of  $C_{60}$  fullerene on destruction and inflammation severity after skin cryodestruction In: The 57th

Annual Meeting of the Society for Cryobiology «CRYO 2020», 21-23 July, Chicago. 2020. Chicago, USA, 2020. p.13–14.

18. **Vlasov OO**, Kovalov GO, Myroshnychenko MS. Effect of extract of cryopreserved piglets skin fragments and aqueous colloidal solution of fullerene C<sub>60</sub> on epidermis morphology in cold skin wound. In: The 57th Annual Meeting of the Society for Cryobiology «CRYO 2020», 21-23 July, Chicago. 2020. Chicago, USA, 2020. p.59–60.

*Патенти України на корисну модель*

19. **Власов ОО**, Ковальов ГО, Тининика ЛМ, Прилуцький ЮІ, Белочкіна ІВ, Сандомирський БП, винахідники; Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, патентовласник. Спосіб лікування ран. Патент України № у 2016 04860. 2016, заявл. 29.04.2016; опубл. 25.10.2016, Бюл. №20.

## ANNOTATION

**Vlasov O.O. Effect of extract of cryopreserved piglet's skin fragments and fullerene C<sub>60</sub> on alterative and regenerative processes in skin after cryodestruction (experimental study). - The qualifying scientific paper as a manuscript.**

Thesis for the degree of Candidate of Medical Science (Philosophy Doctor) in specialty 14.01.35 - "Cryomedicine". – Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, 2021.

The thesis is devoted to the optimization of wound healing after skin cryoablation using a complex of regulatory bioorganic compounds and carbon nanoparticles in a comparative aspect. We studied regenerative processes after cryodestruction in hairless rats after intraperitoneal administration of the extract of cryopreserved piglet's skin fragments (PSCFE) and water colloidal solution of fullerene C<sub>60</sub> (AQSUF C<sub>60</sub>).

The experimental model of the destruction and regeneration processes after skin cryoablation in hairless rats was presented, which was characterized with local and systemic manifestations of destruction and inflammation and could be used to study the processes occurring after cryosurgical treatment of tumors. The cooling parameters in skin cryodestruction are stipulated by cryosurgical treatment requirements. There was a fast decrease in temperature at the point of contact of the applicator and skin to  $-75.5 \pm 7.9$  °C with a gradual rise of temperature up to  $-59.1 \pm 6.5$  °C during cryotherapy.

There were local and systemic manifestations of destruction and inflammation with the presence of a zone of primary necrosis caused by direct heat, demarcation leukocyte shaft, and zone of secondary necrosis developed as a result of hemodynamic changes, development of oxidative stress, manifested by increased primary and secondary products. Superoxide dismutase and catalase, as well as increasing the content of ceruloplasmin and C-reactive protein in serum.

It was found that the biological effects of the introduction into abdominal cavity of AQSUF C<sub>60</sub> at a dose of 1 mg/kg depend on its concentration. A solution with a concentration of 173 µmol/l has less activity than a solution with a concentration of 34.7 µmol/l as a result of its lower bioavailability due to aggregation and precipitation of fullerene in the precipitate at the injection site.

It is shown that the introduction of PSCFE and AQSUF C<sub>60</sub> was accompanied by accelerated wound healing after cryodestruction of skin, manifested by a decrease in morphological manifestations of destruction and inflammation as well as increased manifestations of reparative processes at macro- and microscopic levels. Fullerenes showed a more pronounced stimulating effect on reparative processes in wounds if compared with the extracts, which manifested as follows: on day 7 - thicker epithelium and layer of granulation tissue, less pronounced layer of secondary necrosis; on day 14 - a smaller area of wounds, greater thickness of epithelial layer, layers of demarcation leukocyte shaft and granulation tissue; on day 21 - by increasing the layer of granulation tissue.

After the introduction of AQSUF C<sub>60</sub>, a higher content of vascular component and a larger number of macrophages, lymphocytes and fibroblastic diferon cells in the granulation tissue were observed at all times of observation. However, in the group with fullerenes, the greatest number and severity of acanthotic growths of epidermis were observed, wherein an increase in mitotic activity of cells and, in some places, moderately pronounced dysplastic changes were found.

The simultaneous presence of signs of dysplasia and increased proliferative activity of epithelial cells after the introduction of AQSUF C<sub>60</sub> can be considered as a potential prerequisite for the development of precancerous skin diseases. Tissue regeneration after skin cryodestruction was more organotypic with administration of PSCFE, which was manifested by the formation of skin appendages on day 21 of observation.

It was found that the use of PSCFE after cryodestruction of skin was accompanied with balanced activation of cell proliferation and apoptosis in the



dermis, hypodermis and muscle tissue surrounding epithelial wound, as well as in filling the wound granulation and connective tissues.

The introduction of AQSUF C<sub>60</sub> was accompanied by an imbalance in the proliferation and apoptosis activity. This was manifested by a more pronounced, compared with the extracts, stimulation of cell proliferation: greater representation of the marker of proliferation Ki-67 in the epithelium and granulation tissue at 7 days; in the dermis, hypodermis and muscle tissue was found for all periods of observation.

The expression of p53 apoptosis marker in the epithelium after AQSUF C<sub>60</sub> introduction did not differ from the control on days 7 and 14. There was two times decrease in the number of p53 positive cells on day 21. The number of p53 positive cells increased only by 7 days and did not differ from those after the introduction of PSCFE in the dermis, hypodermis, muscle, granulation and connective tissues.

The identified imbalance in the regulation of the wound process after the introduction of AQSUF C<sub>60</sub> may lead to excessive connective tissue formation and subsequent formation of keloid scars, and, such dysplastic changes in the epithelial layer, may be the background for the development of tumors of epithelial origin.

Treatment with PSCFE or AQSUF C<sub>60</sub> helped to restore the balance of pro- and antioxidant systems and to reduce the level of markers of destructive and inflammation process in the animals with skin cryodestruction. It manifests itself as a normalization of the content of thiobarbituric acid reactive substances, diene conjugates, C-reactive protein and ceruloplasmin, as well as a rise in activity of superoxide dismutase and catalase to normal levels in serum by 21 days.

It was shown for the first time that the introduction of PSCFE and AQSUF C<sub>60</sub> after cryodestruction of the skin accelerates wound healing, manifested by a decrease in the severity of morphological manifestations of destruction and inflammation and an increase in the manifestations of reparative processes.

It has been proven for the first time that the introduction of AQSUF C<sub>60</sub> in animals after skin cryodestruction leads to an imbalance in the regulation of the

wound process, i.e. hyperstimulation of cell proliferation with a decrease in their apoptotic activity mainly in the epithelial layer and fibroblastic cells.

It has been shown for the first time that tissue regeneration by skin cryodestruction after PSCFE administration is more organotypic than after AQSUF C<sub>60</sub> one, which is manifested by the formation of skin appendages and greater balance of apoptosis and proliferation processes.

For the first time it was found that the use of PSCFE and AQSUF C<sub>60</sub> in animals after cryodestruction of the skin reduced the level of markers in the serum of destructive and inflammatory processes.

It was found for the first time that intraperitoneal administration of AQSUF C<sub>60</sub> at a dose of 1 mg / kg with a concentration of 34.7  $\mu\text{mol} / \text{l}$  caused reversible leukocytosis with increased content of segmental neutrophils and increased activity of aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT).

For the first time it was found that the use of a AQSUF C<sub>60</sub> at a concentration of 34.7  $\mu\text{mol} / \text{l}$  and 173  $\mu\text{mol} / \text{l}$  was accompanied by moderate anisocytosis of erythrocytes for all periods of observation.

An experimental model of tissue destruction and reparation after cryoablation of skin in hairless rats has been developed, that is suitable for studying the processes of pathogenesis and sanogenesis after cryosurgical treatment of pathological skin formations. The obtained data can be used in the development of new pathogenetically sound approaches when treating wounds.

Based on the data of studying the influence of AQSUF C<sub>60</sub> on the processes of lipid peroxidation (LPO) and morphological indices of destructive and regenerative processes in tissues after skin cryoablation, a method of wound healing was developed (Ukrainian patent UA111022 U).

The obtained data on the stimulation of cell proliferation by fullerenes on the background of a decrease in their apoptotic activity can experimentally justify the feasibility of performing studies of the long-term effects when using the AQSUF C<sub>60</sub> in various experimental models. The findings can be an experimental

justification for the feasibility of research on the possibility of including PSCFE into wound treatment protocols.

**Keywords:** skin cryodestruction, wounds, regeneration, piglets' skin cryopreserved fragments' extract, aqueous colloidal solution of unmodified fullerene C<sub>60</sub>

**ЗМІСТ**

<b>АНОТАЦІЯ</b>	2
<b>ЗМІСТ</b>	16
<b>ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ</b>	19
<b>ВСТУП</b>	20
<b>РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ</b>	26
1.1 Використання кріохірургії в медицині та механізм кріодеструкції	26
1.2 Стан тканин після термічного пошкодження	30
1.3 Підходи до регулювання процесу загоєння ран	33
1.4 Біологічна дія регуляторних пептидів	37
1.5 Біологічна дія фулеренів	43
<b>РОЗДІЛ 2 МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ</b>	49
2.1. Дизайн та об'єкти дослідження	49
2.2. Методи дослідження	52
2.2.1. Спектрофотометричний метод	52
2.2.2. Кріохірургічний метод	53
2.2.3. Контактна термометрія	54
2.2.4. Планіметричне дослідження	54
2.2.5. Гістологічне дослідження	55
2.2.6. Імуногістохімічне дослідження	55
2.2.7. Дослідження гематологічних показників	55
2.2.8. Проведення біохімічних досліджень	56
2.2.9. Статистична обробка результатів	61
<b>РОЗДІЛ 3 РОЗРОБКА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ МОДЕЛІ ПРОЦЕСІВ ДЕСТРУКЦІЇ ТА РЕПАРАЦІЇ ПІСЛЯ КРІОАБЛЯЦІЇ ШКІРИ У БЕЗЩЕРСТИХ ЩУРІВ</b>	62
3.1. Температурні параметри кріовпливу на шкіру	62
3.2. Морфологічна характеристика шкіри в нормі та після кріодеструкції	66
3.3. Показники системної відповіді організму піддослідних щурів на	

кріодеструкцію шкіри	73
<b>РОЗДІЛ 4 ДОСЛІДЖЕННЯ БІОЛОГІЧНИХ ЕФЕКТІВ ВВЕДЕННЯ В ЧЕРЕВНУ ПОРОЖНИНУ ФУЛЕРЕНУ C<sub>60</sub> У СКЛАДІ ВОДНОГО КОЛОЇДНОГО РОЗЧИНУ ЗА ВПЛИВОМ НА ГЕМАТОЛОГІЧНІ І БІОХІМІЧНІ ПОКАЗНИКИ КРОВІ ЩУРІВ</b>	80
4.1 Визначення спектрів поглинання розчинів фулерену C <sub>60</sub>	80
4.2 Гематологічні показники після введення інтактним щурам розчинів фулерену C <sub>60</sub>	82
4.3 Біохімічні показники сироватки крові після введення інтактним щурам розчинів фулеренів C <sub>60</sub>	84
<b>РОЗДІЛ 5 ЗАГОЄННЯ РАН ПІСЛЯ КРІОДЕСТРУКЦІЇ НА ФОНІ ВВЕДЕННЯ ЕКСТРАКТУ КРІОКОНСЕРВОВАНИХ ФРАГМЕНТІВ ШКІРИ ПОРОСЯТ ТА ВОДНОГО КОЛОЇДНОГО РОЗЧИНУ ФУЛЕРЕНУ C<sub>60</sub></b>	90
5.1. Макроскопічна характеристика ран після кріодеструкції шкіри і введення ЕКФШП і ВКРФ C <sub>60</sub>	91
5.2. Мікроскопічна будова ран після кріодеструкції шкіри та застосування ЕКФШП і ВКРФ C <sub>60</sub>	94
5.2.1. Гістологічна будова ран у тварин з кріодеструкцією шкіри	95
5.2.2. Гістологічна картина ран у тварин після кріодеструкції шкіри і введення ЕКФШП	104
5.2.3. Гістологічна будова ран у тварин після кріодеструкції шкіри і введення ВКРФ C <sub>60</sub>	110
5.3. Процеси проліферації і апоптозу в тканинах після кріодеструкції шкіри та підлягаючих м'яких тканин при введенні ЕКФШП і ВКРФ C <sub>60</sub>	130
<b>РОЗДІЛ 6 БІОХІМІЧНІ ПОКАЗНИКИ КРОВІ ЩУРІВ З КРІОДЕСТРУКЦІЄЮ ШКІРИ ТА ВВЕДЕННЯМ ЕКСТРАКТУ КРІОКОНСЕРВОВАНИХ ФРАГМЕНТІВ ШКІРИ ПОРОСЯТ І ВОДНОГО КОЛОЇДНОГО РОЗЧИНУ ФУЛЕРЕНІВ C<sub>60</sub></b>	150

6.1 Показники активності ПОЛ в сироватці крові	151
6.1.1 Рівень дієнових кон'югатів	152
6.1.2. Рівень ТБК-активних продуктів	15
6.1.3. Активність супероксиддисмутази	156
6.1.4. Активність каталази	158
6.2. Показники запалення і деструкції тканин в сироватці крові	156
6.2.1. Вміст С-реактивного білка	156
6.2.2. Вміст церулоплазміну	159
6.2.3. Вміст молекул середньої маси	161
6.2.4. Рівень метаболітів оксиду азоту	163
<b>УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ</b>	169
<b>ВИСНОВКИ</b>	177
<b>СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ</b>	180
<b>ДОДАТОК А. Список публікацій здобувача за темою дисертації</b>	209
<b>ДОДАТОК Б. Відомості про апробацію результатів дисертації</b>	213

**ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ**

АЛТ– аланінамінотрансфераза

АСТ– аспартатамінотрансфераза

ВКРФ С<sub>60</sub> – водний колоїдний розчин фулеренів С<sub>60</sub>

ДК – дієнові кон'югати

ЕКФШП – екстракт кріоконсервованих фрагментів шкіри поросят

КАТ – каталаза

ПОЛ – перекисне окислення ліпідів

РП – регуляторні пептиди

СОД – супероксиддисмутаза

СРБ – С-реактивний білок

ТБК – тіобарбітурова кислота

EGF – епідермальний фактор росту

FGF – фактор росту фібробластів

GH – гормон росту

GHL – пептид Гліцин + Гістидин + Лізин

GM-CSF – гранулоцитарно-макрофагальний колонієстимулюючий фактор

IGF-I – інсуліноподібний фактор росту

PDGF – тромбоцитарний фактор росту

PTP – Протеїнтирозинфосфатаза

TGF – трансформуючий фактор росту

TNF – фактор некрозу пухлини

VEGF – судинний ендотеліальний фактор росту

## ВСТУП

### **Обґрунтування вибору теми дослідження.**

Кріохірургічний метод ґрунтується на використанні низьких температур для деструкції патологічних тканин [2, 83, 188, 272]. До основних механізмів, які викликають пошкодження і загибель клітин, та некроз тканин під час кріодеструкції, відносять внутрішньоклітинне та позаклітинне утворення льоду, осмотичні ефекти, холодову денатурацію білків, судинні та запальні реакції [83]. В кріохірургії для визначення методів контрольованого руйнування тканин на основі застосування низьких температур використовують термін кріоабляція [36]. Для моніторингу глибини та площі кріоушкодження використовують такі параметри як: швидкість охолодження, цільова температура та експозиція впливу [83]. Кріоабляція широко застосовується в лікуванні кератозів, бородавок; доброякісних, передракових та злоякісних захворювань шкіри [2, 11, 27]. До переваг кріоабляції відносять стимуляцію специфічного протипухлинного імунітету, низький ризик метастазування та знеболювальний ефект охолодження [11, 229]. Для гарантованого руйнування пухлин шкіри необхідно підтримувати температуру в зоні кріовпливу нижче за поріг їх кріостійкості:  $-20-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  для доброякісних утворень,  $-40-50\text{ }^{\circ}\text{C}$  - для злоякісних пухлин [11, 83].

Відомо, що рани після кріодеструкції загоюються довше, ніж рани іншої етіології, тому скорочення термінів їх загоювання є актуальним науковим завданням. [2]. Одним з напрямків вирішення цього завдання може бути використання терапевтичного потенціалу біологічно активних субстанцій природного походження [88, 179, 203], та вуглецевих наноматеріалів, [23, 29, 45, 64].

Відомо, що екстракти кріоконсервованих фрагментів органів новонароджених поросят тканиноспецифічно стимулюють репаративну регенерацію при експериментальних патологічних станах [13, 179]. Є дані, що фулерени  $\text{C}_{60}$  також проявляють протизапальні та антиоксидантні



властивості на моделях патологічних процесів *in vivo* [29, 64, 65, 101]. Відомості щодо токсичності та біологічної доступності фулеренів  $C_{60}$  наразі є суперечливими [9, 48, 56, 239]. Вплив фулеренів  $C_{60}$  на біологічні системи залежить від дози, способу модифікації їх поверхні і концентрації у розчині, зокрема біологічні ефекти водних колоїдних розчинів залежать від розмірів агрегатів окремих молекул [86]. Є дослідження, де показана відсутність токсичності водних колоїдних розчинів немодифікованих фулеренів  $C_{60}$  [23, 79, 239].

Отже вивчення впливу екстрактів кріоконсервованих фрагментів шкіри поросят (ЕКФШП) та водного колоїдного розчину немодифікованих фулеренів  $C_{60}$  (ВКРФ  $C_{60}$ ) на процес загоєння ран після кріодеструкції шкіри є актуальною науковою проблемою.

#### **Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.**

Робота виконана у відділі експериментальної кріомедицини ІПКіК НАН України в рамках науково-дослідних тем Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України: «Вплив низьких температур та екстрактів серця і селезінки на процеси некротизації і регенерації міокарду, судин та хряща» (№ держреєстрації 0112U003133) і «Деструктивні та відновні процеси в тканинах *in vivo* після дії низьких температур та біологічно активних речовин» (№ держреєстрації 0117U000849).

**Мета і задачі дослідження.** Мета роботи - визначення особливостей процесу загоєння ран за кріодеструкції шкіри у безшерстих щурів після застосування екстракту кріоконсервованих фрагментів шкіри поросят та водного колоїдного розчину фулерену  $C_{60}$ .

Відповідно до поставленої мети необхідно було вирішити такі задачі:

1. Розробити експериментальну модель процесів деструкції і репарації тканин після кріоабляції шкіри у безшерстих щурів.
2. Дослідити біологічні ефекти введення в черевну порожнину водного колоїдного розчину фулерену  $C_{60}$  за впливом на гематологічні та біохімічні показники крові інтактних щурів.

3. Вивчити динаміку морфологічних проявів загоєння ран за кріодеструкції шкіри у безшерстих щурів після введення екстракту кріоконсервованих фрагментів шкіри поросят та водного колоїдного розчину фулерену  $C_{60}$
4. Дослідити динаміку процесів проліферації та апоптозу в тканинах після кріодеструкції шкіри і введення екстракту кріоконсервованих фрагментів шкіри поросят та водного колоїдного розчину фулерену  $C_{60}$ .
5. Дослідити біохімічні показники сироватки крові при введенні екстракту кріоконсервованих фрагментів шкіри поросят та водного колоїдного розчину фулерену  $C_{60}$  безшерстим щурам за кріодеструкції шкіри.

*Об'єкт дослідження* – загоєння ран у безшерстих щурів після кріодеструкції шкіри.

*Предмет дослідження* – деструктивні і відновні процеси в тканинах безшерстих щурів після кріодеструкції шкіри та введення екстракту кріоконсервованих фрагментів шкіри поросят або водного колоїдного розчину фулерену  $C_{60}$ .

**Методи дослідження.** У роботі використано такі методи: кріохірургічний, контактної термометрії, клінічного дослідження (в тому числі планіметричний), лабораторні (гематологічні, біохімічні), гістологічні (в тому числі: морфометричні, імуногістохімічні); спектрофотометричний, статистичні.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Вперше показано, що введення ЕКФШП та ВКРФ  $C_{60}$  після кріодеструкції шкіри прискорює загоювання ран, що проявляється зменшенням вираженості морфологічних проявів деструкції і запалення і збільшенням проявів репаративних процесів.

Вперше доведено, що введення ВКРФ  $C_{60}$  тваринам після кріодеструкції шкіри призводить до дисбалансу регуляції ранового процесу –

гіперстимуляції проліферації клітин зі зниженням їх апоптотичної активності переважно в епітеліальному шарі і клітинах фібробластичного ряду.

Вперше показано, що регенерація тканин за кріодеструкції шкіри після введення ЕКФШП є більш органотиповою, ніж після введення ВКРФ С<sub>60</sub>, що проявляється формуванням придатків шкіри і більшою збалансованістю процесів апоптозу та проліферації.

Вперше встановлено, що застосування ЕКФШП і ВКРФ С<sub>60</sub> у тварин після кріодеструкції шкіри знижувало в сироватці крові рівень маркерів деструктивних та запальних процесів.

Вперше встановлено, що інтраперитоніальне введення ВКРФ С<sub>60</sub> в дозі 1 мг/кг з концентрацією 34,7 мкмоль/л викликало зворотній лейкоцитоз з підвищенням вмісту сегментоядерних нейтрофілів та зростання активності аспаратамінотрансферази (АСТ) і аланінамінотрансферази (АЛТ) в сироватці крові щурів.

Вперше встановлено, що застосування розчину ВКРФ С<sub>60</sub> в концентрації 34,7 мкмоль/л та 173 мкмоль/л супроводжувалось помірним анізоцитозом еритроцитів на всі строки спостереження.

**Практичне значення отриманих результатів.** Розроблена експериментальна модель процесів деструкції і репарації тканин після кріоабляції шкіри у безшерстих щурів, яка придатна для вивчення процесів пато- та саногенезу після кріохірургічного лікування патологічних утворень шкіри. Отримані дані можуть знайти застосування при розробці нових патогенетично обґрунтованих підходів в лікуванні ран. На основі даних дослідження впливу ВКРФ С<sub>60</sub> на процеси перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) та морфологічні показники деструктивних та відновних процесів в тканинах після кріоабляції шкіри було розроблено спосіб лікування ран (патент України UA111022 U). Отримані дані щодо стимуляції фулеренами проліферації клітин на тлі зниження їх апоптотичної активності можуть бути експериментальним обґрунтуванням доцільності проведення досліджень віддалених наслідків застосування ВКРФ С<sub>60</sub> на різних експериментальних

моделях. Отримані дані можуть бути експериментальним обґрунтуванням доцільності проведення досліджень щодо можливості включення ЕКФШП в протоколи лікування ран.

**Особистий внесок здобувача.** Автором проаналізована наукова література з досліджуваної проблеми. Основні результати досліджень, які наведені в дисертації, одержані здобувачем особисто. Спільно з науковим керівником визначені тема, мета, задачі роботи та методи досліджень. Статистична обробка, аналіз, інтерпретація та узагальнення одержаних результатів, а також формулювання основних положень і висновків проведені автором самостійно. При виконанні окремих розділів було отримано методичну та консультативну допомогу від д.мед.н., проф. Б.П. Сандомирського, д.б.н., с.н.с. С.Є. Гальченка, д.ф.-м.н., проф. Ю.І. Прилуцького, д.мед.н., доц. М.С. Мірошніченка, к.б.н., с.н.с., І.В. Белочкіної.

**Апробація результатів дисертації.** Матеріали роботи доповідались та обговорювались на:

1. 1st Central European Conference on Regenerative Medicine «CECRM 2015» (м. Бидгощ, Польща 2015)
2. 39-а щорічна наукова конференція молодих вчених. «Холод в биологии и медицине – 2015. Актуальные вопросы криобиологии, трансплантологии и биотехнологии» (м. Харків, 2015)
3. The 52nd Annual Meeting of the Society for Cryobiology «CRYO 2015» (м. Острава, Чехія, 2015)
4. «Ukrainian-German Symposium on Physics and Chemistry of Nanostructures and on Nanobiotechnology» (м. Київ, 2015)
5. 40-а щорічна наукова конференція молодих вчених. «Холод в биологии и медицине 2016» (м. Харків, 2016)
6. 4th International research and practice conference «Nanotechnology and nanomaterials NANO-2016» (м. Львів, 2016)

7. 42-га щорічна наукова конференція молодих вчених. «Холод в біології і медицині 2018» (м. Харків, 2018)
8. XVI Міжнародна наукова конференція студентів, молодих вчених та спеціалістів. «Актуальні питання сучасної медицини» (м. Харків, 2019)
9. 43-тя щорічна наукова конференція молодих вчених «Холод в біології і медицині 2019» (м. Харків, 2019)
10. XVII Міжнародна наукова конференція студентів молодих вчених та фахівців «Актуальні питання сучасної медицини» (м. Харків, 2020)
11. The 1st International scientific and practical conference. «Modern science: problems and innovations.» (Stockholm, Sweden, 2020).
12. The 57th Annual Meeting of the Society for Cryobiology «CRYO 2020» (Chicago, USA, 2020)
13. The 56 Meeting of the Society for low temperature biology 2020 «SLTB-2020» (Louvain, Belgium, 2020)

**Публікація матеріалів.** Основні положення дисертації викладені в 19 наукових роботах: 5 статтях, опублікованих в фахових наукових виданнях, 3 з яких входять до наукометричної бази даних Scopus; і в 13 тезах доповідей. Отримано 1 патент України на корисну модель.

**Обсяг і структура дисертації.** Робота викладена на 214 сторінках. Вона має вступ, основну частину, яка складається з шістьох розділів (огляд літератури, матеріали і методи дослідження, отримані результати та їх обговорення), узагальнення, висновки. Список використаної літератури складає 280 джерел і викладений на 29 сторінках. Дисертація містить 50 рисунків та 16 таблиць.

## РОЗДІЛ 1

### ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

#### 1.1 Використання кріохірургії в медицині та механізм кріодеструкції

Низькі температури в медичних цілях використовуються достатньо широко [2, 83, 188]. Кріохірургічний метод лікування злоякісних утворень шкіри має ряд незаперечних переваг порівняно з іншими методами, оскільки дозволяє зруйнувати заданий об'єм утворення з мінімальною травматизацією здорових тканин без формування грубих рубців при загоєнні [37, 152, 190, 209].

Терміни кріобіологія і кріохірургія стають знайомі не тільки хірургам, але і лікарям суміжних спеціальностей. Проте, не дивлячись на те, що вплив холодом має таку ж багатовікову історію, як і сама медична наука, тільки в останні десятиліття кріогенний метод набув достатнього поширення в різних областях медицини, а сама кріохірургія стала самостійним напрямком науки [188, 210].

Кріоабляція - це метод контрольованого руйнування тканин на основі застосування низьких температур, який широко застосовується в лікуванні доброякісних, передракових та злоякісних захворювань шкіри [2, 11, 27, 36]. Розвитку кріохірургії останніми роками сприяла як поява нових приладів, так і інтенсивний розвиток кріобіології і кріомедицини. Кріохірургічний метод має ряд переваг перед іншими методами лікування. Він дозволяє повністю зруйнувати заданий об'єм нормальних або патологічно змінених біологічних тканин, розташованих як поверхнево, так і в глибині органу [2, 69, 214, 230, 240]. Стимуляція специфічного протипухлинного імунітету, зниження ризику метастазування, та знеболюючий ефект охолодження є важливими перевагами кріохірургічних втручань [11, 229]. Завдяки розвитку перифокальній реакції у вогнищі кріонекрозу тромбуються судини мікроциркуляторного русла, що попереджає виникнення вторинних

кровотеч. Для посилення кріовпливу застосовують повторні цикли заморожування [2, 83, 279].

Для моніторингу глибини та площі розповсюдження крижаного фронту використовують такі параметри як: цільова температура швидкість охолодження та експозиція впливу [2, 83]. Відомо, що резистентність судинної стінки великого діаметру до низькотемпературного впливу дозволяє, при певних умов, безпечно проводити кріодеструкцію в тканинах, що знаходяться в близькості від них [228, 271].

Для повного руйнування пухлин шкіри необхідно підтримувати в зоні кріовпливу температуру нижче за поріг кріостійкості тканин. для доброякісних утворень - мінус 20-30°C, для злоякісних пухлин - мінус 40-50 °C [11, 83].

Механізм пошкодження клітин в результаті низькотемпературного впливу, в основному, залежить від процесу замерзання води, з якої переважно складаються клітини живих організмів. При охолодженні живих тканин виникає різке уповільнення кровотоку і стаз крові в судинах, які переповнюються еритроцитами. Подальше зниження температури призводить до початку кристалоутворення в позаклітинному просторі, а при подальшому зниженні температури починається утворення кристалів льоду всередині клітин [139, 188].

Кристали льоду, що утворилися, не тільки механічно руйнують мембрани клітин, але і витісняють їх в рідкі гіпертонічні і осмотично активні мікрофази. При контакті клітин з таким середовищем відбуваються два дуже швидкі мікроскопічні процеси: дегідратація клітин і локальні деформації плазматичної мембрани, за яких частина мембрани може вакуолізуватися [183, 211, 248, 259]. Природньо, що в таких випадках ефективна площа плазматичної мембрани може зменшитися. Результатом цього процесу є вихід з клітин молекул вільної води (процес дегідратації), а також іонів  $K^+$ ,  $Cl^-$  і  $H^+$ , при цьому в клітину входить  $Na^+$ ,  $OH^-$   $HCO_3^-$ . В результаті цих процесів зовні і усередині клітин може змінитися рН. Пряма дія температури,

внутрішньоклітинні кристали льоду, що утворюються, зміна рівня гідратації, рН і іонного гомеостазу сильно впливають на бар'єрні і функціональні властивості плазматичної мембрани [184, 249] і на структурний стан білків цитоскелету [243], відповідальних за просторову організацію і стабільність клітин, внутріклітинних органел, ядра, транспорт іонів і метаболітів, енергозабезпечення і синтетичні процеси, що в результаті може призвести до загибелі клітин.

Слід зазначити також, що інтенсивність загибелі клітин при заморожуванні залежить не тільки від мінімальної температури, але і від швидкості охолодження [28, 36, 137, 260]. Оптимальним для кріохірургії є відносно швидке заморожування із швидкістю 40 – 50 °C/хв. Припинення охолодження призводить до початку процесу відігрівання, який викликає не менш інтенсивну, чим заморожування, деструкцію клітин. Крім того, при підвищенні температури тканини виявляється пошкоджуюча дія високої концентрації електролітів. Нарешті, при повільному зігріванні інтрацелюлярні кристали льоду ще якийсь час продовжують рости і тим самим сильніше ушкоджують внутрішньоклітинні структури. Відігрів із швидкістю 10-12 °C/хв, а саме така швидкість частіше за все спостерігається при самовідігріванні вогнища кріодеструкції, забезпечує найбільш надійну деструкцію клітин [133, 142].

Безпосередньо після відігріву замороженої області відбувається повне або часткове відновлення кровотоку і збільшення просвіту судин. Проте, через деякий час, виникає стаз крові, агрегація формених елементів і тромбоутворення [250]. Необоротна закупорка судин обумовлює порушення процесів обміну в тканині і подальше поглиблення деструктивних змін. Отже, некроз тканини в зоні заморожування після повного відігрівання залежить також і від розвитку ішемії, пов'язаної із зміною проникності і кровообігу в дрібних судинах [269].

При застосуванні повторних циклів заморожування вдається одержати в охолодженій тканині нижчі температури, ніж при першому заморожуванні.



Це явище пояснюється не тільки руйнуванням клітинних мембран і термоізоляційних структур. Слід враховувати також, що жива тканина, піддана заморожуванню і відтаванню, збільшує свою теплопровідність на 10-20%. При повторних циклах заморожування та відігріву теплопровідність продовжує підвищуватися. Ефективність повторної кріодеструкції значною мірою залежить від часу, що пройшов між циклами заморожування - відігрівання. Чим коротший цей час, тим більше створюється умов для посилення процесу деструкції під впливом повторного кріовпливу.

Виходячи з наведених даних можна виділити наступні ланки патогенезу кріонекрозу [242]:

1. Різке підвищення концентрації електролітів зовні та всередині клітин внаслідок утворення льоду.
2. Деполімеризація тривимірної мережі білків цитоскелету клітин, а від їх стану і властивостей залежать такі важливі клітинні параметри, як форма, бар'єрні і структурні властивості плазматичних і внутрішніх мембран, транспорт іонів і метаболітів, енергозабезпечення і синтетичні процеси.
3. Механічне пошкодження клітинних мембран кристалами льоду, і як наслідок порушення клітинного метаболізму, накопичення токсичних продуктів в летальних концентраціях.
4. Ішемічна гіпоксія із-за порушення тканинного кровообігу в результаті тромбоутворень.
5. Імунологічна реакція унаслідок формування антитіл до замороженої тканини.

Під час кріохірургічних втручань, заморожування здійснюється за допомогою кріоінструментів з активним чи пасивним охолодженням, що забезпечують швидке охолодження тканин до температур, нижчих за їх кріостійкість [11]. Між зоною охолодження та оточуючими тканинами відбувається теплообмін, саме тому необхідно підтримувати стабільно низьку температуру кріоаплікатора.

Відомо, що в процесі заморожування неможливо зруйнувати лише патологічну тканину, є ризик травмування навколишніх тканин [83]. Тому, вивчення процесів деструкції та подальшої регенерації після кріодеструкції є важливим як для забезпечення повного руйнування патологічної тканини, так і зменшення травматизації нормальних тканин.

## **1.2 Стан тканин після термічного пошкодження**

При дії на тканини організму високих і низьких температур відбувається термічне ураження тканин, що проявляється у вигляді опіків і відморожень [144, 188, 205, 232]. Місцеве охолодження холодним повітрям, водою, льодом, різними хладагентами, в тому числі і кріоаплікаторами, викликають обмежене ураження тканин - відмороження. Протягом патологічного процесу при відмороженнях розрізняють два періоди: перший - прихований, або період зігрівання, і другий - реактивний, після зігрівання. У прихованому періоді ділянка шкіри, що переохолоджувалася, стає блідою, втрачає чутливість. У реактивному періоді відбувається поступове підвищення температури тканин і виявляються, залежно від ступеня ураження, ознаки запалення або некрозу тканин. Першими ознаками настання реактивного періоду є підвищення температури тканин, розвиток набряку і поява ціанозу шкірних покривів.

Залежно від ступеня пошкодження тканин, тривалості дії низьких температур розвивається один з чотирьох ступенів відмороження [7, 186]. Запалення, яке при цьому виникає, характеризується швидкістю розвитку і низькою специфічністю подій, що відбуваються.

Запалення є каскадом реакцій, що виникає як перший - неспецифічний етап захисту організму. Клітини імунної системи в нормі розсіяні по всіх тканинах тіла, але, якщо виникає осередок запалення, ці клітини і їх продукти концентруються саме в ньому, саме цей процес називають запальною реакцією [140, 215]. Під запаленням в даний час розуміють реакцію захисту організму, що забезпечує надходження лейкоцитів і деяких білків крові в

місця проникнення інфекції або пошкодження тканин [227, 270]. Всі клітини, задіяні в цьому процесі, і цитокіни, які вони секретують, відносяться, переважно, до системи імунітету. Очевидно, що запалення є однією з якнайдавніших реакцій, які виникли на ранніх етапах еволюції. Основне її призначення - захист організму від чужорідних речовин або звільнення від зруйнованих власних клітин.

Патогенез відморожень, не дивлячись на значну кількість опублікованих робіт, залишається ще недостатньо з'ясованим [24, 149, 241, 252]. Слід виділити три основні теорії патогенезу розвитку відморожень: теорія безпосередньої дії низьких температур, нервово-рефлекторна теорія змін в зоні кріопошкодження, теорія порушення кровообігу в тканинах після відмороження [188]. У частини клітин спостерігається короткочасне підвищення обміну речовин, що супроводжується витрачанням джерел теплопродукції, яке потім змінюється зниженням інтенсивності біохімічних процесів. Далі йде зниження активності окислювально-відновлювальних ферментів, зменшення синтезу нуклеїнових кислот і білків. Розвиток набряку тканин при холодової травми пов'язаний з підвищенням проникності судинної стінки, а також гідрофільністю тканин, обумовленою порушенням кислотно-лужної рівноваги (зрушення у бік ацидозу) [265]. Кисла реакція призводить до набухання тканинних колоїдів, підвищення поверхневого натягнення і осмотичного тиску, який сприяє розвитку гіперемії. Слід зазначити, що підвищення осмотичного тиску викликає різке порушення тканинного обміну, що веде до зміни активності ферментативних процесів, некрозу клітин і тканин, інтоксикації продуктами протеолізу.

В сучасній літературі виділяють три фази ранового процесу при обмороженні (локальній холодовій травмі): фаза запалення, фаза некрозу та його демаркації, фаза рубцювання і епітелізації ран [36, 188, 229]. Часові інтервали цих фаз не є жорстко фіксованими та перекриваються. Місцеве пошкодження холодом супроводжується порушенням цілісності шкіри, тобто

призводить до рани. Враховуючи те, що на шкірі присутня мікрофлора, відмороження слід вважати переважно інфікованими.

Фаза запалення характеризується класичними ознаками: біль, набряк, почервоніння, місцеве підвищення температури та дисфункція ураженої кінцівки [36, 229]. Особливістю цієї фази при місцевій холодній травмі є те, що прояви її розвиваються лише після прогрівання тканин. Біль - це перший прояв обмороження, її виразність залежить від глибини та площі обмороження. Набряк тканин виникає в результаті порушень у мікроциркуляторному руслі, і може призводити до розвитку трофічних порушень і некрозу. Крім того, набряки сприяють накопиченню в тканинах ураженої ділянки токсичних продуктів з подальшим потраплянням їх у системний кровообіг та розвитку токсикозу. Після відновлення кровообігу в зоні обмороження з'являється токсемія і припиняється лише після формування демаркаційного лейкоцитарного валу. місцеве підвищення температури і почервоніння шкіри виникають як прояви запалення. Запальний процес може бути пов'язаним як з розвитком інфекції так і асептичним.

Фаза розвитку некрозу та його демаркації залежить не тільки від температури та часу впливу, а також від гемодинамічних порушень [36, 229]. Процес некрозу тканин після холодової травми триваліший, ніж при опіках, за рахунок області сублетального пошкодження тканин, які можуть загинути або залишитися життєздатним після відігріву. При порушенні цілісності шкіри створюються умови для розвитку інфекційного процесу, який може призвести до розвитку системної запальної реакції і втрати частин кінцівок.

Фаза рубцювання та епітелізації ран є результатом попередніх фаз ранового процесу і визначатиме косметичний і функціональний результат обмороження [83, 229]. Після очищення від некротичних мас, рана заповнюється грануляційною тканиною, що передуює розвиток епітелізації дефекту.

Таким чином, при дії низьких температур загибель клітин відбувається як в результаті безпосередньої дії патогенного фактора, і реалізується за рахунок механічного пошкодження тканин, так і внаслідок пошкодження структурних компонентів тканин внаслідок ішемічних порушень, а саме повним руйнуванням судин мікроциркуляторного русла, спазмом і парезом судин середнього діаметра з розвитком стаза та тромбоутворення [11, 27, 229]. Інтенсивність пошкодження клітин під час кровопливу залежить від швидкості та тривалості охолодження, кінцевої температури охолодження та виду тканин, кількості циклів заморожування-відігріву [2, 83].

### **1.3 Підходи до регулювання процесу загоєння ран**

Застосування традиційних методів асептики та антисептики в комплексному лікуванні ран, таких як: хірургічна обробка і санація ран, місцева та системна антибіотикотерапія, адгезивні пов'язки та інше; не завжди дозволяють нормалізувати процеси регенерації в уражених тканин та досягти кращого функціонального та косметичного ефекту після лікування, тому розробляються та впроваджуються нові підходи, використовуються різні засоби регуляції і корекції процесу загоєння ран [50, 94, 206, 219, 233, 258, 277]. Перспективним є використання біологічно активних речовин, такі як цитокіни, гормони, нейропептиди, регуляторні природні і синтетичні пептиди, вуглецеві наносполуки та ін. [23, 40, 45, 57, 88, 90, 236].

Загоєння ран має оптимальний перебіг зі зміною фаз ранового процесу при збалансованості процесів запалення та регенерації, тоді як за імуносупресії репаративні процеси уповільнюються, активуються запальні процеси, рани загоюються довше та з ускладненнями [254].

В роботах Бизова В.В. було патогенетично обґрунтовано застосування препаратів імунобіологічної дії екстрактів фрагменти селезінки свиней, в комплексі лікування хворих з гнійними процесами легень та плеври [154, 156]. Авторами було показано, що екстракти фрагментів селезінки і серця свиней проявляють імуномодулюючу дію.

При бактеріальній забрудненості рани, значних порушеннях мікроциркуляції, лімфодинаміки і метаболізму, порушується ауторегуляція ранового процесу та змінюються спектри секреції цитокінів. інгібуючі чинники переважають індукуючі, зменшується секреція системних регуляторних пептидів, уповільнюється протікання фаз ранового процесу [54, 55]. Такі зміни можуть сприяти тривалому загоюванню ран і утворенню келоїдних рубців,

Актуальним є вивчення впливу на процес загоєння ран біологічно активних речовин ендогенного походження, ряду інтерлейкінів [35, 99, 124], таких як колонієстимулюючий чинник (GM-CSF), гормон росту (GH), епідермальний фактор росту (EGF), інсуліноподібний фактор росту (IGF-I), фактор росту фібробластів (FGF), тромбоцитарний фактор росту (PDGF), трансформуючий фактор росту (TGF), чинник некрозу пухлини (TNF), судинний ендотеліальний фактор росту (VEGF), та ін.

В комплексі лікування інфікованих ран застосовуються синтетичні аналоги цитокінів, а також виготовлені методами генної інженерії. Більшість цитокінів мають пептидне походження і продукуються в рані тромбоцитами, макрофагами, лімфоцитами, клітинами судинного ендотелію – локальні фактори росту, або потрапляють в рану з кровоносного русла (IGF-I, GH, різні нейропептиди) – системні фактори росту.

TGF займає важливу роль в процесах контракції рани та стимуляції процесів неоангіогенезу і колагеногенезу. Описано, що TGF в дозі від 1 - 5 мкг при місцевому лікуванні септичних ран сприяє на швидкість трансформації фібробластів в міофібробласти. [63, 40]. В той же час, спостерігали активізацію запального процесу і порушення процесів реепітелізації, що звужують можливості його використання в клінічній практиці.

Було показано, що EGF прискорює процеси реепітелізації, помірно прискорює розвиток грануляційної тканини та, в значній мірі, не впливає на процеси неоангіогенезу [17, 71]. Внесення в рану EGF в дозі 10 мкг/мл

прискорювало процеси реепітелізації, порівняно з контролем, на 50 %, а новоутворений епітелій мав більш товстий шар і велику кількість клітинних елементів фібробластичного ряду.

Відомо, що VEGF ініціює утворення нових капілярів і діє безпосередньо на ендотеліальні клітини судин [84]. Є данні, що застосування VEGF в дозі 200 - 1000 нг/мл ефективно стимулює неоангіогенез.

FGF - поліпептид, який стимулює неоангіогенез, наразі відомо 8 його лізоформ, в регенеративних процесах особливе значення мають FGF1 і FGF2 [98]. Синтетичний FGF в дозі 100 мкг/см<sup>2</sup> поверхні рани, скорочує строки репарації ран, прискорює зростання фібробластів і круглих клітин в грануляційній тканині, стимулюючи процеси хемотаксису і клітинної диференціації не впливаючи на вміст колагену [98].

Є дослідження, в яких GM-CSF проявив ефективність у лікуванні інфікованих ран з високим рівнем бактеріальної забрудненості [97]. GM-CSF стимулює накопичення фібробластів та диференціацію в міофібробласти в ранах, знижує рівень лейкоцитарної інфільтрації і стимулює процеси неоангіогенезу. Нанесення на забруднені бактеріями (*E. Coli*) рани GM-CSF в дозах 1 - 10 мкг/см<sup>2</sup> прискорює строки загоєння інфікованих ран до строків загоєвання не інфікованих. Знижується рівень бактеріальної забрудненості ран, Автори припускають наявність у GM-CSF бактерицидного ефекту через активацію макрофагальних реакцій [97].

Використання PDGF-BB в лікуванні гнійних ран в поєднанні з IGF-I (в) показало більшу ефективність, в порівнянні з монотерапією PDGF-BB [68]. При комбінованому застосуванні PDGF-BB та IGF-I (в співвідношенні 2:1) на 95 % прискорюється епітелізація рани і в 2,4 рази збільшується об'єм грануляцій, порівняно з показниками у хворих з монотерапією PDGF-BB.

GH регулює регенеративні процеси в рані, здатен взаємодіяти з рецепторами на лімфоцитах, макрофагах і нейтрофілах. підвищувати метаболічну активність клітин та стимулювати вироблення інших факторів

росту [47]. GH підвищує концентрацію в рані IGF-I, який, в свою чергу, регулює вироблення інших цитокінів в рані.

Розуміння того, що функції імунної системи можуть істотно мінятися (у бік активізації або інгібування) під впливом різних ендогенних і екзогенних чинників, привело до появи нового класу фармакологічних засобів - імунотропних препаратів, які є природними або синтетичними речовинами, здатними впливати на різні ланки імунної системи і, внаслідок цього, регулювати імунні реакції [46, 187].

За даними літератури відомо, що при локальній холодовій травмі спостерігається набряк тканин, стаз клітинних елементів крові і тромбоз, що веде до подальшого розвитку некрозу тканини [6, 14, 127, 131, 194]. З огляду на вищенаведені данні, досліджувалась ефективність додаткової фармакологічної корекції відморожень препаратами з групи серотонінергічних засобів та опіоїдних пептидів [217].

Механізм фармакологічної дії опіоїдних пептидів обумовлений їх анальгетичною дією, обмеження больового аферентного потоку сприяє активізації регуляторних систем організму. Так, серотоніну адипінат оказує стимулюючу дію на гладку мускулатуру судин, знижує інтенсивність вільнорадикального окислення, збільшує стійкість капілярів, нормалізує функцію нейтрофілів при різних патологіях [217].

В роботі [216] проводилося вивчення фармакологічної корекції контактного відмороження за допомогою комбінованого лікування селективним агоністом дельта-опіоїдних рецепторів і серотонінергічних засобом (серотоніну адипінат) в експерименті. Включення в комплекс лікування комбінації селективного агоніста дельта-опіоїдних рецепторів (10 мкг / кг) і серотоніну адипіната (4,5 мг / кг) на 14 добу після моделювання контактного відмороження призводило до збільшення рівня мікроциркуляції на 27,2% в порівнянні з групою, що не одержувала лікування.

Відомо, що застосування TNF та ряду інтерлейкінів, сприяє активізації місцевого імунітету при лікуванні ран [102]. Деякі інтерлейкіни здатні



стимулювати секрецію GH та здійснювати регуляцію вмісту в рані інших цитокінів в першій фазі ранового процесу [1, 74].

Останнім часом активно впроваджується системна ензимотерапія - сучасний лікувальний метод [34, 98, 164, 181, 197, 246], заснований на комплексній дії цілеспрямовано складених сумішей гідролітичних ензимів природного походження. Механізми дії системної ензимотерапії включають: 1) стимуляцію фагоцитозу; 2) посилення цитотоксичної активності макрофагів; 3) руйнування циркулюючих імунних комплексів; 4) зменшення пошкоджень, що індукуються комплементом за рахунок зниження активності останнього; 5) нормалізацію продукції цитокінів, зокрема, цитокінів, що володіють прозапальним ефектом; 6) регуляцію експресії адгезивних молекул, що відображається в зниженні інтенсивності запальної реакції; 7) зниження рівня білків гострої фази.

Приведені вище данні демонструють важливу роль біологічно активних речовин ендogenousного походження на усі ланки запального процесу, з огляду на їх пептидний склад, пептидоміка є актуальним напрямком досліджень.

#### **1.4. Біологічна дія регуляторних пептидів**

Одним з пріоритетних напрямків розвитку сучасної фізіології та імунології є глибоке дослідження регуляції специфічних клітинних функцій [12, 15, 77, 275]. Проводяться дослідження механізмів регуляції імунної системи, вивчаються механізми міжклітинної кооперації, дистантної взаємодії клітин, патогенезу різних захворювань та ін. [4, 95, 157].

Численні дослідження переконливо доводять, що основні системи, які відповідають за підтримку гомеостазу та адекватну реакцію на різноманітні впливи (нервова, ендокринна, імунна) мають спільний механізм хімічної регуляції. В основі цього механізму лежить продукція та секреція цілої низки речовин пептидної природи [52]. Такі молекули отримали загальну назву РП. І сьогодні не викликає сумніву, що РП (регуляторні пептиди) відіграють

провідну роль в підтримці гомеостазу шляхом визначення основних параметрів формування компенсаційно-приспосувальних реакцій організму на стресорний вплив та порушення гомеостатичного балансу. І біологічна дія тканинних екстрактів пов'язується з наявністю в них РП.

Велика увага в сучасній біології і медицині приділяється вивченню участі речовин пептидної природи в регуляції гомеостазу окремих клітинних популяцій і їх ролі як сигнальних молекул, що забезпечують комунікативні взаємозв'язки в нормі та при патологічних станах [145]. Наразі біологічно активні пептиди (з м. м. до 10000) виділені практично з усіх внутрішніх органів. Експериментальні дослідження показали наявність у екстрактів репаративних ефектів та здатність регулювати функціональну активність клітинних популяцій [39, 82, 273]. Встановлено, що РП з різних органів і тканин розрізняються молекулярною масою, пептидним складом, і іншими параметрами [198].

Серед РП можна відзначити пептид Гліцин + Гістидин + Лізин (GHL), який стимулює синтез колагену і еластину, збільшує синтез глікозаміногліканів позаклітинного матриксу дерми, модулює структурну перебудову шкіри, впливаючи на активність протеолітичних ферментів і їх інгібіторів, та на синтез колагену I типу фібробластами *in vitro* [85, 109].

Відомо, що пептид GHL дозозалежно стимулював синтез сульфатованих глікозаміногліканів позаклітинного дерматансульфату і пов'язаного з клітинним моношаром гепарансульфату [3]. При високих концентраціях пептиду швидкість їх синтезу поверталася до рівня контролю. При цьому не було відзначено стимулюючого впливу GHL на синтез гіалуронової кислоти. Пептид також підвищував накопичення міжклітинної речовини сполучної тканини і тим самим прискорював її утворення [125].

В експериментальних роботах [212, 213] показано стимулюючу дію пептиду на регенерацію шкіри при введенні в дозах 0,5 і 1,5 мкг / кг., що підтверджувалося морфологічними дослідженнями ран. У порівнянні з контрольною групою тварин, у щурів, які отримували пептид в дозі 0,5 мкг /

кг, відзначалося зменшення набряку в області рани, виражене зниження щільності клітинного інфільтрату за рахунок меншої кількості лімфоцитів і макрофагів, а також переважання зрілих фіброblastів над незрілими, що свідчить про більш сприятливий перебіг процесів регенерації під впливом пептиду. Подібна GHЛ послідовність амінокислот виявлена в молекулі колагену, у зв'язку з цим зроблено припущення про те, що він може утворюватись під впливом протеаз в місці пошкодження [213]. Необхідно відзначити, що не тільки пептид GHЛ, але і комбінація амінокислот (гліцин + гістидин + лізин), що входять до його складу, стимулювали загоєння шкірних ран. При введенні амінокислот окремо було встановлено, що гліцин і гістидин не впливали на загоєння шкірних ран, тоді як введення лізину підвищувало регенерацію. Репаративну дію комбінації амінокислот і лізину підтверджувалося морфологічними дослідженнями ран [212]. У порівнянні з контрольною групою тварин, у щурів, які отримували комбінацію амінокислот і лізин, спостерігалось зменшення набряку в області рани, зниження щільності клітинного інфільтрату за рахунок меншої кількості лімфоцитів і макрофагів, а також переважання зрілих фіброblastів над незрілими, що свідчить про більш сприятливий перебіг процесів регенерації під впливом амінокислот. Ефекти GHЛ можуть бути пов'язані з лізином, що утворюється в результаті можливого протеолізу пептиду [212]. Крім того, цей пептид одночасно підсилює синтез колагену I типу та розпад старого колагену в шкірних ранах. Також було встановлено, що GHЛ регулює перебудову структури шкіри (її ремоделювання), активуючи металопротеїнази - ферменти, що відповідають за руйнування компонентів позаклітинного матриксу дерми.

Пептиди, що входять до складу екстрактів органів, відновлюють імунологічну реактивність клітин, регулюють реакції клітинного імунітету, стабілізують обмін речовин, стимулюють репаративні процеси [34, 164, 181, 197, 246]. Це сприяє прискоренню загоєння пошкоджень на шкірі, зменшенню прояву запальних реакцій, відновленню захисних властивостей

шкіри, що дозволяє оберігати шкіру від дії різних ушкоджуючих чинників. Пептиди активізують також ріст волосяних фолікулів, що сприяє зміцненню коренів волосся і прискоренню його росту. Ці екстракти проявляють також дію, спрямовану на відновлення нормального функціонування клітин стінки судин. Вони відновлюють порушену мікроциркуляцію, нормалізують проникність судинної стінки, регулюють процеси обміну речовин в клітинах судинної стінки. Це призводить до поліпшення кровопостачання і посилення живлення клітин, зміцнення стінок судин, активізації діяльності клітин.

Екстракти тимусу виконують важливу роль у відновленні нормального функціонування клітин хрящової та сполучної тканини, колагенових волокон шкіри. Пептиди екстракту регулюють процеси метаболізму в клітинах хрящової тканини, стимулюють регенерацію фібробластів шкіри і кератиноцитів, перешкоджають деструктивним змінам в колагеновій структурі шкіри [268]. Крім того, пептиди екстракту відновлюють нормальне функціонування клітин ендокринної системи, регулюють обмінні процеси і синтез білка в клітинах, проявляють високу антиоксидантну активність і нормалізують процеси ПОЛ. Це сприяє усуненню негативної дії зовнішніх несприятливих чинників (забрудненості повітря, емоційного стресу, сонячного випромінювання, кліматичних змін і ін.).

На особливу увагу заслуговують дані про використання пептидних екстрактів, одержаних з різних органів в т.ч. нирки, які свідчать що регуляторна дія пептидів може бути направлена на лімфоцити та інші лімфоїдні клітини. Ці екстракти продемонстрували можливість модулювати процеси апоптозу клітин, впливаючи на експресію деяких поверхневих молекул плазматичних мембран [164, 163].

В роботі [245] досліджувався вплив РП тимусу та нирок на експресію білка Vcl-2. Описуються механізми дії РП: вони здатні здійснювати фізіологічну регуляцію процесів апоптозу тимоцитів, та вбудовуватись прямо в плазматичну мембрану та зв'язуватись з специфічними рецепторами. Виявлене підсилення експресії білка Vcl-2, вказує на пригнічення процесів

апоптозу при застосуванні екстрактів тимуса, регуляція відбувається диференційовано, в залежності від співвідношення експресії в клітинах антиапоптичних (Bcl-2) та проапоптичних білків (p53). і полягає в індукції або інгібуванні апоптозу тимоцитів. За фізіологічних умов основним фактором регуляції апоптозу тимоцитів виступає білок Bcl-2 [245].

В роботах відділу експериментальної кріомедицини ІПКіК НАН України у була проведена оцінка терапевтичної дії екстрактів з кріоконсервованих фрагментів органів свиней і новонароджених поросят при різноманітних експериментально-змодельованих патологіях, таких як цукровий діабет, рани, дифузні ураження печінки [175, 176, 177, 178]. Застосування водно-сольових екстрактів кріоконсервованих фрагментів печінки і підшлункової залози, селезінки свиней і новонароджених поросят знижує рівень ПОЛ (перекисне окислення ліпідів) в плазмі крові та гомогенатах печінки, знижує рівень глюкози в крові, як натще, так і після глюкозного навантаження.

Клінічні дослідження ефективності застосування при абсцесах легенів екстракту кріоконсервованих фрагментів селезінки показали стимулюючу дію на репаративні процеси в ранах, скорішу нормалізацію показників імунної системи. [155].

Тканиноспецифічність пептидів - це здатність впливати на біохімічні, молекулярно-генетичні маркери спеціалізованих клітин-мішеней, які відрізняються в залежності від органу чи типу тканин [162]. При цьому, низькомолекулярні фракції пептидів, які входять до складу екстрактів мають постійну композицію, характерну для кожної тканини чи органу, ці пептиди опосередковано можуть впливати на процеси проліферації, диференціювання і апоптозу клітин відповідної тканини. [267]

Ряд авторів висувають гіпотезу пептидної біорегуляції, відповідно якої ендогенні пептиди приймають участь в підтримці структурного і функціонального гомеостазу клітинних популяцій, які їх продукують. [237, 268].

Вивчення механізмів тканиноспецифічної дії пептидів проводять шляхом дослідження їх структурно-функціонального стану. Наприклад, тимоген, синтетичний аналог пептиду тималіну, стимулює диференціювання Т-лімфоцитів, впливає на вміст Т- і В-лімфоцитів в крові за різних патологічних станів [268]. Пептидні екстракти приймають участь в регуляції багатьох фізіологічних реакцій в організмі та здатні специфічно діяти на процеси в тканинах, з яких він був виділений [237].

В останній час все більше уваги приділяється препаратам, отриманим з органів тварин [154, 268]. Це пов'язується з тим, що при цьому не виникають морально-етичні, релігійні та правові питання і проблеми, як при використанні алогенного матеріалу, який є набагато доступніший. Інтерес до вивчення екстрактів, отриманих з різних органів і тканин, проявляється завдяки їх тканино специфічній дії та низькій імуногенності. Для їх отримання широко використовується кислотний гідроліз тканини або гідроліз за допомогою протеолітичних ферментів. Використовуються також різноманітні методи очистки екстрактів від високомолекулярних з'єднань. Біологічна дія таких екстрактів дуже різноманітна. Екстракти тимусу та селезінки відновлюють імунологічну реактивність клітин, регулюють імунні реакції, стимулюють репаративні процеси. Пептидні препарати з тимуса, нирок та підшлункової залози регулюють процеси апоптозу тимоцитів. РП можуть як стимулювати, так і пригнічувати процеси апоптозу, в залежності від стану клітин. Отже дослідження біологічної дії екстрактів, а саме вплив на процеси апоптозу в тканинах за їх застосування є актуальною задачею.

Виходячи з наведених вище даних, можна зробити висновок, що препарати клітинної та тканинної терапії займають важливе місце серед біологічних лікарських засобів. Форми таких препаратів дуже різноманітні – від фрагментів і клітин органу до екстрактів, отриманих з тієї чи іншої тканини, біологічно активні сполуки природного походження, можуть позитивно впливати на метаболічні процеси, підвищувати адаптивні здібності організму та бути безпечними [156, 187, 197, 246].

Наведений в обзорі літератури комплекс ефектів ЄКФШП, а саме тканиноспецифічна стимуляція регенерації та зниження рівня ПОЛ в сироватці крові при експериментальних патологічних станах, дає змогу очкувати наявності стимулюючої дії на процеси регенерації біологічних тканин після кріодеструкції шкіри. Терапевтичні ефекти ЄКФШП пов'язують з регуляторною дією пептидів, які входять до їх складу. Здатність гальмувати розвиток запальних реакцій, стимулювати репаративні процеси є підґрунтям вивчення ЄКФШП як перспективного потенційного стимулятора органоспецифічної та органотипової регенерації після кріодеструкції шкіри.

### **1.5. Біологічна дія фулеренів**

Фулерен  $C_{60}$  – третя алотропна форма вуглецю, яка була відкрита в 1985 році Kroto H.W. та співавторами. Це молекула майже сферичної форми діаметром 0,72 нм, поверхня якої складається з 60 атомів вуглецю, поєднаних між собою одинарними і подвійними хімічними зв'язками [23, 79].

Це хімічно стабільна наноструктура, яка здатна взаємодіяти з біомолекулами та впливати на протікання біохімічних реакцій, безпосередньо зв'язуючись з клітинними білками та ферментами, також утилізуючи вільні радикали, та, за умов фото збудження, продукуючи активні форми кисню [23, 44].

Проте біологічні властивості і токсичність фулерену  $C_{60}$  залежать від, багатьох чинників: умов синтезу і способу його модифікації, концентрації наночасток у середовищі розчинника та розміру утворених з них кластерів, умов введення в організм, тривалості інкубації, типу клітин тощо [86, 238].

Завдяки нанорозмірам та гідрофобним властивостям фулерени здатні проникати крізь плазматичні мембрани та локалізуватись усередині клітин [23, 75, 92]. За допомогою просвічувальної електронної мікроскопії встановлено локалізацію похідних фулерену  $C_{60}$  у субклітинних компартментах моноцитарних макрофагів [89]. Показано поглинання наночасток фулерену  $C_{60}$  кератиноцитами HaCaT In vitro [51].

При культивуванні епідермальних кератиноцитів людини в амінокислотних розчинах фулерену, при концентрації 0,4 та 0,04 мг/мл знижували життєздатність клітин, та ініціювали запальну реакцію, *in vitro* спостерігалось підвищення активності ІЛ-6, ІЛ-8, ІЛ-1 $\beta$ . Концентрації нижче 0,04 мг/мл підтримували життєздатність клітин за та ініціювали меншу активність цитокінів. [100].

Є дані, що фулерени C<sub>60</sub> проявляють антиоксидантні властивості і зв'язують вільні радикали [44, 53]. В експериментах на моделях вільно радикального пошкодження печінки у щурів показана виражена дозозалежна гепатопротекторна дія фулерену [32, 44]. Водорозчинні похідні C<sub>60</sub>-фулеренів як потужні антиоксиданти можуть виступати перспективними засобами для попередження, профілактики і лікування ішемічної травми та корекції різних станів м'язової системи, в основі розвитку яких лежить деструктивна дія вільнорадикальних процесів [192].

Відомо, що фулерени та їх похідні проявляють протизапальну дію на моделі адювантного артриту [29], пригнічують розвиток алергічних реакцій [101, 80]. ВКРФ C<sub>60</sub> *in vivo* прояви протизапальні властивості на моделях експериментального холангіту та цирозу печінки у щурів [64, 65], Так, Ryan J.J. та співавт. продемонстрували протизапальний ефект полігидроксильованих фулеренів C<sub>60</sub> та N-етил-поліаміно вуглецевих нанотрубок на *in vivo* моделях системних анафілактичних та місцевих шкірних алергічних реакцій, які головним чином опосередковуються гістаміном, вазоактивними пептидами та іншими прозапальними медіаторами, що вивільняються з тучних клітин [101]. В дослідженні Umamoto E.Y. і співавт. були показані протизапальні ефекти сполук фулерену та вуглецевих нанотрубок через пригнічення реакцій, опосередкованих тучними клітинами [113].

Внутрішньоочеревинне введення фулерену в дозі 12.5 - 75 мг/кг продемонструвало дозозалежну протизапальну активність на моделі гострого



запалення у щурів, значно вищу, в порівнянні з введенням препарату «індометацин» в дозі 50 - 300 мг/кг [30].

В роботі Кобзар О.Л. та співавторів було продемонстровано інгібіторну активність ряду водорозчинних похідних фулерену на Протеїнтирозинфосфатази (РТРази) [59]. РТРази на рівні сигнальних процесів в клітинах впливають на їх зростання, диференціацію, міграцію та апоптоз, а порушення в регуляції активності РТРаз можуть призвести до аномалій сигналізації, яка може сприяти розвитку у людини діабету, онкологічних та аутоімунних захворювань [66]. Полігидроксильовані фулерени ефективно інгібують РТР - 1В та CD45, тоді як фулерен, функціоналізований карбоксильними групами є селективним інгібітором РТР - CD45, який експресується на поверхні усіх гемопоетичних клітин [59]. Вплив цих речовин на активність ферментів описується механізмом змішаного типу. Відомо, що РТР - 1В є важливим регулятором енергетичного балансу, чутливості до інсуліну та запасів жиру в організмі, може виступати промоутером або супресором онкологічних захворювань в залежності від виду клітин-мішеней та інших чинників [59, 66]. Експресія РТР - 1В є важливою визначальною латентності та типу пухлин на тлі дефіциту р53 завдяки його ролі в регуляції розвитку В-клітин. Генетична абляція РТР - 1В у мишей з відсутністю експресії р53 знижує рівень виживання та підвищує сприйнятливості до розвитку В-лімфом [66].

Наразі функціоналізовані фулерени C<sub>60</sub> активно вивчаються на предмет їх потенційного застосування у діагностиці та хіміотерапії пухлин. [4, 67, 93, 231]. Запропоновано використовувати комплекси фулеренів з металами (металофулерени) як контраст під час магнітно-резонансної томографії. Відомо, що вони є менш токсичними для організму і демонструють у 20 разів кращі фізико-хімічні характеристики порівняно з хелатами гадолінію, які нині застосовують для цієї мети [4]. Ця властивість металофулеренів реалізується завдяки зв'язуванню атома металу у вуглецевій «клітці» фулерену C<sub>60</sub> і так званого внутрішньофулеренового перенесення електронів

від металу до вуглецевої «клітки», що суттєво посилює специфічні фізичні властивості такого комплексу загалом.

За умов фотозбудження фулерени можуть продукувати активні форми кисню, проявляючи прооксидантні властивості, які наразі застосовуються фото динамічній терапії злоякісних пухлин. Головними механізмами цитотоксичної дії  $C_{60}$ -фулеренів є активізація ПОЛ, що призводить до хімічного ушкодження ДНК і некрозу [20].

Фулерени знайшли застосування в розробці нових лікарських форм, для підвищення адресності доставки ліків до клітин-мішеней. [238,231]. Так, застосування доксорубіцину в комплексі з наночастками фулеренів  $C_{60}$  дає змогу продовжити тривалість дії та збільшити біологічну доступність протипухлинного препарату, а також знизити побічні ефекти від хіміотерапії. Застосування фулерен  $C_{60}$ -доксорубіцинового комплексу у 2–3 рази посилювало антинеопластичну дію цього препарату *in vitro* щодо різних ліній злоякісних клітин порівняно з дією вільного доксорубіцину. Цитоморфологічними дослідженнями показано, що загибель злоякісних клітин-мішеней відбувалася шляхом апоптозу. Індукція апоптозу за дії цього наноконструксу супроводжувалась генерацією супероксидних радикалів, рівень яких досягав максимального значення через 3 години після введення [231]. Разом з тим, молекулярні механізми дії таких комплексів залишаються маловивченими.

Разом зі значними перспективами у використанні вуглецевих наноструктур у медицині, зокрема у ранній діагностиці та лікуванні захворювань [23], існують також певні проблеми і перестороги на цьому шляху. Відомості щодо токсичності та біологічної доступності фулеренів  $C_{60}$  наразі є суперечливими, ряд публікацій показує, що фулерени та їх похідні мають певну токсичність [79, 48]. Так, вдихання цих наночастинок викликає запальні процеси у легенях [9, 103]. Показник LD50 для не модифікованого фулерену через 7 днів за внутрішньовенного введення для мишей становив 0,7 г/кг, а для щурів — 2г/кг маси тіла тварини. [129]. Дані біологічних

випробувань водних дисперсій фулеренів  $C_{60}$  насторожують щодо можливого токсичного впливу на організм людини.

З іншого боку, наводяться докази, що немодифіковані фулерени  $C_{60}$  не є токсичними загалом, або не виявляють гострої токсичної дії у системах *in vitro* та *in vivo* за низьких (фізіологічних) концентрацій. [56, 32]. Наразі достовірно встановлено, що токсичність молекул  $C_{60}$  істотно залежить від модифікації їхньої поверхні, умов синтезу і обробки [75, 86, 96].

Саме тому звертають увагу дослідження, в яких показана відсутність токсичності водних колоїдних розчинів немодифікованих фулеренів  $C_{60}$  [79, 64, 65, 239]. Питання токсичності фулеренів, їх надходження і розповсюдження у внутрішньоклітинному просторі, накопичення в органах та виведення залишаються досі відкритими.

Проаналізувавши літературні данні, з огляду на довші строки загоєння ран після кріодеструкції шкіри, оптимізація підходів до лікування ран даної етіології є актуальним науковим завданням. З огляду на данні щодо репаративної тканиноспецифічної дії та антиоксидантних ефектів регуляторних пептидів, що входять до складу водно-сольових екстрактів органів тварин, важливим є вивчення ефектів застосування ЕКФШП на моделі процесів деструкції і репарації тканин після кріоабляції шкіри у безшерстих шурів.

З огляду на широкий спектр біологічних ефектів фулерену та його похідних, таких як: регуляція активності ряду цитокінів, блокування дегрануляції тканових макрофагів, зниження рівня ПОЛ та активізації антиоксидантної системи; актуальним є вивчення регуляторної дії ВКРФ  $C_{60}$  на запальний процес в тканинах після кріодеструкції шкіри. Особливу увагу слід приділити вивченню впливу ВКРФ  $C_{60}$  на процеси апоптоза і проліферації в тканинах, враховуючи здатність інгібування похідними фулерену ряду внутрішньоклітинних ферментів,

У зв'язку з контраверсіями в публікаціях щодо відсутності гострої та хронічної токсичності фулеренів на організм, вивчення біологічних ефектів від введення в черевну порожнину ВКРФ C<sub>60</sub> інтактним щурам є важливим завданням.

## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

#### 2.1 Об'єкт та дизайн дослідження

Дослідження проводили в Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України. Експерименти на тваринах проводили у відповідності з вітчизняними і міжнародними нормативно-правовими актами, зокрема: законом України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№ 3447-IV від 21.02.2006 р), «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», схвалених III Національним конгресом з біоетики (Київ, Україна, 2007), «Європейської конвенції з захисту хребетних тварин, що використовуються в експериментальних та інших наукових цілях» (Страсбург, Франція, 1986), «Біоетична експертиза доклінічних та інших наукових досліджень, що виконуються на тваринах» (методичні рекомендації, авт. О.Г. Резніков та інш., 2007). Протоколи досліджень були розглянуті і ухвалені Комітетом з біоетики ІПКіК НАН України.

Експерименти проводили в умовах віварію ІПКіК НАН України на 120 безшерстих щурах-самцях 6-місячного віку (блок 1 та блок 3) і 42 безпородних білих щурах-самцях 6-місячного віку (блок 2). Усі операції виконували з використанням анестезії препаратом «Telazol» («Zoetis Inc.», США) в дозі 50 мг/кг внутрішньом'язово.

Для отримання зразків крові тварину після наркотизації фіксували на спині, розтягуючи за кінцівки. Після стандартної обробки операційного поля проводили широкий розтин передньої черевної стінки (від лобкового з'єднання до мечоподібного відростку), який в середній треті доповнювали поперечним розтином до правої середньої аксиллярної лінії. Тонку кишку відводили уверх і назовні, тупо виділяли черевний відділ аорти. Після цього проводили пункцію аорти відразу над біфуркацією голкою 22G за допомогою одноразових трикомпонентних шприців («BD Micro-Fine Plus»,

США; «Алекс Фарм», Україна). Тварин виводили з експерименту шляхом дислокації шийних хребців (після наркотизації).

Сироватку крові отримували загальноприйнятим методом [262], використовуючи центрифужні пробірки («BD Vacutainer», США).

Робота складалась з трьох блоків експериментальних досліджень.

Перший блок «Розробка експериментальної моделі процесів деструкції та репарації після кріоабляції шкіри *in vivo*»

Тварини були розділені на дві групи по 10 безшерстих щурів. В експериментальній групі виконували кріодеструкцію шкіри на латеральній поверхні стегна. В інтактній - тварини, які не піддавалися ніяким впливам. Низькотемпературний вплив на шкіру здійснювали кріоінструментом - акумулятором холоду [204]. Час кріовпливу становив 120 с. Температуру визначали в точці контакту робочої поверхні аплікатора зі шкірою протягом процесу кріовпливу. Морфологічну картину в області кріодеструкції і біохімічні параметри сироватки крові (рівень дієнових кон'югатів, ТБК-активних продуктів (продуктів, що реагують з тіобарбітуровою кислотою), активність супероксиддисмутази, каталази, концентрацію церулоплазміну, С-реактивного білка) оцінювали на 7-му добу експерименту.

Другий блок «Вивчення біологічних ефектів введення в черевну порожнину ВКРФ  $C_{60}$  різних концентрацій за впливом на гематологічні і біохімічні показники крові щурів»

Дослідних тварин розподілили на 4 групи: інтакт ( $n=7$ ); контрольна група з введенням води для ін'єкцій ( $n=7$ ); дві експериментальні групи – тварини, яким вводили ВКРФ  $C_{60}$  в концентраціях 34,7 і 173 мкмоль/л відповідно ( $n=14$  у кожній). Всі розчини вводили внутрішньоочеревинно, одноразово. Доза введеного фулерену становила 1 мг/кг маси. На 1 і 5 добу експерименту отримували зразки крові і виводили тварин з експерименту. Визначали: абсолютний вміст лейкоцитів, абсолютний вміст еритроцитів, концентрацію гемоглобіну, гематокрит, абсолютний вміст тромбоцитів, середній об'єм еритроцита, середній вміст гемоглобіну в еритроциті,

середню концентрацію гемоглобіну в еритроцитарній масі, стандартне відхилення відносної ширини розподілу еритроцитів за об'ємом, коефіцієнт варіації відносної ширини розподілу еритроцитів за об'ємом та лейкоцитарну формулу. вміст загального білка, креатиніну, сечовини, активність аспартатамінотрансферази, аланінамінотрансферази і лужної фосфатази.

Третій блок «Дослідження впливу ЕКФШП та ВКРФ С<sub>60</sub> на процеси деструкції і репарації після кріодеструкції шкіри»

Тварин розподілили на 4 групи, в 3 з яких відтворювали розроблену нами в першому блоці експериментальну модель кріодеструкції шкіри. Інтактна група - тварини без будь-якого втручання (n=10). Щурам першої експериментальної групи (n=30) в черевну порожнину вводили ВКРФ С<sub>60</sub> щодня в разовій дозі 0,1 мг/кг маси тіла, починаючи з дня моделювання кріоушкоджень, протягом 5 днів. В другій експериментальній групі (n=30) тваринам вводили ЕКФШП в черевну порожнину один раз на добу, щоденно, протягом всього експерименту. Доза пептидів становила 0,5 мг/кг маси тварини. У контрольній групі (n=30) внутрішньоочеревинно вводили фізіологічний розчин. На 7, 14, 21 добу спостереження проводили планіметричне дослідження, вивчали макроскопічну картину ран, отримували зразки крові та виводили тварин з експерименту. Проводили забір матеріалу для комплексного гістологічного дослідження з морфометрією та імуногістохімічного дослідження шкіри з підлеглими м'якими тканинами. Індекс проліферації до апоптозу вираховували по співвідношенню абсолютної кількості Ki-67 s p53 -позитивних клітин. В сироватці крові визначали: рівень дієнових кон'югатів, ТБК-активних продуктів, активності супероксиддисмутази, каталази та концентрації церулоплазміну, С-реактивного білка, молекул середньої маси, нітратів та нітритів.

Експериментальним тваринам вводили готовий препарат ЕКФШП, який отримували у низькотемпературному банку ПКіК НАН України. ЕКФШП був виготовлений за методом, розробленим С.Є.Гальченко та

співавторами [180]. Кріопробірки з матеріалом відігрівали на водяній бані з температурою 37-40°C безпосередньо перед застосуванням.

Для введення експериментальним тваринам фулеренів  $C_{60}$  нами було використано готові ВКРФ  $C_{60}$ , виготовлені за методикою Ritter U. І співавторів [96], яка ґрунтується на переведенні молекул фулеренів  $C_{60}$  (99%) з толуолу у воду з подальшим обробленням ультразвуком.

В якості додаткових розчинників для ВКРФ  $C_{60}$  використовували фізіологічний розчин (Юрія Фарм, Україна) та воду для ін'єкцій (Артеріум, Україна).

## **2.2 Методи дослідження**

### **2.2.1 Спектрофотометричний метод**

Спектри поглинання розчинів ВКРФ  $C_{60}$  досліджували на спектрофотометрі «Lambda 35» ( «Perkin Elmer», США) при їх опроміненні світлом в діапазоні сканування 200-900 нм при 20°C. Розчин вносили в стандартну кювету з кварцу з довжиною світлового шляху 1 см. Калібрування спектрів проводили щодо відповідного додаткового розчинника. Для кожного розчину сканування проводили по 3 рази.

### **2.2.2 Кріохірургічний метод**

Кріодеструкцію виконували інструментом - акумулятором холоду [204], який являв собою мідний циліндр масою 590 г, з діаметром кріоаплікатора 10 мм, до верхньої частини циліндра прикріплена рукоять у вигляді скоби. На рис.2.1 зображена схема пристрою. Перед використанням кріоінструмент поміщали в ємність з рідким азотом і витримували в ньому до припинення активного кипіння. Після цього за допомогою рукоятки виймали і притискали до шкіри нижньою частиною циліндру. Рис.2.2



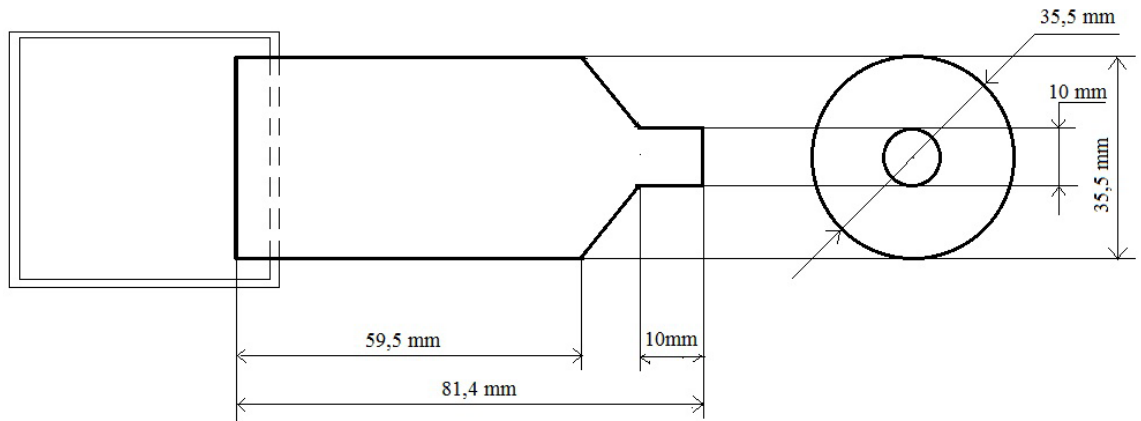


Рис.2.1. Пристрій для моделювання кріодеструкції шкіри.



Рис.2.2. Виконання кріодеструкції шкіри.

### 2.2.3 Метод контактної термометрії.

В якості температурного датчика використовували мідь-константанову термопару, підключену до модулю аналогового вводу «ОВЕН МВ-110», з якого дані передавалися на перетворювач інтерфейсів «ОВЕН АС4» і далі - на персональний комп'ютер. Дані записували і аналізували за допомогою програм «Owen Process Manager 1.2» і «Owen Report Viewer 1.2». Все обладнання та програмне забезпечення вироблено компанією «Овен» (Росія).

Температуру вимірювали в одній точці, датчик розміщували на поверхні шкіри під кріоаплікатором, приблизно в центрі зони його контакту зі шкірою. Таким чином фактично визначали температуру робочої поверхні аплікатора в процесі кріовпливу.

#### **2.2.4. Планіметричний метод**

Площу ран визначали по цифрових зображеннях за допомогою пакета програм Bio Vision Software (USA) .

#### **2.2.5. Гістологічні методи дослідження**

Для морфологічного дослідження використовували фрагменти шкіри з підлеглими гіподермою і м'язовими тканинами.

Отриманий експериментальний матеріал фіксували в 10% розчині формаліну. Ущільнення тканин, фіксованих у формаліні, досягалося проведенням через спирти зростаючої концентрації, рідина Никифорова (96% спирт і діетиловий ефір у співвідношенні 1: 1), хлороформ і заливкою в парафін. З приготованих блоків для подальшого фарбування готувалися серійні зрізи товщиною  $4-5 \times 10^{-6}$  м. Використовували такі гістологічні та гістохімічні методи забарвлення, як гематоксилін і еозин, пікрофуксином по ван Гізону, по Маллорі. Все вище зазначені гістологічні та гістохімічні методики виконувалися за схемами, викладеним в інструкціях по гістологічній і гістохімічній техніці [235].

Мікропрепарати вивчали на мікроскопі «Olympus BX-41» з подальшими морфометричними дослідженнями за допомогою програми «Olympus DP-soft version 3.1» [138], в ході чого визначалися товщина епітеліального пласта (в групі норми - у довільному місці, в контрольній та дослідних групах - з областей, що межували з раневим дефектом), товщина зони первинного некрозу, товщина демаркаційного лейкоцитарного валу, товщина зони вторинного некрозу, товщина шару грануляційної тканини, товщина шару сполучної тканини.

### **2.2.6 Імуногістохімічне дослідження**

Матеріалом для імуногістохімічного дослідження стала шкіра з підлягаючими м'якими тканинами щурів.

Дане імуногістохімічне дослідження було проведено відповідно зі стандартизованими протоколами з використанням кролячих моноклональних антитіл до p53 (клон SP5) і Ki-67 (клон SP6). Білок Ki-67, як відомо, є маркером проліферації, який виявляється в ядрах клітин, які готуються до поділу. p53 є білком, що активує репарацію пошкодженої ДНК ядра клітини, а також розвиток апоптозу в разі високого ступеня цих пошкоджень.[185].

Вище зазначені маркери широко використовуються в морфології, дерматологічній і онкологічній практиці для інтерпретації механізмів загоєння ран, гіперпластичних процесів, акантоліза, неоплазій, дізрегенераційного синдрому та ін. [148]

Моноклональні кролячі антитіла були виготовлені фірмою «Thermo Fisher Scientific» (США). Візуалізація первинних антитіл була проведена за допомогою системи детекції «UltraVision Quanto HRP» («Thermo Fisher Scientific», США). Мікропрепарати дофарбовували гематоксиліном та еозином і досліджували на мікроскопі «Olympus BX-41» (Японія). Коричневе забарвлення ядер клітин характеризувало позитивну експресію маркерів. Імуногістохімічна реакція оцінювалася в епідермісі, дермі, гіподермі, м'язовому шарі, в грануляційній або сполучній тканинах, що заповнює ранову порожнину. В полі зору мікроскопа  $\times 400$  проводили підрахунок абсолютної кількості клітин, які експресували вище зазначені маркери. Розраховували індекс співвідношення проліферації до апоптозу, для чого ділили середні значення абсолютної кількості Ki-67-позитивних клітин на абсолютну кількість p53-позитивних клітин.

### **2.2.7 Дослідження гематологічних показників**

Зразки крові для досліджень отримували з черевного відділу аорти. Для цього після наркотизації тварину фіксували на спині, розтягуючи за кінцівки. Після стандартної обробки операційного поля проводили широкий розтин

передньої черевної стінки (від лобкового з'єднання до мечоподібного відростку), який в середній треті доповнювали поперечним розтином до правої середньої аксиллярної лінії. Тонку кишку відводили уверх і назовні, тупо виділяли черевний відділ аорти. Після цього проводили пункцію аорти відразу над біфуркацією голкою 22G надітою на сухий трьохкомпонентний шприц 5 мл «Алекс Фарм» (Україна).

Визначення гематологічних показників проводили на автоматичному гематологічному аналізаторі «Mindray BC-3600» (Mindray, КНР). Визначали: абсолютний вміст лейкоцитів, абсолютний вміст еритроцитів, концентрацію гемоглобіну, гематокрит, абсолютний вміст тромбоцитів, середній об'єм еритроцита, середній вміст гемоглобіну в еритроциті, середню концентрацію гемоглобіну в еритроцитарній масі, стандартне відхилення відносної ширини розподілу еритроцитів за об'ємом, коефіцієнт варіації відносної ширини розподілу еритроцитів за об'ємом, а також лейкоцитарну формулу.

#### **2.2.8. Проведення біохімічних досліджень**

Зразки крові для біохімічних досліджень ь отримували з черевного відділу аорти після наркотизації, за описаною вище методикою. Для біохімічних досліджень кров поміщали в центрифужні пробірки «BD Vacutainer»(США), витримували при температурі 25<sup>0</sup>С протягом 30 хв, потім центрифугували протягом 15 хв зі швидкістю 3000 об/хв.

**Визначення вмісту загального білка, креатиніну, сечовини, та активності АСТ і АЛТ.**

На напівавтоматичному аналізаторі «RT-9200» (Rayto, КНР) з використанням відповідних наборів реагентів "Bio Systems" (Іспанія) в сироватці крові за методиками відповідно до наборів визначали концентрацію загального білка, креатиніну, сечовини, активність аспаратамінотрансферази і аланінамінотрансферази

### **Визначення рівня дієнових кон'югатів**

Визначення рівня ДК (дієнових кон'югатів) в сироватці крові проводили за методом Стальної І.Д. у модифікації Скорнякова В.І. та співавт. [257] на спектрофотометрі «Lambda 35» («Perkin Elmer», США). В ході визначення до 0,5 мл сироватки крові додавали 4,5 мл суміші гептана з ізопропіловим спиртом (1: 1). Пробірки струшували протягом 10 хвилин на шутелі і додавали по 0,5 мл дистильованої води. Після розшарування проби з верхньої (гептанової) фракції відбирали в окремі пробірки по 0,5 мл і додавали 2,5 мл 96% етилового спирту. Оптичну щільність проби визначали при довжині хвилі 233 нм (проти етилового спирту). Зміст ДК розраховували за формулою:

$$A = E \times K \times OX,$$

де E - оптична щільність проби;

K - коефіцієнт молярної екстинкції  $2,2 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ ;

OX - розведення проби.

Вміст ДК в пробі виражали у мікромольх на мілілітр сироватки крові (мкмоль/мл) або мікромольх на грам тканини (мкмоль/г).

### **Визначення рівня ТБК-активних продуктів**

Це визначення проводили за методом Uchiyama M. та Michara M. у модифікації Волчегорського І.А. і співавт. [262] на спектрофотометрі «Lambda 35» («Perkin Elmer», США) по тесту з тіобарбітуровою кислотою. У ході реакції 0,5 мл сироватки крові додавали до 3 мл 0,8% розчину ТБК в 3% ортофосфорної кислоти. Проби витримували 45 хв. на киплячій водяній бані, охолоджували і доливали по 5 мл нормального бутилового спирту. Через 10-12 годин визначали оптичну щільність при довжинах хвиль 535 нм і 580 нм. Вміст ТБК-активних продуктів розраховували за формулою:

$$A = (E_{535} - E_{580}) \times K \times OX,$$

де  $E_{535}$  и  $E_{580}$  - оптична щільність проби;

K - коефіцієнт молярної екстинкції  $1,88 \times 10^{-5} \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ ;

OX - розведення проби.

Вміст ТБК-активних продуктів в пробі виражали у наномолях на мілілітр сироватки крові (нмоль/мл) або наномолях на грам тканини (нмоль/г).

#### **Визначення активності каталази**

Активність КАТ (каталази) визначали на спектрофотометрі «Lambda 35» ( «Perkin Elmer», США) методом, що заснован на здатності перекису водню ( $H_2O_2$ ) утворювати з солями молібдену стійкий забарвлений комплекс [147]. До 0,02 мл сироватки крові або гомогенату тканини додавали 2 мл  $H_2O_2$ . Через 10 хв. додавали 1 мл 4% розчину молібдату амонію. Паралельно до кожної дослідної проби ставили холосту, в яку додавали всі реактиви, а 0,02 мл досліджуваної рідини додавали після молібдату амонію. Оптичну щільність досліджуваних проб визначали при довжині хвилі 410 нм. Активність каталази розраховували за формулою:

$$A = (E_x - E_o) \times 4,44,$$

де  $E_x$  і  $E_o$  - оптична щільність холостої та дослідної проб відповідно;  
4,44 - коефіцієнт перерахунку.

Активність ферменту виражали в умовних одиницях на мілілітр сироватки (у.о./мл) або на грам тканини (у.о./г).

#### **Визначення активності супероксиддисмутази**

Активність СОД (супероксиддисмутази) визначали методом окислення кверцетину у модифікації Костюка В.А. і співавт. [208] на спектрофотометрі «Lambda 35» («Perkin Elmer», США). До 0,05 мл сироватки крові додавали 0,5 мл 0,015 М фосфатного буфера (рН 7,8); 0,5 мл розчину, що містить 0,08 мМ етилендіамінтетраоцтова кислота і 0,8 мМ тетраметилетилендіамин; 3,5 мл води і 0,1 мл 0,14 мМ розчину кверцетину в диметилсульфоксиді. До кожної з дослідних проб ставили контрольну, в яку вносили всі реактиви крім досліджуваної рідини. Проби інкубували 20 хв. при  $t^{\circ}=37^{\circ}C$ . Оптичну щільність проб при довжині хвилі 406 нм відразу і через 20 хв. інкубації. Активність СОД розраховували за формулою:

$$A = \frac{{}_dD_k - {}_dD_d}{{}_dD_k} \times 8,$$

де  ${}_dD_k$  - різниця між показниками контрольної проби;

${}_dD_d$  - різниця між показниками дослідної проби;

8 - коефіцієнт перерахунку.

Активність ферменту виражали в умовних одиницях на мілілітр сироватки (у.о./мл).

### **Визначення вмісту церулоплазміну**

Вміст церулоплазміну в сироватці крові визначали методом Равіна на спектрофотометрі «Lambda 35» («Perkin Elmer», США) з використанням комерційної тест-системи виробництва фірми "Реагент" (Україна) згідно з інструкцією, що додається до набору на спектрофотометрі «Lambda 35» («Perkin Elmer», США). До 0,1 мл сироватки додавали 8 мл ацетатного буфера (рН 5,5) і 1 мл розчину п-фенілендіамін в концентрації 5 г/л. Проби перемішували та інкубували протягом 1 години при  $t^{\circ}=37^{\circ}\text{C}$ . Потім до кожної пробі додавали 2 мл 3% розчину фториду натрію, перемішували, видержували 30 хв. у холодильнику і вимірювали оптичну щільність при довжині хвилі 530 нм проти холостої проби. Рівень церулоплазміну розраховували за формулою:

$$C_{\text{церулоплазмину}} = 875 \times E_{\text{дослід}},$$

де  $C_{\text{церулоплазмину}}$  – рівень церулоплазміну у дослідній пробі;

$E_{\text{дослід}}$  – оптична щільність дослідної проби;

875 – коефіцієнт перерахунку.

Рівень церулоплазміну виражали у міліграмах на літр сироватки (мг/л).

### **Визначення рівня С-реактивного білка в сироватці крові**

Визначення проводили на імуноферментному аналізаторі «Labline-90» (Австрія) за допомогою комерційної тест-системи фірми "Вектор БЕСТ" (Росія) відповідно до інструкції, що додається до набору. Зразки сироваток крові перед проведенням аналізу розводили у 100 разів розчином для

розведення сироваток (поставляється в наборі) Потім у кожен лунку додавали по 100 мкл кон'югату. Проби інкубували 45 хв. при 37°C на шейкері (струшувачі). Потім рідину з лунок видаляли і 5 разів промивали лунки спеціальним промивним буфером. Після цього в кожен лунку додавали по 100 мкл субстратного розчину ТМБ, інкубували 25 хв. у темряві при кімнатній температурі, і потім зупиняли реакцію додаванням у кожен лунку по 100 мкл стоп-реагенту. Через 10 хв. визначали оптичну щільність всіх проб при довжині хвилі 450 нм. Кількість СРБ визначали по калібрувальній кривій, яку будували паралельно з визначенням у пробах, використовуючи стандарти, що знаходилися у наборі. Кількість СРБ виражали у міліграмах на літр сироватки крові (мг/л).

#### **Визначення вмісту молекул середньої маси**

Вміст МСМв сироватці крові щурів визначали методом Badd A. і Seribner B. [174] на спектрофотометрі «Lambda 35» («Perkin Elmer», США) з використанням трихлороцтової кислоти. До 1 мл сироватки додавали 0,5 мл 10% розчину трихлороцтової кислоти. Проби ретельно перемішували та інкубували 5 хв. при кімнатній температурі. Потім пробірки центрифугували 15 хв. при 3 тис. об/хв. До 0,5 мл центрифугата додавали 4,5 мл дистильованої води і вимірювали оптичну щільність при довжині хвилі 254 нм проти води. Рівень МСМ виражали в оптичних одиницях (о.о.), які кількісно рівні показнику екстинції.

#### **Визначення вмісту сумарних метаболітів оксиду азоту**

Ці визначення проводили за методом Green L.C. зі співавт. у модифікації Метельської В.А. і Гуманової Н.Г. [224]. Для проведення визначення сироватку крові розводили 96% етиловим спиртом у співвідношенні 1:2. Отриману суміш струшували і центрифугували 15 хв. при 2000 об/хв. Навіску тканини 50 мг гомогенізували в 1 мл 96% етилового спирту, потім центрифугували 15 хв. при 2000 об/хв. В обох випадках до 0,5 мл надосадової рідини додавали 0,5 мл 0,025% розчину реактиву Грісса в 15% оцтової кислоти і 0,5 мл 0,8% розчину хлористого



ванадію. Проби інкубували 30 хв. при 37°C і потім вимірювали оптичну щільність при довжині хвилі 540 нм. Кількість сумарних метаболітів розраховували у мкмоль по калібрувальному графіку, який будували на стандартних розчинах  $\text{NaNO}_2$  у концентраціях від 5 до 350 мкмоль/мл. Зміст сумарних метаболітів оксиду азоту виражали у мікромолях на мілілітр сироватки крові (мкмоль/мл) або у мікромолях на грам тканини (мкмоль/г).

### **Визначення вмісту нітритів та нітратів**

Визначення проводили за методом Звягіної Т.В. у модифікації Метельської В.А. і Гуманової Н.Г. [224]. Сироватку крові розводили 96% етиловим спиртом у співвідношенні 1:2. Отриману суміш струшували і центрифугували 15 хв. при 2000 об/хв. До 1 мл надосадової рідини додавали 1 мл 0,025% розчину реактиву Грісса в 15% оцтової кислоти. Проби інкубували 30 хв. при 37°C і потім фотометрували при довжині хвилі 540 нм. Кількість нітритів розраховували у мкмоль по калібрувальному графіку, який будували на стандартних розчинах  $\text{NaNO}_2$  в концентраціях від 5 до 350 мкмоль/мл. Вміст нітритів виражали у мікромолях на мілілітр сироватки крові (мкмоль/мл).

Вміст нітратів розраховували як різницю між показниками сумарних метаболітів оксиду азоту та нітритів. Вміст нітратів виражали у мікромолях на мілілітр сироватки крові (мкмоль/мл) [193].

### **2.2.9 Статистична обробка результатів**

Статистичну обробку результатів проводили використовуючи критерій Краскела-Уолліса за допомогою пакета програм STATISTICA 6.0 (StatSoft, USA). Обробку отриманих даних проводили за допомогою програми OriginPro 8,5 («OriginLab Corporation», США).

### РОЗДІЛ 3

## РОЗРОБКА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ МОДЕЛІ ПРОЦЕСІВ ДЕСТРУКЦІЇ ТА РЕПАРАЦІЇ ПІСЛЯ КРІОАБЛЯЦІЇ ШКІРИ У БЕЗШЕРСТИХ ЩУРІВ

### 3.1. Температурні параметри кріовпливу на шкіру.

Кріодеструкція (кріоабляція) має давню історію і на сьогоднішній день є загальновизнаним методом хірургічного лікування. Розробка нових і удосконалення існуючих підходів до використання кріодеструкції для лікування захворювань шкіри неможливі без проведення експериментів *in vivo*, що передбачає створення експериментальних моделей.

Кріоабляція спричиняє пошкодження і загибель клітин та некроз тканин як прямими механізмами впливу низьких температур на клітини, так і непрямими механізмами, що спричиняють зміни клітинного мікросередовища та погіршують життєздатність тканин. [36, 272]

На ефективність кріоабляції можуть впливати чотири фактори: швидкість охолодження, цільова температура, час при цільовій температурі та швидкість відтавання. [36, 83]

Для створення моделей процесів деструкції та репарації при кріодеструкції шкіри необхідно дотримуватись температурного діапазону в зоні кріовпливу не вище за поріг кріостійкості тканин, так, при лікуванні доброякісних утворень необхідно досягти в зоні деструкції температури від -20 до -30 ° C, тоді як при лікуванні злоякісних пухлин – щонайменше від -40 до -50 ° C. [42]

З практичної точки зору найзручніше користуватися інструментами, конструкція яких забезпечує підтримку заданої температури кріоаплікатора в процесі роботи (за рахунок безперервного охолодження його робочої поверхні), що дозволяє підтримувати стабільний режим кріовпливу. Такими інструментами є високотехнологічні пристрої – кріохірургічні системи, як

правило, мають вмонтовані термодатчики для контролю робочої температури кріоаплікатора і електронагрівач для екстреного відігрівання [16, 126]. Використання таких кріохірургічних систем в експериментальних роботах стримується їх високою вартістю, що особливо актуально при проведенні досліджень з невеликим бюджетом.

Конструкція інструментів, в яких не передбачена підтримка температури аплікатора в процесі кріовпливу на заданому рівні набагато простіша, що сприятливо позначається на їх вартості і доступності для дослідників. В зв'язку з цим заслуговують на увагу кріохірургічні інструменти – акумулятори холоду. Холодопродуктивність такого типу інструментів визначається об'ємом і фізико-хімічними властивостями їх робочого тіла [143]. При цьому відведення тепла від зони кріовпливу відбувається за рахунок підвищення температури робочого тіла-холодоносія. Охолодження робочого тіла до нормативної температури відбувається безпосередньо перед застосуванням кріоінструментів. Основний недолік кріоінструментів - акумуляторів холоду полягає в тому, що робоча поверхня аплікатора в процесі роботи може швидко нагріватися, що позначається на температурному режимі впливу.

Вирішальне значення в забезпеченні результативності кріодеструкції патологічних утворень шкіри мають швидкість, тривалість і кінцева температура охолодження [5, 136]. Якщо метою дослідника є моделювання холодних ран, то характер температурної кривої під кріоаплікатором може не мати критичне значення. Тоді головним для вирішення поставленого завдання буде розробити стандартну операційну процедуру забезпечує інтенсивність охолодження заданої площі шкіри, достатню для виникнення некрозу тканин і появи рани зі стандартними характеристиками. При цьому параметри охолодження можна підібрати дослідним шляхом. Такий шлях виглядає найбільш простим, однак не дозволяє розробити експериментальну модель, яка в достатній мірі відтворює процеси, що виникають після кріодеструкції патологічних утворень шкіри в клінічній практиці.

Таким чином, для створення експериментальних моделей, адекватних для вивчення процесів, що виникають після кріохірургічного лікування, необхідний підбір кріоінструментів - акумуляторів холоду з холодопродуктивністю, достатньою для підтримки протягом необхідного інтервалу часу температури, яка буде нижче значень діапазону кріостійкості патологічних утворень шкіри *in vivo*.

Типова крива, отримана нами при вимірюванні температури на поверхні шкірі безпосередньо під робочою поверхнею кріоінструмента - акумулятора холоду, який було обрано для кріодеструкції, в процесі кріовпливу представлена на рис. 3.1.

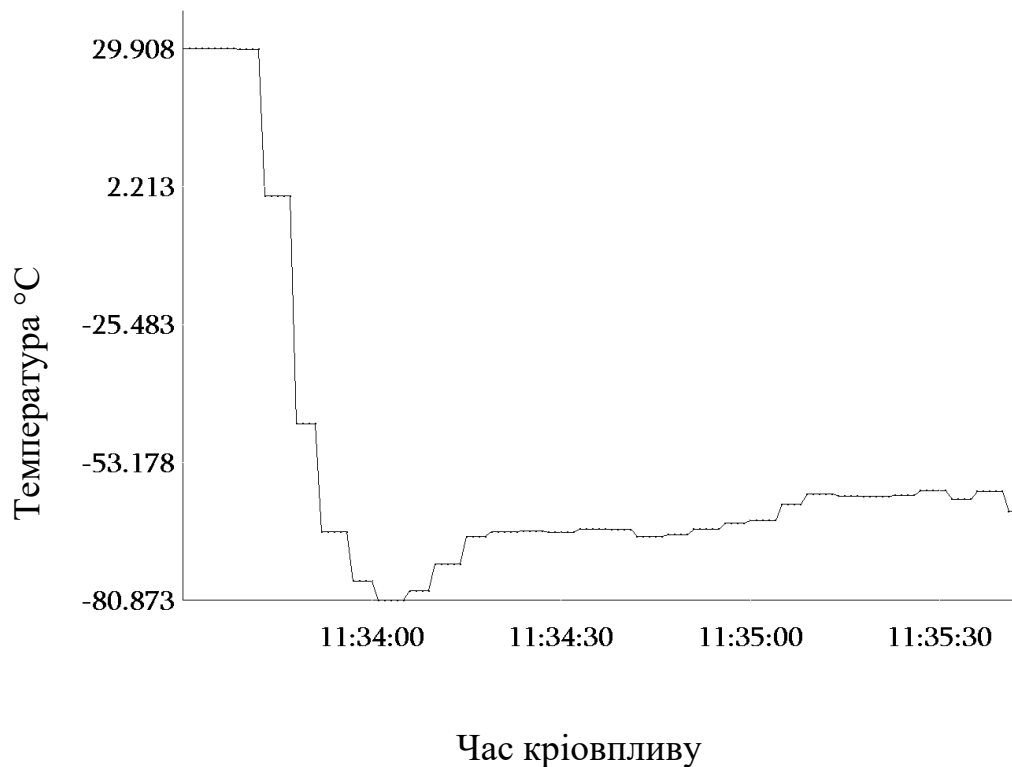


Рис 3.1. Типова температурна крива при кріодеструкції шкіри

У перші секунди кріовпливу відбувалося різке зниження температури. Її мінімальне значення дорівнювало  $-75,5 \pm 7,9^{\circ}\text{C}$ . Надалі відзначалося

поступове підвищення температури і через 120 с впливу вона дорівнювала -  $59,1 \pm 6,5^{\circ}\text{C}$ .

При виконанні кріохірургічних операцій вирішальне значення має підтримання температури, достатньої для руйнування клітин патологічних утворень. На момент припинення кріовпливу температура підвищувалася в 1,3 рази (на  $16,4^{\circ}\text{C}$ ) в порівнянні з мінімальною, але не перевищувала порогу  $-50^{\circ}\text{C}$ , досягнення якого вважається необхідним для загибелі більшості клітин, включаючи пухлинні [10, 41, 42].

Підвищення температури пов'язано з поступовим нагріванням аплікатора внаслідок його контакту з навколишнім повітрям і шкірою. Контакт зі шкірою, мабуть, забезпечує найбільший теплообмін, що обумовлено постійним припливом тепла до охолоджуваної зони. Для організму робоча поверхня кріоінструментів є точковим джерелом холоду. Отже в процесі кріовпливу відбуваються досить складні процеси теплообміну, в результаті яких відбуваються зміни температурних полів (сукупність значень температури в даний момент часу для всіх точок досліджуваного простору) в зоні кріодеструкції.

Тепловий опір тканин, обумовлений активацією метаболічних процесів, швидко компенсує зниження температури перифокально від області впливу, стабільність кровотоку при дії низької температури вказує на стабільність метаболічних процесів, що необхідно враховувати при розрахунках теплових взаємин кріоінструментів і тканини [276].

Характер температурної кривої свідчить, що висока швидкість охолодження в перші секунди забезпечує блокаду мікроциркуляторного русла, внаслідок чого приплив тепла до області кріовпливу різко знижується. Швидке замерзання певного обсягу тканин призводить до формування своєрідного «акумулятору холоду» який, мабуть, вносить свій внесок у стабільність температурного режиму кріовпливу.

Виходячи з отриманих результатів видно, що холодопродуктивність використаного в роботі інструменту достатня для підтримки температури

нижче порога кріостійкості шкіри протягом усього часу кріовпливу. Беручи до уваги швидкість охолодження, час експозиції та температурний діапазон, можна вважати, що використаний режим впливу може бути застосований для кріодеструкції більшості новоутворень шкіри, а запропонована експериментальна модель наближена до реальної клінічної ситуації кріохірургічного лікування.

Для вивчення структурних змін в м'яких тканинах, а також для з'ясування характеру системної відповіді організму тварин на кріодеструкцію шкіри на 7 добу після кріовпливу, було проведено гістологічне дослідження тканин і визначення біохімічних показників в сироватці крові.

### **3.2. Морфологічна характеристика шкіри в нормі та після кріодеструкції**

В ході морфологічного дослідження було виявлено, що шкіра з області стегна щурів контрольної групи (інтактні тварини) мала типову пошарову будову (рис. 3.2).

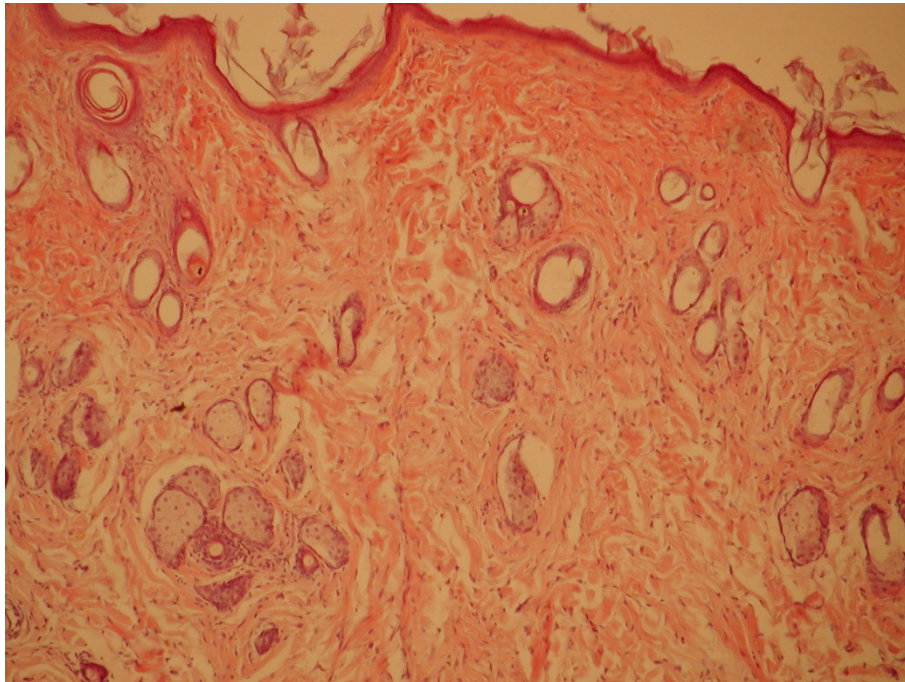


Рис. 3.2. Типова пошарова будова шкіри (епідерміс і дерма), контрольна група. Забарвлення гематоксиліном і еозином. 3б.  $\times 100$ .

Епідерміс мав рівномірну товщину і був представлений базальним шаром дрібних епітеліоцитів, які в деяких ділянках черепицеподібно накладалися один на одного, двома-трьома рядами шипуватих епітеліоцитів, зернистими клітинами і розташованими над ними роговими епітеліоцитами.

Між епідермісом і дермою розташовувалася базальна мембрана. Дерма була представлена двома шарами - сосочковим і сітчастим, які не мали між собою чіткої межі. Сосочковий шар дерми виглядав згладженим, сосочки в ньому розташовувалися рідко. Сосочковий і сітчастий шари дерми були представлені місцями пухкою, місцями щільною неоформленою сполучної тканиною. Волокна сполучної тканини мали різне спрямування: частина волокон лежала паралельно поверхні шкіри, частина - під кутом до неї. У дермі між сполучнотканинними волокнами визначалися судини мікроциркуляторного русла, нервові волокна, шкірні залози і коріння волосся. Клітинні елементи дерми були представлені головним чином нечисленними клітинами фібробластичного ряду і макрофагами.

Дерма без чіткої межі переходила в підшкірну жирову клітковину (гіподерму), представлену жировими клітинами - адипоцитами. Жирові клітини мали округлу або овальну форму, формували часточки різних розмірів. Між жировими клітинами у всіх напрямках виявлялися тонкі волокна пухкої сполучної тканини, яка є продовженням сполучної тканини, розташованої в дермі. В стромі жирової тканини визначалися судини мікроциркуляторного русла і нервові волокна без ознак патології.

Глибше гіподерми відзначалися волокна поперечно-м'язової тканини, цитоплазма яких рівномірно фарбувалася еозином. Між м'язовими волокнами розташовувалися тонкі волокна сполучної тканини, судини мікроциркуляторного русла і нервові волокна.

У всіх тварин після кріодеструкції (експериментальна група), в шкірі визначався великий, як за глибиною, так і за протяжністю рановий дефект.

Механізм пошкодження тканин при кріодеструкції *in vivo* дуже складний, оскільки низькі температури надають глобальний вплив на стан

тканин. Описано як пряме пошкодження тканин, викликане утворенням кристалів льоду, так і вторинне пошкодження клітин через порушення мікроциркуляції [2].

Уся поверхня ранового дефекту була представлена некротизованими фрагментами епідермісу, дерми і гіподерми, які були складовими зони первинного некрозу. В даний час вважають, що виникнення зони первинного некрозу пов'язано з безпосередньою деструкцією клітин під впливом низької температури [105]. До сих пір не існує чіткої концепції про механізм первинного пошкодження біологічних тканин при кріодеструкції і виникненні зони первинного некрозу. В даний час багато кріохірургів традиційно дотримуються теорії Р. Mazur про двофазний механізм кріодеструкції, згідно з якою деструкція тканин обумовлена внутрішньо- і позаклітинною кристалізацією води з подальшою її рекристалізацією, за рахунок чого пошкоджуються клітинні мембрани і виникає спочатку деструкція, а в подальшому некроз клітини [105]. Однак, оскільки зазначена теорія була запропонована для заморожування клітинних суспензій, то вона не враховує характерних особливостей біологічної тканини, як складної системи клітин і позаклітинного матриксу з унікальними теплофізичними характеристиками, обумовленими мікроциркуляцією і метаболічними процесами. Що підтверджують результати вимірювання температурі безпосередньо під робочою поверхнею аплікатора в процесі кріовпливу на шкіру, які приведено вище.

В області країв рани було виявлено потовщення багатошарового плоского епітелію, що можна розглядати як прояв репаративних процесів, що реалізуються через крайову епітелізацію, покликану зменшити площу рани (рис. 3.3).



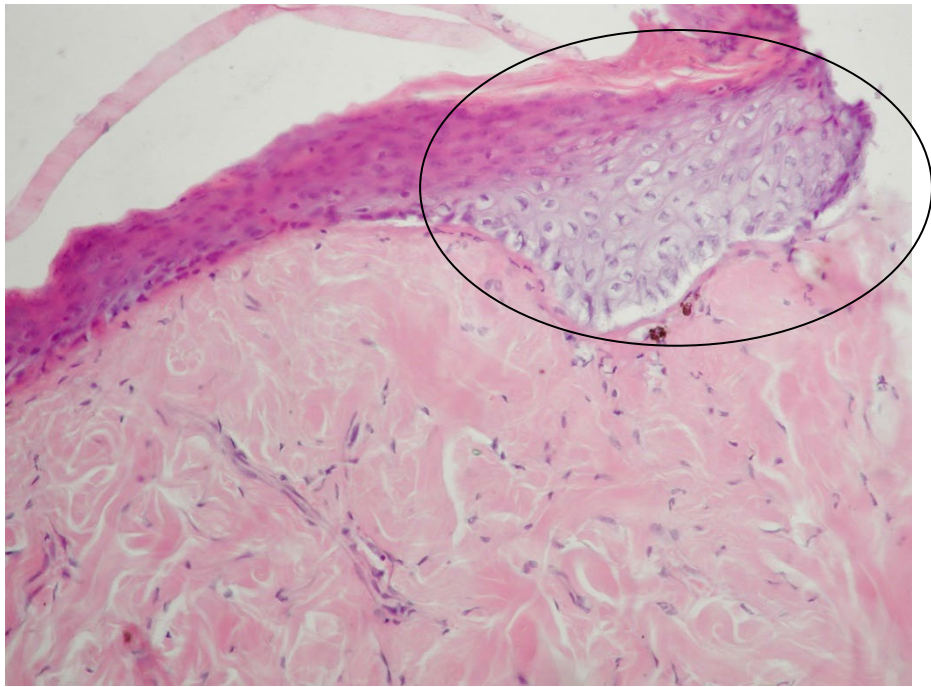


Рис. 3.3. Потовщення епідермісу в області країв рани, експериментальна група. Збарвлення гематоксиліном і еозином. Зб.  $\times 200$

В некротичних масах визначалося велика кількість загиблих лейкоцитів (рис. 3.4).

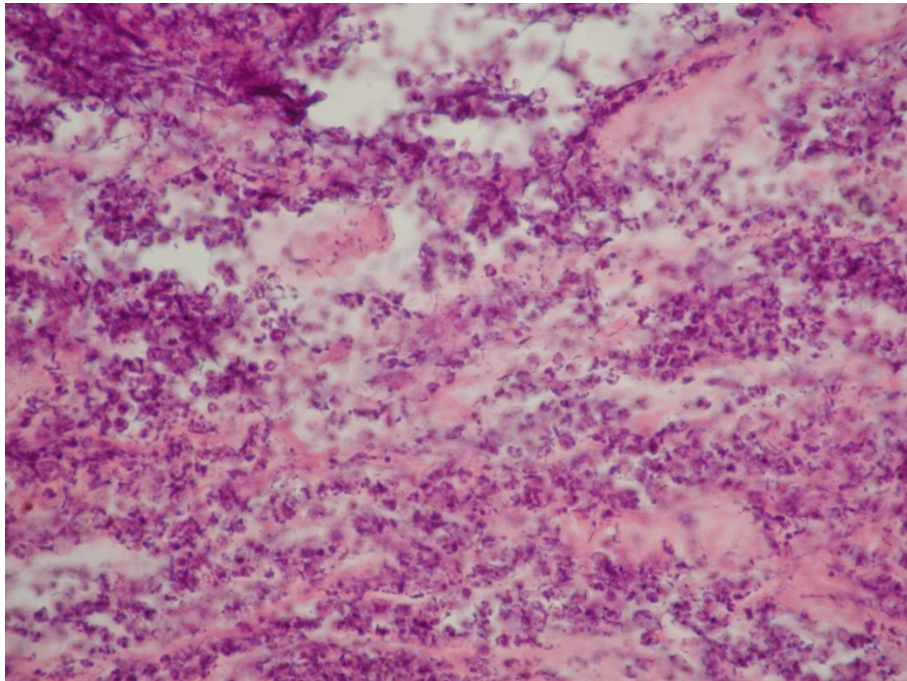


Рис. 3.4. Велика кількість загиблих лейкоцитів серед некротичних мас, експериментальна група. Збарвлення гематоксиліном і еозином. Зб.  $\times 200$

В експериментальній рані після кріодеструкції шкіри нейтрофільні лейкоцити, інфільтруючи тканини навколо зони первинного некрозу, формували запальний лейкоцитарний вал, або зону демаркації (рис. 3.5). Лейкоцити, як відомо, з'являються в рані вже через кілька хвилин після пошкодження, активують систему комплементу, взаємодіють з калікреїн-кініноювою системою, системами згортання і фібринолізу, похідними арахідонової кислоти. В області пошкодження під впливом протеолітичних ферментів нейтрофілів відбувається частковий лізис згортка крові, бактеріальної флори, сторонніх тіл, тканинного детриту [76].

За демаркаційним лейкоцитарним валом була виявлена зона вторинного некрозу (рис. 3.5), представлена некротично зміненими фрагментами дерми і гіподерми. Вважається, що слідом за первинним низькотемпературним пошкодженням в тканинах, що оточують рану, виникають реакції запалення, відбувається вивільнення з клітин ферментів, в тому числі протеолітичних, вільних кисневих радикалів, активація процесів перекисного окислення ліпідів і ослаблення антиоксидантного захисту, накопичення в тканинах активних форм кисню, поява в зоні пошкодження недоокислених продуктів обміну і розвиток ацидозу. Надмірне утворення агресивних продуктів є однією з причин виникнення і поширення зони вторинного некрозу [114]. Крім того, появу зони вторинного некрозу пов'язують з гемодинамічними порушеннями [105].

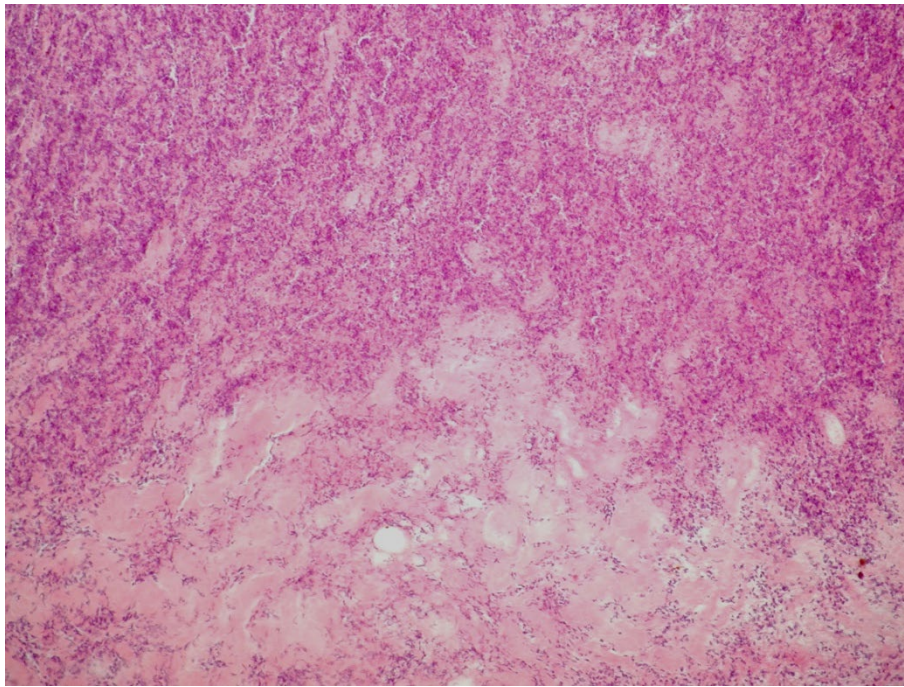


Рис. 3.5. Демаркаційний лейкоцитарний вал (у верхній частині рисунка) з прилеглим шаром некротично змінених тканин (в нижній частині рисунка), експериментальна група. Забарвлення гематоксиліном і еозином. Зб.  $\times 100$

Зона вторинного некрозу була оточена тонким шаром молодої грануляційної тканини, яка характеризується наявністю клітинного, судинного і волокнистого компонентів, серед яких переважав клітинний компонент. В грануляційній тканині клітинний компонент був представлений значною кількістю лейкоцитів і помірною кількістю макрофагів і клітин фібробластичного ряду; судинний компонент - дрібними тонкостінними судинами капілярного типу, стінки яких місцями були потовщені і набряклі; волокнистий компонент - нечисленними тонкими волокнами сполучної тканини.

Поява грануляційної тканини і потовщення епітеліального пласта в області країв рани свідчили про розвиток репаративних процесів, що протікають в зоні кровопливу.

У навколишніх тканинах дерми, гіподерми з підлеглою поперечно-м'язовою тканиною визначалася місцями виражена (ближче до рани), місцями помірна (трохи далі від рани) клітинна інфільтрація (рис. 3.6), що



характеризувалася наявністю лейкоцитів, лімфоцитів, макрофагів і клітин фібробластичного диферону.

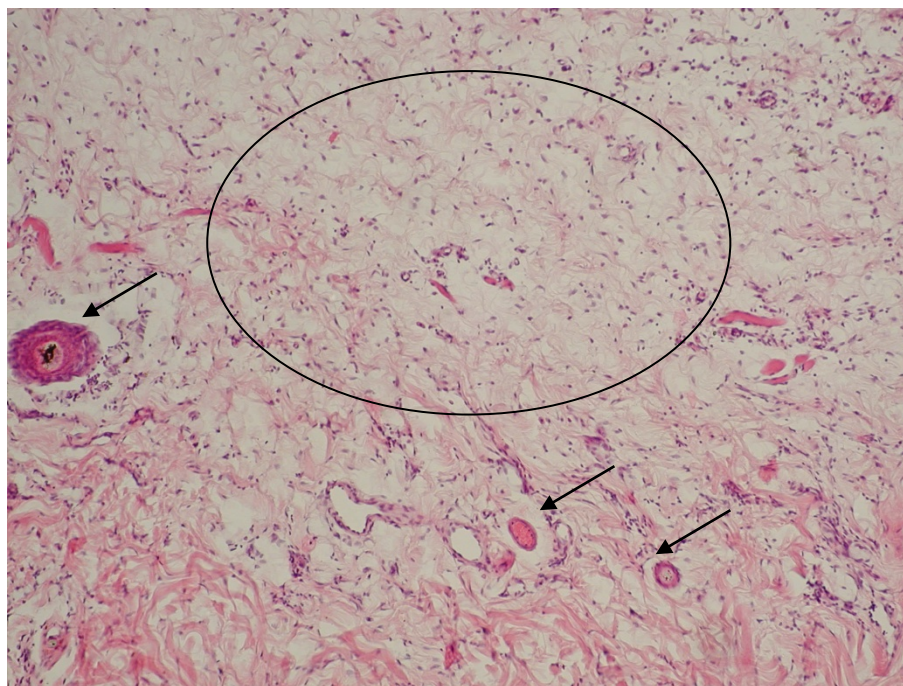


Рис. 3.6. Клітинна інфільтрація (обведено) і гемодинамічні порушення (стрілки) в прикордонних з дефектом тканинах, експериментальна група. Забарвлення гематоксиліном і еозином. 36.  $\times 100$

В оточуючій рановий дефект шкірі визначалися дистрофічні зміни в нервових волокнах, гемодинамічні порушення (еритростаз, лейкостаз, мікротромбоз, набряк) (рис. 3.6). У деяких полях зору були виявлені в дермі і гіподерми судини, позбавлені ендотеліальної вистілки, місцями з фібриноїдним некрозом стінки. Зазначені патоморфологічні зміни свідчать на користь провідної ролі ішемічного чинника у виникненні зони вторинного некрозу тканин після кріовпливу.

У м'язовій тканині, що підлягає до зони дефекту, волокна розташовувалися пухко з наявністю альтеративних змін, представлених дистрофією і некрозом. На різних ділянках в м'язових волокнах визначалися розширення і здуття, контрактильні зміни. У частині м'язових волокон була

відзначена втрата поперечної смугастість. Деякі м'язові клітини не містили ядер.

Таким чином, характер морфологічних змін в області кровопливу відповідав картині першої фази ранового процесу. Були виявлені зони первинного - викликаного прямим пошкоджуючим впливом низьких температур і вторинного – який розвинувся в результаті судинних порушень і некрозу тканин.

Процеси репарації проявлялися потовщенням в області країв рани багат шарового плоского ороговіваючого епітелію, появою на кордоні з зоною некротичних змін молоді грануляційної тканини. Отримані нами результати відповідають даним літератури про механізми впливу на біологічні тканини при кріодеструкції [42, 43], і узгоджуються з виявленими раніше морфологічними особливостями ран, викликаних кріодеструкцією за допомогою інструменту з активно охолоджуваним кріоаплікатором [202].

### **3.3. Показники системної відповіді організму піддослідних щурів на кріодеструкцію шкіри**

Для оцінки системної відповіді на кріодеструкцію шкіри проводили вимірювання в сироватці крові експериментальних тварин рівня ПОЛ, церулоплазміну і СРБ.

Відомо, що ПОЛ - вільнорадикальний процес, який постійно відбувається в організмі і знаходиться під контролем системи антиоксидантного захисту. Посилення вільно-радикальних процесів в умовах патології призводить до порушення існуючого в фізіологічних умовах прооксидантно-антиоксидантної рівноваги та розвитку окисного стресу [62].

Як видно з даних, представлених в табл. 3.1, кріодеструкція шкіри супроводжувалася статистично значущим збільшенням вмісту ДК і ТБК-активних продуктів (в 1,7 рази) в сироватці крові тварин.

Показники прооксидантно-антиоксидантного балансу в сироватці крові тварин

Група	ДК (мкмоль/мл )	ТБК-активних продуктів (нмоль/мл)	СОД (у.е./мл)	КАТ (у.е./мл)
Контрольна	27,31±3,38	5,12±0,60	4,95±0,53	3,61±0,46
Експериментальна	47,05±5,00*	8,86±1,20*	2,14±0,28 *	1,71±0,21 *

Примітки: Відмінності статистично достовірні ( $p < 0,05$ ,  $n=10$ ) : \* – в порівнянні з даними контрольної групи

При цьому мало місце зменшення активності СОД (в 2,3 рази) і КАТ (в 2,1 рази). Тобто, було відзначено зростання рівня як первинних, так і вторинних продуктів ПОЛ на тлі зниження активності ключових ланок ферментативної системи антиоксидантного захисту.

Такі зміни в сироватці крові можна розглядати як наслідок лавиноподібного посилення продукції вільних радикалів у відповідь на вплив комплексу факторів викликаних кріовпливом, компенсувати яке «місцева» система антиоксидантного захисту нездатна. Підтвердженням такої точки зору є дані про високий вміст ТБК-активних продуктів в шкірі щурів після кріодеструкції [195].

Підвищення активності процесів ПОЛ, мабуть, відбувається як в клітинах тканин, які межують із зоною некрозу, так і в клітинах крові, що реалізують макрофагальну функцію у вогнищі запалення, в першу чергу нейтрофільних лейкоцитах, велика кількість яких зафіксовано в зоні кріодеструкції за даними морфологічного дослідження.

Механізми виникнення і подальшого розвитку окисного стресу до кінця не вивчені. Відомо, що найбільш схильні до дії активних форм кисню жирні кислоти, що містять подвійні зв'язки. При надмірному утворенні

вільнорадикальних форм кисню процес ПОЛ призводить до руйнування ненасичених ліпідів, порушення структури і функції білків, нуклеїнових кислот та інших молекул, що може привести до незворотного пошкодження субклітинних структур і загибелі клітин [132].

Некроз клітин, в свою чергу, викликає розвиток запальної реакції в тканинах, що само по собі є індуктором посилення утворення вільних радикалів.

Оскільки серед всіх можливих «виробників» активних форм кисню в клітині основними є мітохондрії, то однією з основних причин його виникнення вважається мітохондріальна дисфункція [130].

На наш погляд, такий механізм може реалізуватися в клітинах, що межують із зоною некрозу і зазнали сублетальних пошкоджень, внаслідок дисциркуляторних змін мікрогемодинаміки в тканинах. Іншими важливими факторами окисного стресу є цитозольні і ядерні ферменти, гіперактивацію яких можна допустити в тканинах, оточуючих зону кріодеструкції.

СОД каталізує дисмутацію одного з основних прооксидантів - супероксида в кисень і пероксид водню, граючи найважливішу роль в антиоксидантному захисті практично будь-яких клітин. КАТ каталізує розкладання пероксиду водню, який утворюється в процесі біологічного окислення, на воду і молекулярний кисень. Зниження активності зазначених ферментів в сироватці крові тварин після кріодеструкції шкіри відображає виснаження резервів ферментативного ланки системи антиоксидантного захисту вже на системному рівні, викликаного тривалим надходженням в кровообіг великої кількості активних форм кисню. Крім того, можна припустити зменшення синтезу СОД і КАТ в результаті впливу високого рівня вільних радикалів на генетичний апарат клітини.

На користь такого припущення свідчать дані про те, що надлишок активних форм кисню може викликати як пряме руйнування нуклеїнових кислот, так і надавати багаторівневий модулюючий вплив на хроматин,

результатом якого може бути придушення транскрипції і реплікація ДНК [62].

Отримані нами дані про розвиток окисного стресу у відповідь на кріодеструкцію шкіри узгоджуються з даними про підвищення рівня продуктів ПОЛ в сироватці крові тварин з холодовими ранами [203].

Оцінка змісту СРБ в сироватці крові є загальноприйнятим лабораторним тестом для оцінки процесів запалення і деструкції. Молекула СРБ належить до еволюційно древнього сімейства білків, названому пентраксінами. Синтез СРБ відбувається в печінці у відповідь на різні запальні цитокіни, його вміст у сироватці крові швидко підвищується у відповідь на травму, запалення і інфекцію.

Рівень СРБ в сироватці крові інтактних тварин дорівнював  $1,24 \pm 0,13$  мг / мл, у тварин експериментальної групи -  $3,51 \pm 0,45$  мг / мл. Таким чином, пошкодження тканин, викликане кріовпливом, призводило до підвищення вмісту СРБ в 2,8 рази. Відомо, що СРБ може пов'язувати фосфохолін, в основному присутній в бактеріальних мембранах, клітинній мембрані і ліпопротеїнах, крім того, він може розпізнавати ядерні антигенні епітопи пошкоджених клітин.

Подібно імуноглобуліну G, він активує комплімент, зв'язується з Fc-рецепторами, тобто діє як антитіло для різних патогенів. Взаємодія СРБ з Fc-рецепторами призводить до утворення прозапальних цитокінів, підвищує фагоцитоз певних антигенів і мікроорганізмів, стимулює утворення активних форм кисню ефекторними клітинами імунної системи [111]. На відміну від IgG, який специфічно розпізнає різні антигенні епітопи, СРБ взаємодіє з чужорідними і зміненими власними молекулами [31].

Очевидно, що зафіксоване підвищення рівня СРБ викликано комплексом чинників. Одним з них є летальні і сублетальні пошкодження тканин в зоні впливу, внаслідок чого велика кількість клітин одночасно піддалися апоптозу і некрозу [31]. Відомо, що обидва ці процеси відіграють ключову роль в патогенезі низькотемпературного пошкодження тканин [10].



Мабуть, в результаті кріовпливу сталася денатурація позаклітинних білків, з пошкоджених клітин виділилися цитозольні і ядерні антигенні епітопи, що послужило сигналом для підвищення продукції СРБ в печінці. Іншим фактором можна назвати появу в зоні кріовпливу значної кількості мікробних антигенів. Крім того, найважливішим фактором є розвиток запалення.

Роль СРБ в патогенезі запального процесу до кінця не вивчена, проте відомо, що це багатофункціональний білок гострої фази, здатний надавати як протизапальний так і прозапальний вплив. Вважається, що молекула СРБ існує, щонайменше, в двох конформаційно різних формах, тобто нативна молекула СРБ є циркулюючої формою попередника мономерного СРБ. Ці ізоформи мають різні функціональні властивості. Вважається, що молекула нативного СРБ має як про- і протизапальну дію в залежності від ситуації, тоді як одновимірний СРБ робить сильний прозапальний дію, що реалізовується через вплив на ендотеліальні клітини, ендотеліальні клітини-попередники, лейкоцити і тромбоцити [128].

Можна припустити, що грубі порушення мікроциркуляторного русла після кріодеструкції шкіри, зафіксовані в результаті морфологічного дослідження, почасти викликані прозапальним впливом мономерної форми СРБ. Молекула нативного СРБ може дисоціювати на активованих тромбоцитах і інших клітинах, залучених в запальну відповідь і пов'язаних з посиленням прозапального потенціалу. Відомо, що відкладання мономерного СРБ виявляються в осередках запалення, дисоціація нативного СРБ відбувається в запальному мікрооточенні, а мономерний СРБ може сприяти локалізації запальної відповіді [111].

Таким чином, область кріовпливу, в якій летальні і сублетальні пошкодження тканин, які супроводжуються некрозом і апоптозом великої кількості клітин і розвитком септичного запального процесу можна розглядати як цільову зону для циркулюючого в крові нативного СРБ.

Підвищення рівня СРБ в сироватці крові, мабуть, забезпечує реалізацію його про- і протизапального потенціалу в області кріодеструкції. Отримані нами результати узгоджуються з даними про підвищення рівня СРБ в сироватці крові тварин з холодовими ранами [203].

Церулоплазмін є ендогенним модулятором запальної відповіді, підвищення його рівня в сироватці крові вважається системним маркером запалення, крім того відомо, що вміст церулоплазміну в сироватці крові підвищується не тільки на тлі запалення, але і при інфекції, пошкодженні і некрозі тканин [78].

Рівень церулоплазміну в сироватці крові інтактних тварин дорівнював  $108,41 \pm 11,30$  мг / мл, кріовплив на шкіру призводив до його зростання до  $288,88 \pm 32,64$  мг / мл, тобто в 2,7 рази. Молекула церулоплазміну є  $\beta$ -глобуліном плазми крові, його функції можна підсумувати таким чином: транспорт міді, мобілізація сироваткового заліза для кровотворення, пригнічення ПОЛ, участь в гострій фазі запалення, регуляція рівня біогенних амінів в сироватці крові [251].

На наш погляд, підвищення рівня церулоплазміну, зазначене після кріодеструкції шкіри, здебільшого зумовлено тим, що він є атрактантом гострої фази запалення. Оскільки кріодеструкція шкіри супроводжувалася підвищенням в сироватці крові первинних і вторинних продуктів ПОЛ, можна припустити, що до певної міри підвищення рівня церулоплазміну пояснюється його антиоксидантними властивостями і необхідно для боротьби з оксидативним стресом. Отже, збільшення вмісту церулоплазміну в сироватці крові у експериментальних тварин є відображенням активності процесів деструкції і запалення в зоні кріовпливу.

Таким чином, контакт шкіри з аплікатором кріоінструмента супроводжувався динамічними, взаємопов'язаними змінами температурних полів на поверхні шкіри і в підлягаючих тканинах. У перші секунди відбувалося різке зниження температури в місці контакту робочої поверхні

аплікатора і шкіри до  $-75,5 \pm 7,9^{\circ}\text{C}$ , далі відзначалося поступове підвищення температури яка на момент припинення кріовпливу дорівнювала  $-59,1 \pm 6,5^{\circ}\text{C}$ .

Обраний режим кріовпливу на шкіру призводив до виникнення комплексної відповіді організму піддослідних щурів, що реалізувалася на місцевому і системному рівнях.

Місцеві зміни виявлялися розвитком великого як по глибині, так і по протяжності ранового дефекту, що характеризується наявністю зони первинного некрозу, демаркаційного лейкоцитарного валу, зони вторинного некрозу і тонкого шару грануляційної тканини. Виникнення і поширення в біологічних тканинах крижаного фронту можна назвати основним етіологічним фактором первинного некрозу тканин. У ділянках, де температура тканин не опускалася нижче точки кріостійкості клітин, їх загибель можна пояснити широким колом метаболічних порушень, викликаних опосередкованим впливом охолодження на функціонування клітин. Основними етіологічними факторами таких порушень можна назвати ішемічні розлади, викликані тромбозом судин мікроциркуляторного русла і запальну реакцію, що розвиваються після відігрівання тканин.

На системному рівні виявлено розвиток окисного стресу, що виявлявся підвищенням вмісту первинних і вторинних продуктів перекісного окислення ліпідів та зниженням активності супероксиддисмутази і каталази в сироватці крові піддослідних тварин. Крім того, в сироватці крові було визначено підвищення вмісту церуллоплазміну і С-реактивного білка.

Отже, на підставі отриманих даних можна заключити, що представлена експериментальна модель кріодеструкції шкіри у безшерстих щурів, характеризується місцевими і системними проявами деструкції і запалення і може бути використана для вивчення процесів, що виникають після кріохірургічного лікування новоутворень у людини.

Результати, наведені в даному підрозділі, опубліковані в роботах [61, 172]:

## РОЗДІЛ 4

# ДОСЛІДЖЕННЯ БІОЛОГІЧНИХ ЕФЕКТІВ ВВЕДЕННЯ В ЧЕРЕВНУ ПОРОЖНИНУ ФУЛЕРЕНІВ $C_{60}$ У СКЛАДІ ВОДНОГО КОЛОЇДНОГО РОЗЧИНУ ЗА ВПЛИВОМ НА ГЕМАТОЛОГІЧНІ ТА БІОХІМІЧНІ ПОКАЗНИКИ КРОВІ ЩУРІВ

### 4.1 Визначення спектрів поглинання розчинів фулеренів $C_{60}$

Для використання фулеренів в медичній практиці необхідні стійкі водні системи цих сполук. Сучасні дослідження вказують на складну поведінку немодифікованих фулеренів в полярних розчинниках, що пов'язано з утворенням кластерів (агрегатів) [8], в результаті чого використання фулеренів у вигляді водних колоїдних розчинів накладає суттєві обмеження на дослідження їх взаємодії з біологічними системами. З причини того, що навіть проста операція додаткового розведення золів може вплинути на їх морфологічні та фізико-хімічні властивості [25], при інтерпретації даних, отриманих в експериментах із застосуванням розчинів фулеренів, необхідно дотримуватися особливої обережності, і усякого разу проводити оцінку використовуваних розчинів.

На першому етапі даної роботи нами були перевірені спектральні характеристики водних колоїдних розчинів фулеренів  $C_{60}$ , які розбавляли одним з двох найбільш часто вживаних в медичній практиці розчинників - водою для ін'єкцій і фізіологічним розчином (ізотонічним розчином хлориду натрію).

На спектрах поглинання розчину фулеренів (рис. 4.1), який розводили водою для ін'єкцій, реєстрували три максимуми смуг поглинання, при 208, 265 і 347 нм. Це узгоджується з даними літератури про спектри немодифікованого фулеренів  $C_{60}$  [18, 108]. При застосуванні в якості розчинника фулеренів ізотонічного розчину хлориду натрію ширина смуг поглинання збільшувалася, їх інтенсивність знижувалася, а максимуми

зміщувалися в більш довгохвильову область на 16 нм у порівнянні зі спектрами, отриманими при використанні води для ін'єкцій.

Відомо, що поріг коагуляції частинок фулеренів  $C_{60}$  в різних середовищах може змінюватися, при цьому змінюється і біологічна активність цих сполук [86].

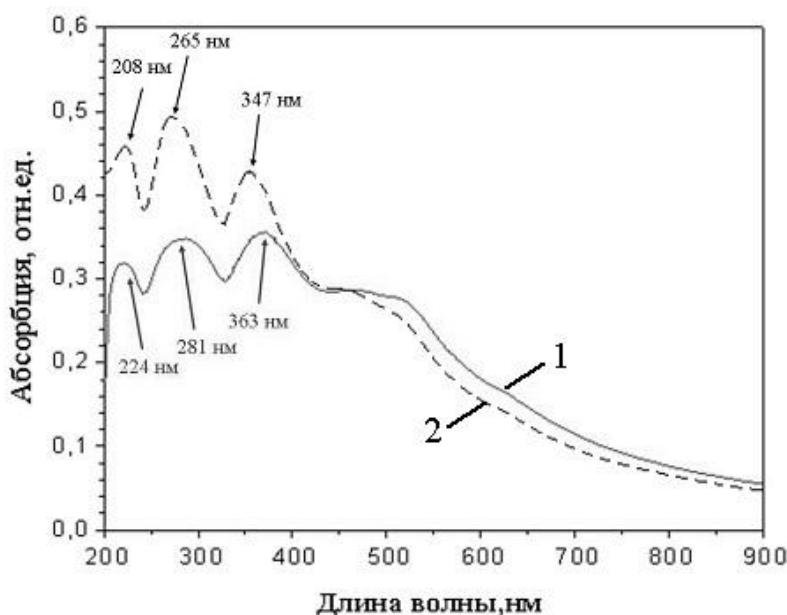


Рис. 4.1. Спектри поглинання фулеренів після розведення: 1(безперервна лінія) - ізотонічним розчином хлориду натрію; 2 (пунктирна лінія) - водою для ін'єкцій.

Так, в роботі Гринюк І.І. і співавт. показано, що у водному колоїдному розчині містяться частинки фулерена  $C_{60}$  діаметром від 38 до 600 нм, при цьому значну частину складають наночастинки діаметром близько 43 нм [49]. У розчині хлориду натрію спостерігається утворення агрегатів, тобто процентний вміст більш великих кластерів фулеренів  $C_{60}$  зростає в порівнянні з таким у водному розчині. Така поведінка фулерена  $C_{60}$  в сольових розчинах пояснюється зв'язуванням іонів натрію на поверхні наночастинки, екрануванням її поверхневого заряду і зниженням енергетичного бар'єру агрегації [33]. Слід зазначити, що за даними тих самих авторів внесення наночастинок фулерена  $C_{60}$  в середовища з додаванням

альбуміну (тобто наближені за складом до біологічних) запобігає залежній від іонів натрію агломерації. Отже, для розведення вихідного водного колоїдного розчину фулеренів  $C_{60}$  більш доцільним є застосування води для ін'єкцій, ніж ізотонічного розчину хлориду натрію. Виходячи з цих міркувань в наступних експериментах *in vivo* для отримання фулеренів різних концентрацій використовували воду для ін'єкцій.

#### **4.2 Гематологічні показники щурів після введення інтактним щурам розчинів фулеренів $C_{60}$**

Розуміння поведінки фулеренів, зокрема, при інтраперитоніальному введенні є важливим з точки зору їх цільової біодоступності. Проте питання стабільності розчинів фулеренів *in vivo* залишається поза увагою дослідників, які застосовують фулерени в концентрації 0,1 – 0,15 мг/мл [64, 65]. За експериментальними даними ряду авторів, ефективні і безпечні добові дози фулеренів  $C_{60}$  у складі колоїдних розчинів знаходяться в діапазоні 0,1 – 1 мг/кг маси тварини. При цьому, ефективність застосування фулеренів при певних патологіях проявляється після багатократного щоденного або менш частого введення [192, 64, 65]. Одним з ключових моментів створення біологічно активних речовин на основі наноматеріалів є оцінка безпеки введення наночастинок в організм людини і тварин [110]. Оскільки клінічні та біохімічні дослідження крові є універсальними діагностичними методами оцінки функціонального стану різних систем органів, їх нерідко використовують в якості комплексних біологічних індикаторів гомеостазу [134, 58].

Для дослідження біологічних ефектів і можливої токсичності розчинів фулеренів  $C_{60}$  *in vivo*, нами була обрана одноразова доза  $C_{60}$  1 мг/кг маси. Відомо, що в ізотонічних розчинах (0,9% NaCl, тобто фізіологічний розчин) стійкими є золі з концентрацією фулерена не більш  $3,0\text{--}3,5 \times 10^{-5}$  моль/л [225, 253]. Цим був обумовлений вибір концентрацій розчинів фулеренів для цієї серії досліджень. Обрали розчини фулеренів з концентрацією 173 мкмоль/л,

яка є максимально допустимою, виходячи з об'єму циркулюючої крові щурів. Тобто, теоретично, максимальна концентрація розчинів фулеренів в крові після повного всмоктування з черевної порожнини не могла перевищувати 35 мкмоль/л, отже була б завідомо нижче порога агрегації фулеренів в ізотонічних розчинах. Також обрали розчин фулеренів з концентрацією 34,7 мкмоль/л, яка близька до порогової для ізотонічних розчинів. Отже при всмоктуванні такого розчину з черевної порожнини взагалі не виникає умов для агрегації кластерів C<sub>60</sub>.

У наших дослідженнях було встановлено, що у контрольних тварин з введенням води для ін'єкцій значущих змін гематологічних показників у порівнянні з інтактними щурами не спостерігалось (табл. 4.1). Застосування розчинів фулеренів у концентраціях 34,7 та 173 мкмоль/л супроводжувалося розвитком незначного анізоцитозу, щодо значень у інтактних тварин (табл. 4.1). Так, стандартне відхилення відносної ширини розподілу еритроцитів за об'ємом збільшувалося на 15 і 12% на 1 добу та на 13 і 18% на 5 добу у групах з введенням фулеренів у концентраціях 34,7 та 173 мкмоль/л, відповідно. При цьому, середній об'єм еритроцитів залишався на рівні інтактного контролю, за винятком групи з введенням ВКРФ C<sub>60</sub> у концентрації та 173 мкмоль/л, де на 5 добу цей показник збільшувався на 14% щодо значень інтактною групи.

На 1 добу після введення розчину фулеренів у концентрації 34,7 мкмоль/л спостерігали значуще, на 35%, підвищення абсолютного вмісту лейкоцитів (табл. 4.1). При цьому аналіз лейкоцитарної формули на 1 добу після введення розчину фулеренів у концентрації 34,7 мкмоль/л показав підвищення вмісту сегментоядерних нейтрофілів на 64 % щодо інтактних тварин. (табл. 4.2). Таким чином, введення розчину фулеренів C<sub>60</sub> у концентрації 34,7 мкмоль/л супроводжувалося анізоцитозом і зворотнім лейкоцитозом.

Таблиця 4.1

Гематологічні показники тварин після введення розчинів фулеренів C<sub>60</sub> в різних концентраціях

Показник	Інтактні тварини	ВКРФ C <sub>60</sub> , 34,7 мкмоль/л		ВКРФ C <sub>60</sub> , 173 мкмоль/л		Контроль (вода для ін'єкцій)
		1 доба	5 доба	1 доба	5 доба	
абсолютний вміст лейкоцитів, ×10 <sup>9</sup> /л	11,83±1,67	16,06±1,98 <sup>1,2</sup>	13,66±3,41	11,71±1,20	11,57±2,71	11,93±2,28
концентрація гемоглобіну, г/л	140,29±8,14	132,43±4,54	130,14±7,54	135,43±4,04	125,86±3,39	135,57±3,64
абсолютний вміст еритроцитів, ×10 <sup>12</sup> /л	7,63±0,38	6,80±0,25	6,44±0,43	7,46±0,47	6,64±0,34	7,46±0,25
гематокрит, %	43,52±3,37	42,07±1,80	41,66±2,36	44,97±1,36	38,51±1,39	41,41±3,44
середній об'єм еритроцита, фл	57,06±3,17	61,79±1,61	64,84±1,05 <sup>1,2</sup>	60,70±2,37	58,26±3,36	57,63±1,02
середній вміст гемоглобіну в еритроциті, пг	18,30±0,54	18,76±0,94	18,94±1,36	17,83±1,04	18,94±0,85	18,33±0,31
середня концентрація гемоглобіну в еритроцитарній масі, г/л	321,71±11,00	314,86±3,76	315,00±8,68	304,86±6,12	325,57±6,21	317,71±5,50
коефіцієнт варіації відносної ширини розподілу еритроцитів за об'ємом, %	13,64±1,00	14,20±0,48	14,79±0,61	14,01±0,91	16,03±0,60 <sup>1,2</sup>	13,29±0,67
стандартне відхилення відносної ширини розподілу еритроцитів за об'ємом, фл	26,93±0,80	31,01±0,49 <sup>1,2</sup>	33,71±1,28 <sup>1,2</sup>	30,23±1,15 <sup>1,2</sup>	31,70±2,89 <sup>1,2</sup>	27,4±0,88
абсолютний вміст тромбоцитів, ×10 <sup>9</sup> /л	374,00±46,37	436,14±48,25	481,57±91,72	449,43±47,36	460,43±61,06	414,29±70,93

Примітки: Відмінності статистично достовірні (p<0,05, n=7): 1 – в порівнянні з інтактними тваринами; 2 – в порівнянні з показниками контролю



Таблиця 4.2

Лейкоцитарна формула тварин після введення розчинів фулеренів C<sub>60</sub> в різних концентраціях

Показник, %	Інтактні тварини	ВКРФ C <sub>60</sub> , 34,7 мкмоль/л		ВКРФ C <sub>60</sub> , 173 мкмоль/л		Контроль (вода для ін'єкцій)
		1 доба	5 доба	1 доба	5 доба	
п/я	1,29±0,49	1,43±0,53	1,14±0,38	1,14±0,38	1,43±0,79	1,29±0,49
с/я	17,57±2,99	28,86±7,38 <sup>1,2</sup>	19,57±4,20	16,29±6,32	18,29±3,90	16,57±3,05
Э	6,86±2,12	6,43±3,51	4,57±3,10	8,57±3,64	7,29±3,04	7,14±5,49
Л	70,29±5,74	60,43±7,68	72,86±3,63	71,00±11,17	69,57±3,74	71,57±6,60
М	1,71±0,95	2,86±1,68	1,86±1,35	3,00±3,06	3,43±2,07	3,43±1,81

Примітки: Відмінності статистично достовірні ( $p < 0,05$ ,  $n = 7$ ): 1 – в порівнянні з інтактними тваринами; 2 – в порівнянні з показниками контролю; п/я – паличкоядерні нейтрофіли; с/я – сегментоядерні нейтрофіли; Э – еозинофіли; Л – лімфоцити; М – моноцити

### 4.3 Біохімічні показники сироватки крові щурів після введення інтактним щурам розчинів фулеренів C<sub>60</sub>

Дослідження біохімічних показників сироватки крові показало, що в групі з введенням розчину фулеренів в концентрації 34,7 на 1 добу експерименту активність АСТ і АЛТ зростала на 91,7 і 97,5 % відповідно порівняно з нормою, а лужної фосфатази значуще не змінювалася (табл. 4.3). Через 5 діб ці показники були на рівні контролю. У разі застосування

розчину фулеренів в концентрації 173 мкмоль/л вони не відрізнялися від контролю протягом всього терміну спостереження.

Таблиця 4.3

Біохімічні показники тварин після введення розчинів фулеренів C<sub>60</sub> в різних концентраціях

Показник	Інтакт	ВКРФ C <sub>60</sub> , 34,7 мкмоль/л		ВКРФ C <sub>60</sub> , 173 мкмоль/л		Контроль
		1 доба	5 доба	1 доба	5 доба	
Загальний білок (г/л)	63,16 ±2,52	64,018 ±3,63	64,11 ±2,67	61,78 ±5,33	62,73 ±3,8	65,35 ±1,22
АЛТ (Од/л)	37,39 ±3,68	70,59 ±12,13 <sup>1,2</sup>	40,26 ±4,57	38,77 ±1,68	37,73 ±2,19	36,17 ±3,08
АСТ (Од/л)	106,14 ±13,88	203,41 ±20,38 <sup>1,2</sup>	110,63 ±12,71	110,23 ±10,90	109,73 ±1,47	117,19 ±27,53
Лужна фосфатаза (Од/л)	142,00 ±3,79	147,82 ±25,85	141,41 ±17,04	144,74 ±14,92	150,16 ±25,27	156,52 ±28,48
Сечовина (ммоль/л)	3,56 ±0,28	3,92 ±0,80	3,27 ±0,33	3,44 ±0,51	3,65 ±0,39	3,10 ±0,44
Креатинін (мкмоль/л)	75,40 ±9,48	73,31 ±15,12	75,27 ±12,56	67,54 ±12,42	80,66 ±9,71	72,27 ±10,46

Примітки: Відмінності статистично достовірні ( $p < 0,05$ ,  $n=7$ ): 1 – в порівнянні з інтактними тваринами; 2 – в порівнянні з показниками контролю;

Відомо, що вихід трансаміназ в кровотік відбувається при пошкодженні клітинних мембран, яке в свою чергу лежить в основі первинного механізму токсичності більшості з'єднань. Найбільш висока активність трансаміназ і, особливо, АЛТ, визначається в печінці, менш виражена - в міокарді, скелетних м'язах, нирках та інших органах. Таким чином, підвищення активності АСТ і АЛТ після внутрішньочеревно введення розчину фулеренів є в першу чергу маркером пошкодження гепатоцитів,

міоцитів серцевої та/або скелетної мускулатури. З цього можна зробити висновок, що данні розчин фулеренів має короткочасний токсичний вплив на клітини печінки та/або м'язової тканини та не пошкоджує нирки, про що свідчить відсутність змін вмісту креатиніну, сечовини та активності лужної фосфатази в сироватці крові .

Нашу увагу привернув факт відсутності помітних змін досліджуваних гематологічних та біохімічних показників крові щурів протягом всього строку спостереження після введення розчину фулеренів  $C_{60}$ , в концентрації 173 мкмоль/л. Макроскопічна оцінка очеревини під час аутопсії, свідчить про агрегацію фулеренів і випадіння в осад в місці введення (рис.4.2). Вочевидь, проникнення фулеренів  $C_{60}$  з більш концентрованого розчину в системний кровотік є зниженим, неконтрольованим. Таким чином, оскільки внутрішньоочеревне введення концентрованого розчину не забезпечує надходження цільової дози фулеренів  $C_{60}$ , застосування таких розчинів для досліджень *in vivo* може бути доцільним лише за умови інших способів введення.



Рис. 4.2 Зона ін'єкції концентрованого (173 мкмоль/л) розчину  $C_{60}$ . Агрегація і осадження фулеренів  $C_{60}$  (обведено лінією).

Отже, біологічна дія фулеренів залежить від способу введення в організм. Так, Шипелін В.А. і співавт. в роботі [106] показали, що фулерен  $C_{60}$  при щоденному внутрішньошлунковому введенні щурам протягом 28 днів в дозах 1 і 10 мг/кг маси тіла у вигляді дисперсії в речовинах, дозволених для використання в складі їжі, продемонстрував вплив на ряд показників, включаючи відносну масу печінки, активність ізоформи СУР 1A2 і глутатіонредуктази, чисельність еозинофілів, нейтрофілів і лімфоцитів. Хоча будь-якого впливу перорально введеного фулерена на біохімічні показники в сироватці крові (активність АЛТ і АСТ, лужної фосфатази, концентрація загального білка, альбуміну, креатинін, сечова кислота, глюкоза) авторами відзначено не було. У даній роботі так само описано зниження кількості еритроцитів і вмісту гемоглобіну в цільній крові, але оскільки відмінність показників у тварин, які отримували фулерени і його носій, була недостовірною, автори зробили висновок про відсутність специфічних ефектів впливу фулерена на дані показники.

Baker G.L. і співавт. [9] відзначали статистично значуще зниження еритроцитів, гемоглобіну і гематокриту у щурів після 10-тиденного інгаляційного введення наночасток фулерена  $C_{60}$  в концентрації 2,22 мг/м<sup>3</sup>. Так само були виявлені мінімальні зміни в сироватці крові. В результаті автори прийшли до висновку, що токсичні ефекти фулеренів можуть проявлятися при більш тривалому їх введенні.

Таким чином, показано, що ВКРФ  $C_{60}$  в концентрації 34,7 мкмоль/л при інтраперитоніальному введенні щурам в разовій дозі 1 мг/кг проявляв певну токсичність. А саме, викликав підвищення активності АСТ і АЛТ в сироватці крові в 1,9 та 2 рази, і помірний анізоцитоз: збільшувалося стандартне відхилення відносної ширини розподілу еритроцитів за об'ємом на в 1,2 і 1,3 рази відповідно на 1 добу і 5 добу. Застосування ВКРФ  $C_{60}$  в концентрації 34,7 мкмоль/л на 1 добу експерименту супроводжувалося транзиторним лейкоцитозом (кількість лейкоцитів підвищується в 1,4 рази) з підвищенням

вмісту сегментоядерних нейтрофілів в 1,6 рази, На 5 добу спостереження встановлено збільшення стандартного середнього об'єму еритроцитів в 1,1 рази, значущих змін біохімічних показників не виявлено

Показано, що інтраперитоніальне введення розчину фулеренів  $C_{60}$  в концентрації 173 мкмоль/л супроводжувалось помірним анізоцитозом, збільшувалося стандартне відхилення відносної ширини розподілу еритроцитів за об'ємом на 1,1 і 1,2 рази на 1 добу і 5 добу відповідно. Коефіцієнт варіації відносної ширини розподілу еритроцитів за об'ємом зростав в 1,2 рази на 5 добу. Біохімічні показники сироватки крові не змінювались на всі строки експерименту.

Відмінності в біологічних ефектах після внутрішньоочеревинного введення ВКРФ  $C_{60}$  в різних концентраціях ми пояснюємо їх агрегацією і випадінням в осад при введенні більш концентрованого розчину, внаслідок чого не забезпечувалось надходження цільової дози фулеренів в системний кровообіг. Це підтверджується наявністю темних плям на поверхні очеревини при макроскопічній оцінці місця введення ВКРФ  $C_{60}$  в концентрації 173 мкмоль/л. Тому у подальших дослідженнях ми використовували ВКРФ  $C_{60}$  з концентрацією 34,7 мкмоль/л.

Враховуючи зворотні токсичні ефекти після внутрішньоочеревинного введення ВКРФ  $C_{60}$ , в подальших дослідженнях нами було вирішено знизити разову дозу ВКРФ  $C_{60}$  до 0,1 мг/кг маси тіла тварини.

Результати, наведені в даному підрозділі, опубліковані в роботах [115, 116, 122, 123, 166, 171, 173]:

## РОЗДІЛ 5

### ЗАГОЄННЯ РАН ПІСЛЯ КРІОДЕСТРУКЦІЇ НА ФОНІ ВВЕДЕННЯ ЕКСТРАКТУ КРІОКОНСЕРВОВАНИХ ФРАГМЕНТІВ ШКІРИ ПОРОСЯТ І ВОДНОГО КОЛОЇДНОГО РОЗЧИНУ ФУЛЕРЕНУ C<sub>60</sub>

Пошук і вивчення нових лікарських засобів, стимулюючих процеси репарації, представляє важливе завдання сучасної медицини. Не дивлячись на те, що є багато біологічно активних препаратів, стимулюючих метаболічні процеси, і що відносяться до різних фармакологічних груп (протеолітичні ферменти, синтетичні гормони, тканинні і білкові препарати, антисептичні засоби, фітопрепарати, різні масла, адсорбенти), зберігається потреба в нових ефективних медикаментозних засобах, регулюючих процеси регенерації. До лікарських засобів, стимулюючих процеси регенерації, відносяться речовини, які проявляють репаративну активність на моделях шкірних ран, оскільки тільки в цих тканинах найнаочніше простежується динаміка і механізм процесів регенерації. Таким чином, шкіра - через її неоднорідну структури - вимагає препаратів, які б впливали на всі її шари в процесі регенерації. Препарати не повинні бути токсичними, викликати алергічні реакції.

#### **5.1. Макроскопічна характеристика ран після кріодеструкції шкіри та введення ЕКФШП і ВКРФ C<sub>60</sub>**

У щурів як в групі з кріодеструкцією та введенням фізіологічного розчину (контроль), так і в групах з введення екстракту кріоконсервованих фрагментів шкіри поросят або водного колоїдного розчину фулерену C<sub>60</sub> на 7 добу формувалася чітко виражена зона кріонекрозу (рис. 5.1).



а

б

в

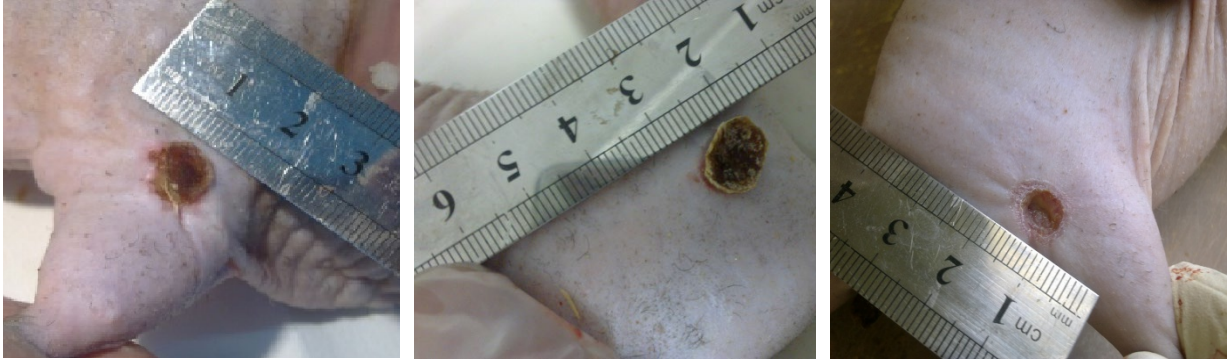
Рис. 5.1. Рани у щурів на 7 добу експерименту: а – кріодеструкція + фізрозчин, б – кріодеструкція + введення ЕКФШП, в – кріодеструкція + введення ВКРФ С<sub>60</sub>.

В контрольній групі на 7 добу після кріодеструкції спостерігалася помірна гіперемія і набряк, інфільтрація країв ран, надходження гнійних виділень з під струпу жовто-зеленого кольору, при ревізії на дні ран були виявлені відмежовані скупчення гною. Гній зелено-жовтого кольору з характерним запахом. В групі з введенням екстрактів спостерігалися рани під струпом червоно-коричневого кольору, без ознак нагноєння. Краї ран відносно рівні, місцями спостерігалась помірна гіперемія без набряку. В групі з введенням фулеренів на 7 добу спостерігалися рани під струпом червоно-коричневого кольору, без ознак нагноєння. Краї ранових дефектів відносно рівні, гіперемії та набряку не спостерігалось,

На 14 добу в контрольній групі рани округлої та овальної форми, під струпом жовто-коричневого кольору, місцеві ознаки запалення були виражені незначно, місцями гіперемія країв ранового дефекту, місцями серозні виділення з під струпу, при ревізії ран відмежовані рідинні та гнійні скупчення не виявлені (рис 5.2). В групі з введенням ЕКФШП на 14 добу рани овальної форми, під струпом червоно-коричневого кольору, краї струпу підняті. Гіперемія, набряк і інфільтрація ран не спостерігалася, виділень з ран не було. В групі з введенням ВКРФ С<sub>60</sub> рани овальної форми, під тонким



струпом коричневого кольору з піднятими краями чи взагалі без струпу. Гіперемія, набряк і інфільтрація ран були відсутні, виділень з ран не було.



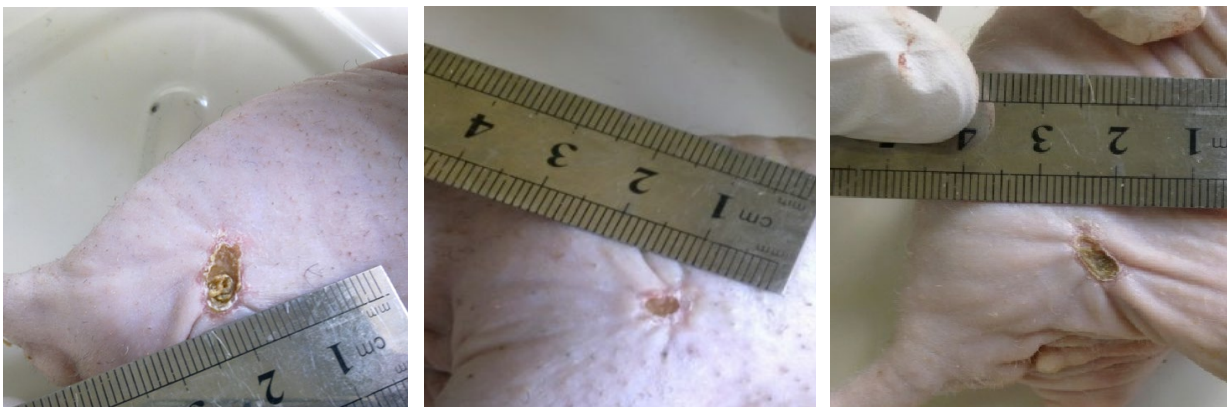
а

б

в

Рис. 5.2. Рани у щурів на 14 добу експерименту: а – кріодеструкція + фізрозчин, б – кріодеструкція + введення ЕКФШП, в – кріодеструкція + введення ВКРФ С<sub>60</sub>

На 21 добу в контрольній групі рани овальної форми, під тонким струпом. місцевих ознак запалення і виділень не спостерігалось (рис. 5.3). У обох експериментальних групах спостерігались істотно епітелізовані рани округлої чи овальної форми, струп відсутній або тонкий. Місцевих ознак запалення і виділень не спостерігалось



а

б

в

Рис. 5.3. Рани у щурів на 21 добу експерименту: а – кріодеструкція + фізрозчин, б – кріодеструкція + введення ЕКФШП, в – кріодеструкція + введення ВКРФ С<sub>60</sub>.



На 7-му добу експерименту площа ран у всіх групах не мала статистичних відмінностей (табл. 5.1).

Таблиця 5.1

Площа ран (мм<sup>2</sup>) в залежності від умов експерименту

Умови експерименту	Термін спостереження, доба		
	7	14	21
Контроль (кріодеструкція + фізрозчин)	128,2±17,0	56,1±9,4	30,5±4,4
Кріодеструкція + ЕКФШП	131,2±18,1	54,5±8,0	16,2±2,3 <sup>1</sup>
Кріодеструкція + ВКРФ С <sub>60</sub>	146,2±22,1	33,08±4,8 <sup>1,2</sup>	21,39±2,7 <sup>1</sup>

Примітка. Відмінності статистично достовірні ( $p < 0,05$ ,  $n = 10$ ): 1 – в порівнянні з контролем. 2 – з групою кріодеструкція + ЕКФШП.

На 14-ту добу середнє значення площі ран в групі з введенням ВКРФ С<sub>60</sub> було меншим в 1,7 рази ніж в групі контролю і в 1,6 рази меншим, ніж після введення ЕКФШП.

На 21-шу добу площа ран в обох експериментальних групах була достовірно меншою за показник контрольної групи. Так, після застосування екстрактів, середнє значення площі ранових дефектів було меншим за цей показник в групі контролю в 1,9 рази, а при введенні розчину фулеренів - в 1,4 рази, Таким чином, введення ВКРФ С<sub>60</sub> та ЕКФШП після кріодеструкції шкіри достовірно прискорювало темп загоєння ран під струпом у безшерстих щурів, у порівнянні з контролем.

## 5.2. Мікроскопічна будова ран після кріодеструкції шкіри та застосування ЕКФШП і ВКРФ С<sub>60</sub>

Гістологічне дослідження показало, що структура шкіри інтактних щурів повністю відповідала нормі і складалася з епідермісу і дерми.

Епідерміс мав рівномірну товщину (середнє значення товщини епідермісу склало  $(21,3 \pm 2,9)$  мкм і був представлений базальним шаром дрібних епітеліоцитів, декількома рядами шипуватих епітеліоцитів, зернистими клітинами і роговими епітеліоцитами. Між епідермісом і підлягаючою дермою візуалізувалася базальна мембрана.

Дерма займала основну частину шкіри і складалась з сосочкового і сітчастого слоїв, між якими не було чіткої межі. Сосочковий шар дерми був згладжений, сосочки в ньому розташовувалися рідко. Сосочковий і сітчастий шари дерми були представлені місцями пухкою, місцями щільною неоформленою сполучною тканиною, волокна якої забарвлювалися в червоний колір при забарвленні пікрофуксином за Ван-Гізоном. Серед волокон сполучної тканини при забарвленні по Маллорі було відзначено переважання колагенових волокон, що мали синій колір, над еластичними волокнами, що зафарбовувалися у червоний колір. Волокна сполучної тканини мали різне спрямування: частина волокон лежали паралельно поверхні шкіри, частина – косо. У дермі між волокнами сполучної тканини визначалися судини, нервові волокна, шкірні залози і коріння волосся. Клітинні елементи дерми були представлені нечисленними фібробластами, макрофагами та ін. Дерма без чіткої межі продовжувалась у підшкірну жирову клітковину, гіподерму, що була представлена жировими клітинами – адипоцитами, або ліпоцитами, які формували часточки різних розмірів. Адипоцити в часточках, мали типову будову, близько прилягали один до одного. Між жировими клітинами у всіх напрямках виявлялися тонкі волокна пухкої сполучної тканини, яка була продовженням сполучної тканини дермі. При фарбуванні пікрофуксином за Ван-Гізоном волокна сполучної тканини

мали червоний колір, при фарбуванні по Маллорі – синій колір, що свідчило про наявність колагенових волокон. Також у стромі жирової тканини визначалися судини мікроциркуляторного русла і нервові волокна.

Глибше гіподерми знаходились волокна поперечно-м'язової тканини без ознак патології (рис. 5.4). Між волокнами м'язової тканини визначалися тонкі, пофарбовані пікрофуксином за Ван-Гізоном в червоний і по Маллорі в синій колір волокна сполучної тканини. Між волокон м'язової тканини також визначалися судини мікроциркуляторного русла.

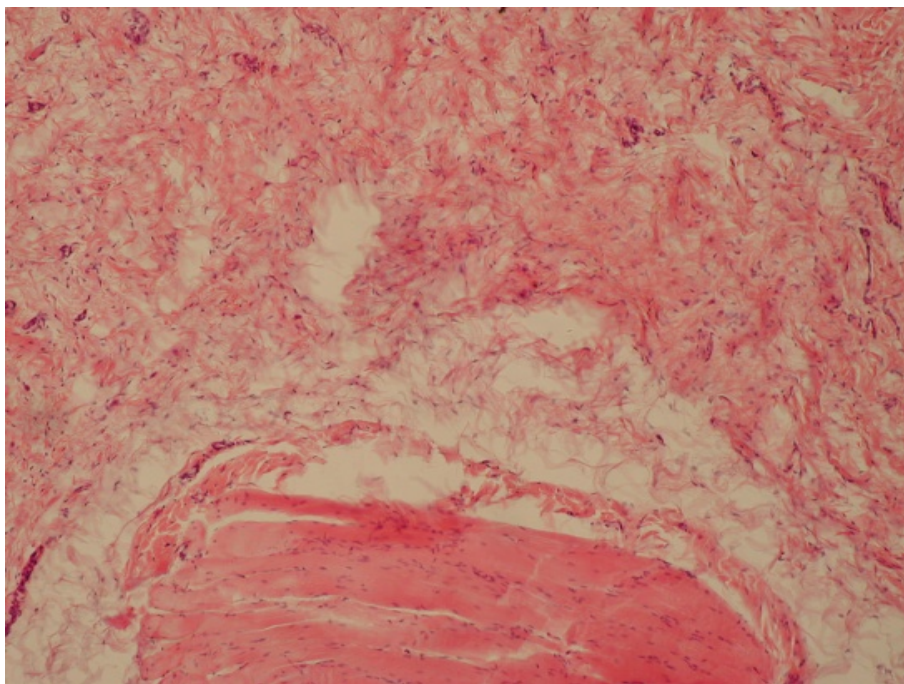


Рис. 5.4. Дерма та гіподерма з підлеглою поперечносмугастою м'язовою тканиною в області стегна інтактного щура. Забарвлення гематоксиліном і еозином. Зб. X100

### 5.2.1. Гістологічна будова ран у тварин з кріодеструкцією шкіри

У всіх тварин із кріодеструкцією та введенням фізіологічного розчину (група контролю) на 7 добу експерименту при гістологічному дослідженні у шкірі визначався великий як за глибиною, так і за протяжністю рановий дефект, в області країв якого зазначалося потовщення багат шарового плоского ороговілого епітелію. Середнє значення товщини епідермісу

навколо ранового дефекту складало  $(26,8 \pm 5,7)$  мкм і не відрізнялось від товщини у інтактних тварин.

При мікроскопічному дослідженні було відзначено, що вся поверхня ранового дефекту була вкрита масивними некротичними масами, представленими некротизованими частинами епідермісу, дерми і гіподерми (зона первинного некрозу). Також у некротичних масах знаходилася велика кількість загиблих лейкоцитів. Середнє значення товщини зони первинного некрозу складало  $(1975,9 \pm 459,2)$  мкм.

Гнійно-некротичні маси були оточені демаркаційним лейкоцитарним валом, що мав місцями чіткі, а місцями розмиті межі. Крім того було відмічено, що товщина валу помітно відрізнялась в різних полях зору у тварин всередині групи, що підтверджується досить високим значенням стандартного відхилення середнього значення товщини демаркаційного лейкоцитарного валу. Ці показники дорівнювали  $(329,5 \pm 162,6)$  мкм. За демаркаційним лейкоцитарним валом визначався шар некротично змінених тканин дерми і гіподерми, тобто зона вторинного некрозу. Середнє значення товщини шару вторинного некрозу складало  $(482,7 \pm 92,9)$  мкм.

Глибше зони вторинного некрозу був розташований тонкий шар незрілої грануляційної тканини. Остання була представлена великою кількістю клітинних елементів і незначною кількістю дрібних тонкостінних капілярів. Серед клітинних елементів зазначалося переважання лейкоцитів над макрофагами і клітинами фібробластичного диферону. Стінки новоутворених судин були подекуди потовщені та набряклі. Також в грануляційній тканині були виявлені нечисленні тонкі волокна сполучної тканини, що мали червонуватий колір при фарбуванні пікрофуксином за Ван-Гізоном і синюватий колір при фарбуванні по Маллорі. Середнє значення товщини шару грануляційної тканини складало  $(148,3 \pm 100,0)$  мкм.

У тканинах дерми та гіподерми з підлеглою поперечно-м'язовою тканиною, що межують з рановим дефектом визначалася місцями виражена (ближче до ранового дефекту), місцями помірна (далі від ранового дефекту)

клітинна інфільтрація, яка була представлена лейкоцитами, лімфоцитами, макрофагами і клітинами фібробластичного диферону. Також у м'яких тканинах, які межують з рановим дефектом, визначалися мікроциркуляторні розлади у вигляді еритростазу, лейкостазу, мікротромбозу і ознак набряку.

В дермі і гіподермі місцями були виявлені судини, позбавлені ендотеліальної вистілки, місцями з фібриноїдним некрозом стінки. У нервових волокнах дерми відзначалися осередкові дистрофічні зміни.

У м'язової тканини, яка розташовувалася під зоною дефекту, волокна розташовувалися пухко і мали альтеративні зміни у вигляді дистрофії і некрозу. В м'язових волокнах візуалізувалися розширення і здуття, контрактильні зміни. У частині м'язових волокон була відсутня поперечна смугастість, не візуалізувалися ядра міоцитів.

При мікроскопічному дослідженні на 14 добу визначалася наявність великого ранового дефекту. На суміжних з рановим дефектом ділянках було відзначено потовщення епідермісу, що мав пошарову організацію. Середнє значення товщини багат шарового плоского епітелію у ділянках, що були розташовані поблизу з рановим дефектом, було достовірно вище за нормальні показники (інтактна група) і складало  $(32,9 \pm 6,2)$  мкм.

У деяких випадках в прикордонних з рановим дефектом ділянках епідермісу визначалося не тільки потовщення епітеліального пласта, але і акантотичні розростання у підлеглу тканину дерми (рис. 5.5).

Поверхня ранового дефекту була покрита некротично зміненими тканинами (зоною первинного некрозу), за якими слідував демаркаційний лейкоцитарний вал. Проте, було відмічено признаки відторгнення некротично змінених тканин (зони первинного некрозу) з прилеглим демаркаційним лейкоцитарним валом (рис. 5.6). Середній показник товщини шару некротично змінених тканин дорівнював  $(1531,0 \pm 306,1)$  мкм. Зона демаркаційного лейкоцитарного вала, як і на попередній строк спостереження, мала різну товщину і в середньому по групі контролю дорівнювала  $(1531,0 \pm 306,1)$ .

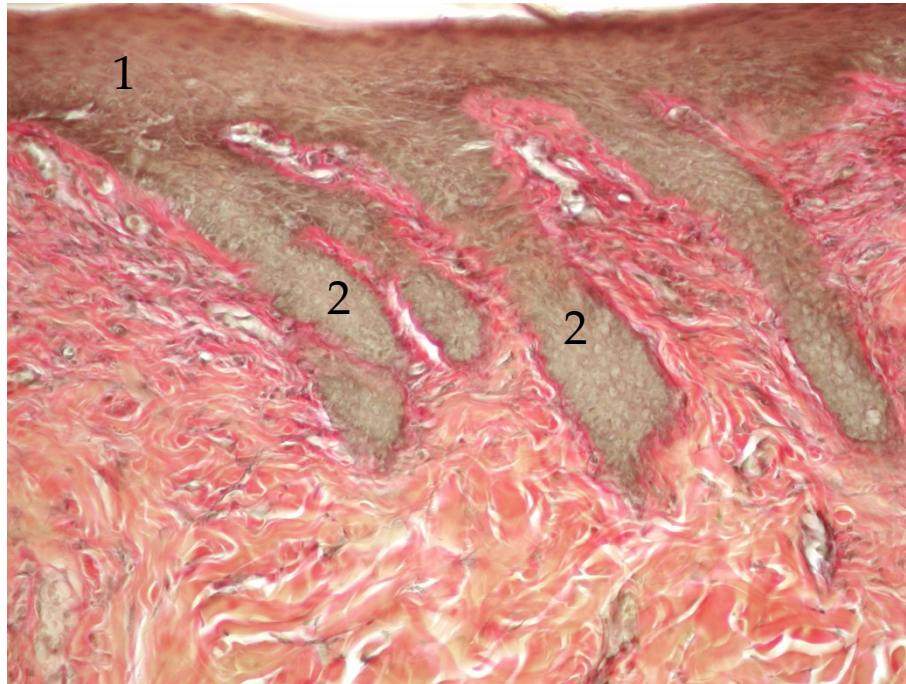


Рис. 5.5. Потовщення епітеліального пласта (1) і акантотичні розростання (2) у підлеглу тканину дерми (контрольна група, 14 доба). Забарвлення пікрофуксином за Ван-Гізоном. Зб. Х200

Нижче демаркаційного лейкоцитарного валу визначався шар некротично змінених тканин дерми і гіподерми (зона вторинного некрозу), середнє значення товщини цієї зони склало  $(393,25 \pm 9,189)$  мкм.

За шаром некротично змінених тканин визначався шар грануляційної тканини, яка розташовувалася як в дні ранового дефекту, так і по його боках та складалася з тонких, безладно розташованих колагенових волокон сполучної тканини, забарвлених пікрофуксином за Ван-Гізоном у червоний, а по Маллорі – у синій колір. Волокна сполучної тканини були оточені лейкоцитами, макрофагами, лімфоцитами і клітинами фібробластичного диферону різного ступеня зрілості. Клітинний компонент у грануляційній тканині був переважаючим. Клітинність грануляційної тканини була більш вираженою в поверхневих відділах порівняно з глибокими.



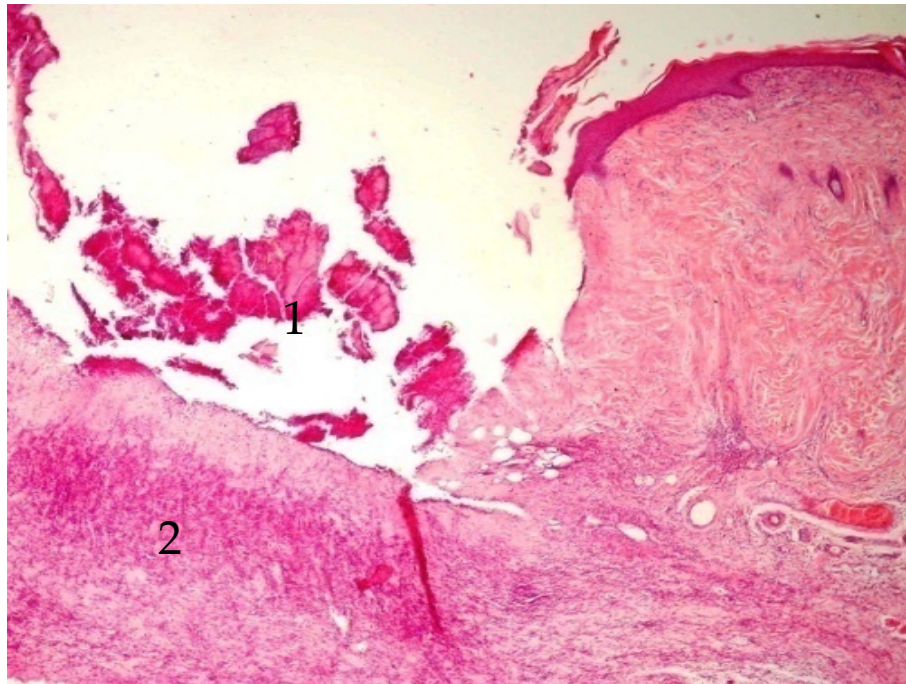


Рис. 5.6. Відторгнення некротично змінених тканин (1) і фрагменти демаркаційного лейкоцитарного валу (2) з області ранового дефекту (контрольна група, 14 доба). Забарвлення гематоксиліном і еозином. Зб. Х40.

Також в грануляційній тканині визначався судинний компонент, який в частині полів зору був помірним і характеризувався наявністю дрібних судин капілярного типу з ознаками гіперемії; а в частині полів зору судинний компонент був вираженим і характеризувався наявністю безлічі збільшених у розмірах судин капілярного типу. У деяких полях зору стінки новоутворених капілярів були потовщені, набряклі. На окремих ділянках були виявлені мікроциркуляторні розлади (еритростаз, лейкостаз, мікротромбоз). Середнє значення товщини шару грануляційної тканини у тварин даної групи складало  $(203,8 \pm 61,6)$  мкм.

У навколишніх з рановим дефектом м'яких тканинах дерми (рис. 5.7) та гіподерми з прилеглою поперечно-м'язовою тканиною (рис. 5.8, 5.9) визначалися помірні ознаки порушення кровообігу і набряку, а також місцями помірна, місцями виражена поліморфна клітинна інфільтрація, що складалася з лейкоцитів, лімфоцитів, макрофагів і клітин фібробластичного ряду.

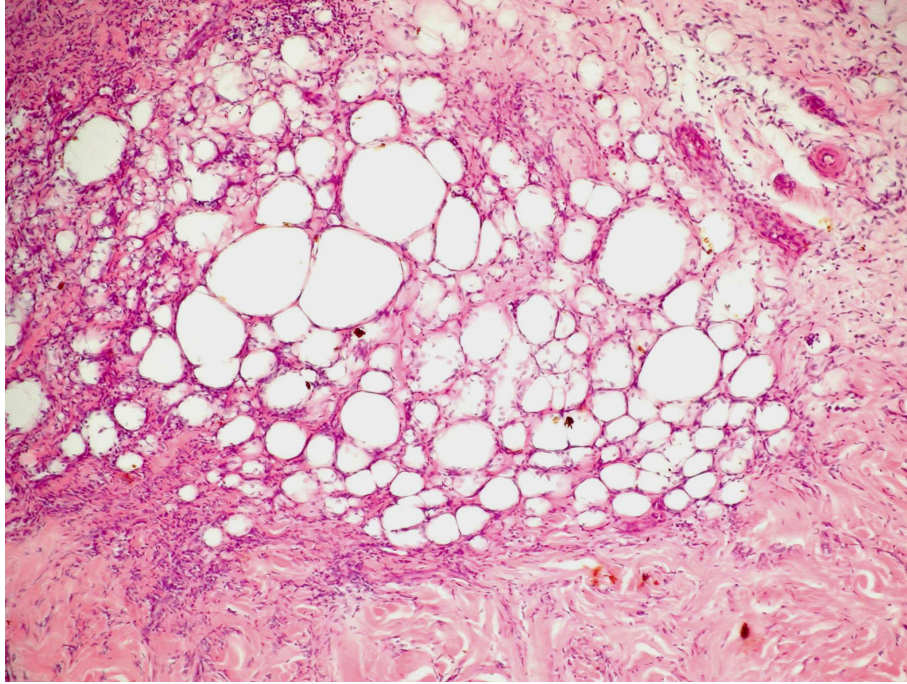


Рис. 5.7. Велика кількість збільшених в розмірах судин капілярного типу в грануляційній тканині (контрольна група, 14 доба). Забарвлення гематоксиліном і еозином. Зб. X100

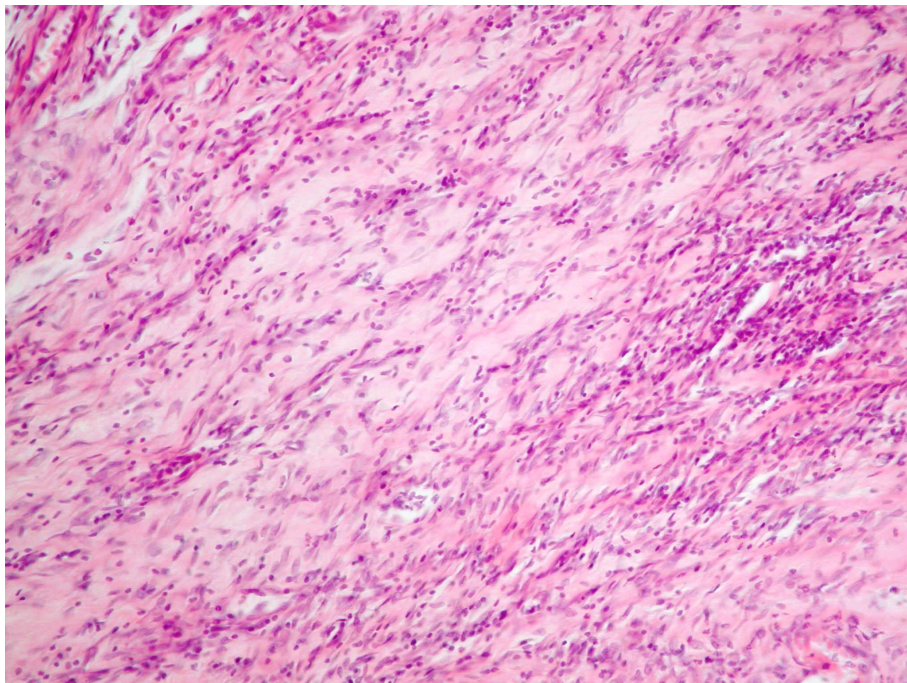


Рис. 5.8. Поліморфна клітинна інфільтрація в дермі, яка оточує рановий дефект (контрольна група, 14 доба). Забарвлення гематоксиліном і еозином. Зб. X200



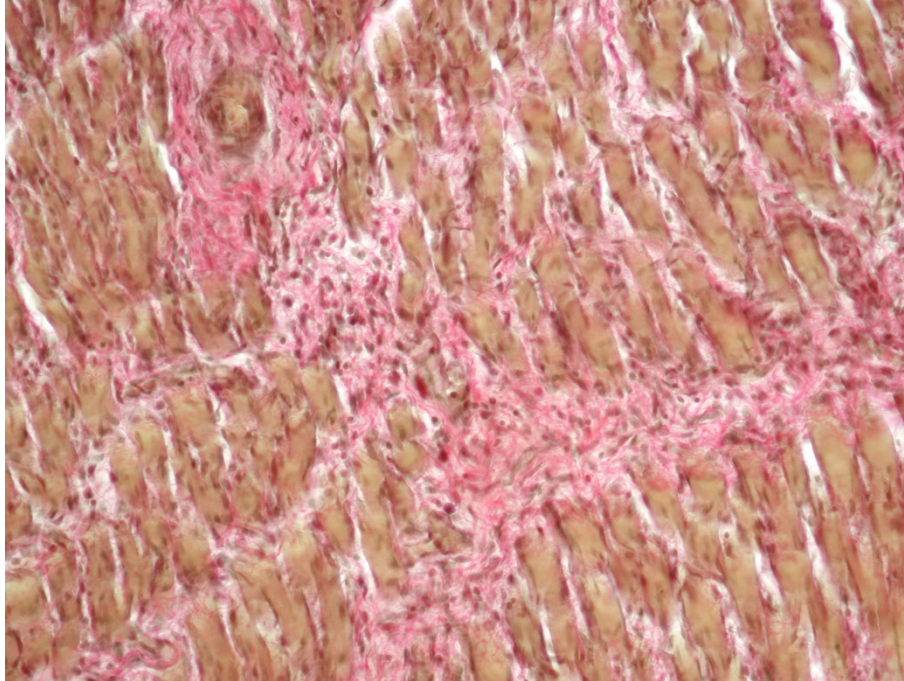


Рис. 5.9. Поліморфна клітинна інфільтрація в стромі поперечно-м'язової тканини (контрольна група, 14 доба). Забарвлення пікрофуксином за Ван-Гізоном. Зб.  $\times 200$ .

При гістологічному дослідженні на 21 добу експерименту визначався рановий дефект, крайові відділи якого були покриті потовщеним багатошаровим плоским епітелієм. У частині полів зору епітеліальний пласт утворював акантотичні розростання (рис. 5.10). Середнє значення товщини епітеліального пласта в крайових відділах складало  $(39,6 \pm 5,9)$  мкм, що достовірно вище за показники в інтактній групі.

Поверхня ранового дефекту була вкрита тонким шаром некротизованих тканин – зона первинного некрозу  $(579,9 \pm 93,5)$  мкм, за яким слідував демаркаційний лейкоцитарний вал  $(94,6 \pm 24,3)$  мкм.

Наступний шар – зона вторинного некрозу (шар некротизованих тканин), середнє значення товщини якого складало  $(203,3 \pm 18,0)$  мкм. За некротизованими тканинами визначалися великі поля грануляційної тканини, в якій місцями переважав волокнистий компонент над клітинним і судинним,

місцями – клітинний і судинний компоненти над волокнистим. В середньому товщина шару грануляційної тканини дорівнювала  $(541,8 \pm 131,4)$  мкм.

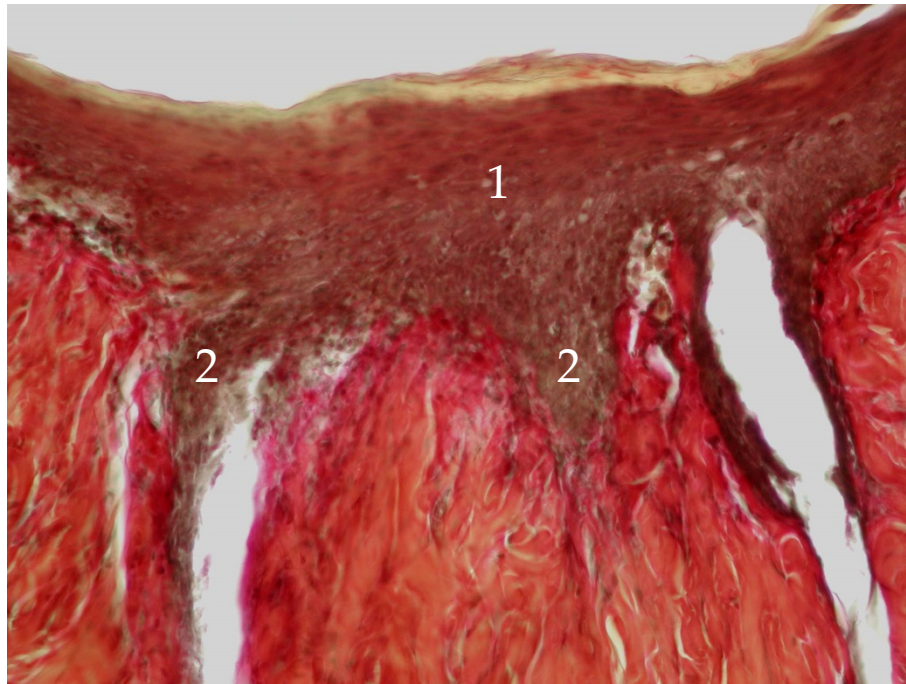


Рис. 5.10. Потовщений епітеліальний пласт (1) утворює акантотичні розростання (2) у підлеглу тканину (контрольна група, 21 доба). Забарвлення пікрофуксином за Ван-Гізоном. Зб. X200

У більшості полів зору в грануляційній тканині визначалася виражена волокниста строма, що місцями була представлена тонкими, місцями потовщеними хаотично розташованими колагеновими волокнами сполучної тканини, що мали червоний колір при фарбуванні пікрофуксином за Ван-Гізоном (рис. 5.11) і синій колір при фарбуванні по Маллорі. У проміжках між волокнистими структурами розташовувалися поодинокі судини капілярного типу і клітинні елементи, представлені одиничними лімфоцитами, макрофагами і значною кількістю клітин фібробластичного диферону, які в основному були орієнтовані своєю довгою віссю паралельно пучків колагенових волокон. Також були виявлені поодинокі поля зору, де визначалася грануляційна тканина з високою щільністю розташування судин капілярного типу, що мали місцями невеликий, місцями крупний калібр, і

поліморфних клітинних елементів, що складались з поодиноких лімфоцитів, макрофагів і клітин фібробластичного ряду.

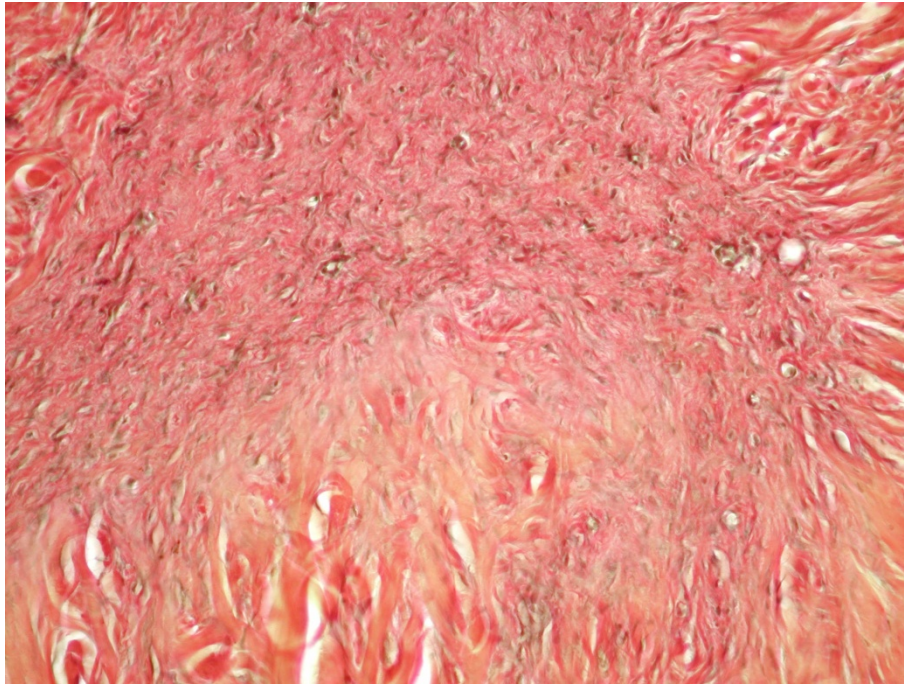


Рис. 5.11. Грануляційна тканина з підлеглою сполучною тканиною (контрольна група, 21 доба). Забарвлення пікрофуксином за Ван-Гізоном. Зб. X200

Тобто, у різних експериментальних тварин грануляційна тканина, що заповнювала рановий дефект, відрізнялась за ступенем зрілості, чим і пояснюється досить велике значення стандартного відхилення середнього товщини шару грануляційної тканини в цілому по групі контролю. Також під час гістологічного дослідження іноді за грануляційною тканиною визначався шар (рис. 5.11), що складалася з потовщених, безладно розташованих волокон сполучної тканини, забарвлених пікрофуксином за Ван-Гізоном у червоний, місцями у темно червоний колір. Визначалося вrostання колагенових волокон грануляційної і сполучної тканин у тканину дерми та гіподерми з підлеглою м'язовою тканиною, що оточували рановий дефект.

У навколишніх з рановим дефектом тканинах дерми (рис. 5.12) та гіподерми з підлеглою м'язовою тканиною була виявлена незначна



вогнищева поліморфна клітинна інфільтрація, що складалася з одиничних лейкоцитів, лімфоцитів, макрофагів і клітин фібробластичного диферону.

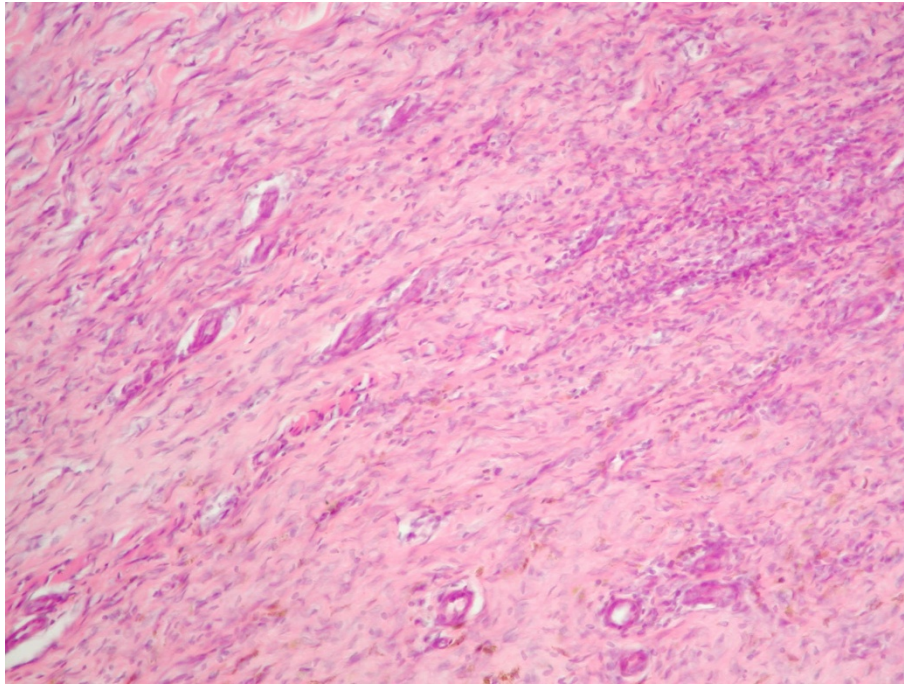


Рис. 5.12. Поліморфна клітинна інфільтрація тканини дерми навколо ранового дефекту (контрольна група, 21 доба). Забарвлення гематоксиліном і еозином. Зб. Х200

### **5.2.2. Гістологічна картина ран у тварин після кріодеструкції шкіри і введення ЕКФШП**

При морфологічному дослідженні мікропрепаратів шкіри з підлеглими м'якими тканинами щурів групи з кріодеструкцією шкіри та введенням ЕКФШП (група кріодеструкція + ЕКФШП) на 7 добу експерименту було відзначено наявність великого і глибокого ранового дефекту, що доходив до дерми, а місцями і гіподерми (рис. 5.13). По краях ранового дефекту визначався багатошаровий плоский епітелій з гіперпластичними процесами, що приводило до потовщення епітеліального пласта в цих відділах. Середнє значення товщини епітеліального шару в крайових відділах було достовірно вище за показники в контрольній групі (кріодеструкція шкіри та введення фізіологічного розчину) в 2,1 рази, відповідно і складало  $(56,1 \pm 11,1)$  мкм.

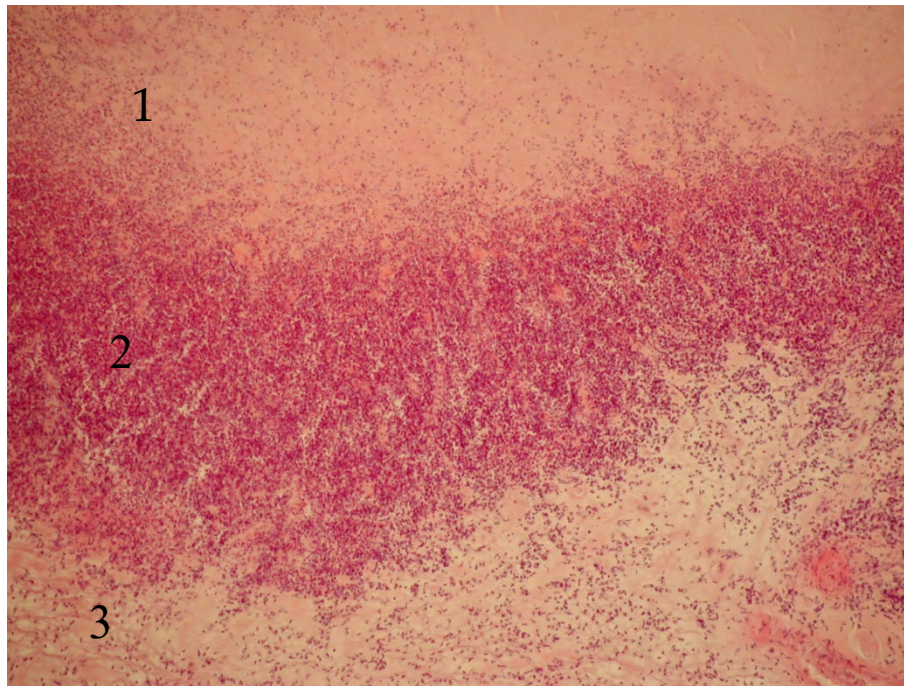


Рис. 5.13. Шар первинного некрозу (1), демаркаційний лейкоцитарний вал (2), шар вторинного некрозу (3) (група кріодеструкція + ЕКФШП, 7 доба). Забарвлення гематоксиліном і еозином. Зб. X100

Рановий дефект за будовою був схожим з рановими дефектами, виявленими в групі контролю, і характеризувався багатошаровою будовою. Поверхневий шар складався з некротично змінених тканин (шар первинного некрозу), оточений демаркаційним лейкоцитарним валом, за яким слідував шар вторинного некрозу. Наступний шар був представлений грануляційною тканиною, яка характеризувалася наявністю поліморфної клітинної інфільтрації, що складалася з безлічі лейкоцитів, лімфоцитів, макрофагів, клітин фібробластичного ряду, нечисленних волокон сполучної тканини і дрібних судин капілярного типу.

У навколишніх з рановою порожниною тканинах дерми та гіподерми з підлеглою м'язовою тканиною виявлялися помірні ознаки порушення кровообігу (повнокров'я судин, дрібновогнищеві крововиливи), набряку, а також місцями велика, місцями помірна клітинна інфільтрація, що складалася з безлічі лейкоцитів, лімфоцитів, макрофагів, клітин

фібробластичного ряду. Також в м'язових волокнах були виявлені помірні дистрофічні зміни.

При морфометричному дослідженні препаратів даної групи було відзначено, що у порівнянні з групою контролю середнє значення товщини шару первинного і вторинного некрозів було в 1,2 разі нижче і дорівнювало  $(1617,2 \pm 231,0)$  і  $(397,8 \pm 68,9)$  мкм, відповідно; середнє значення товщини шару грануляційної тканини навпаки, було в 1,9 рази вище і складало  $(275,5 \pm 40,4)$  мкм. Середнє значення товщини демаркаційного лейкоцитарного валу не відрізнялось від аналогічного показника в контрольній групі і дорівнювало  $(331,4 \pm 82,7)$  мкм;

Під час гістологічного дослідження на 14 добу експерименту визначався рановий дефект, в крайових відділах якого було виявлено потовщений епітеліальний пласт, який наповзав на грануляційну тканину, при цьому в 40% випадків епітеліальний пласт утворював неглибокі акантотичні розростання в підлеглу грануляційну тканину (рис. 5.14, 5.15).

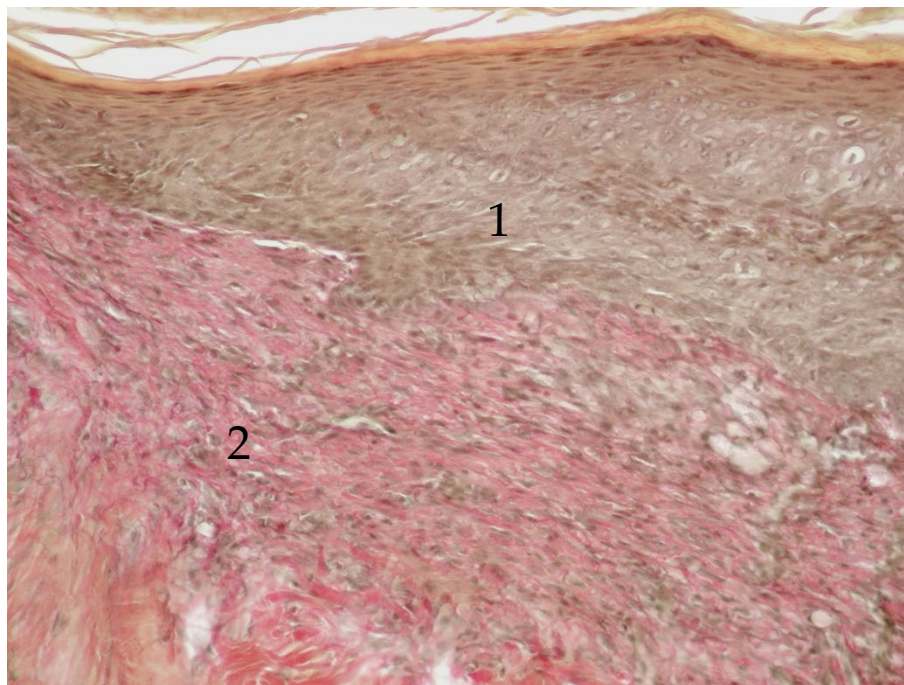


Рис. 5.14. Потовщений епітеліальний пласт (1) наповзає на грануляційну тканину (2). (група кріодеструкція + ЕКФШП, 7 доба). Забарвлення пікрофуксином за Ван-Гизон. Зб. Х200



Середнє значення товщини епітеліального пласта в крайових відділах рани дорівнювало  $(65,4 \pm 9,3)$  мкм, що більше за середнє значення в групі контролю в 2,0 рази.

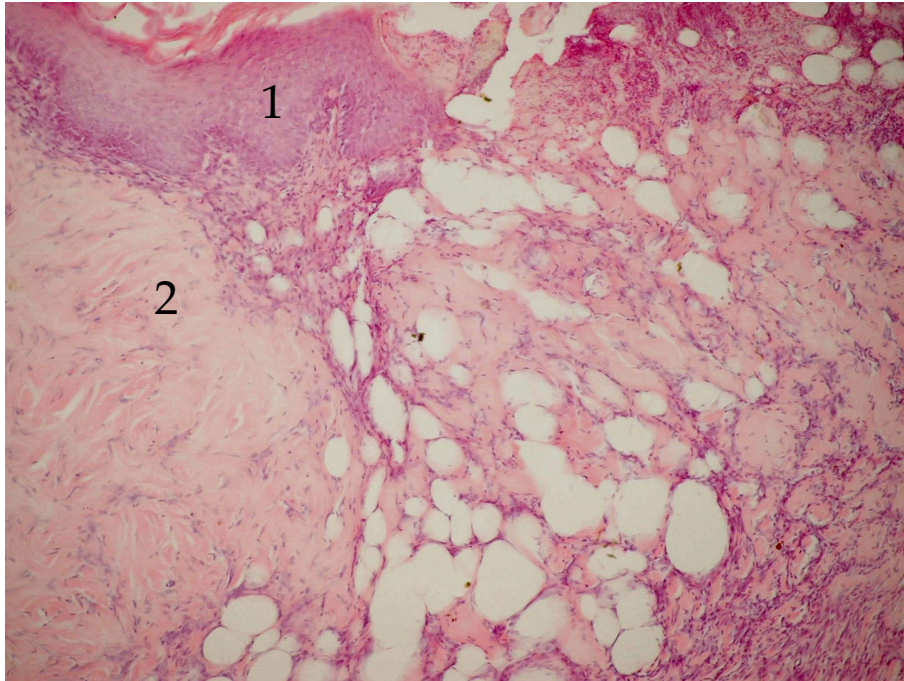


Рис. 5.15. Потовщений епітеліальний пласт(1) наповзає на грануляційну тканину (2). (група кріодеструкція + ЕКФШП, 7 доба). Забарвлення гематоксиліном і еозином. Зб. X100

Як і на попередньому терміні спостереження, в даній групі ранова порожнина характеризувалася багатошаровою структурою. Самий верхній великий шар був представлений некротичними масами (некротично змінені тканини епідермісу, дерми, а місцями і гіподерми) – зона первинного некрозу. Порівняно з контрольною групою середнє значення товщини цього шару було достовірно нижче в 1,2 рази і складало  $(1331,0 \pm 148,9)$  мкм. До шару первинного некрозу прилягав місцями помірно виражений, місцями виражений демаркаційний лейкоцитарний вал. В деяких полях зору відзначалися ознаки відторгнення зони первинного некрозу місцями з прилеглими фрагментами демаркаційного лейкоцитарного валу, чого не спостерігалось в групі контролю. Проте, середнє значення товщини

демаркаційного лейкоцитарного валу, як і на попередній строк спостереження не відрізнялось від аналогічного показника в контрольній групі і складало  $(277,8 \pm 37,1)$  мкм.

Середнє значення товщини наступного шару некротично змінених тканин – зони вторинного некрозу було в 1,3 рази нижче за відповідний показник в групі контролю і дорівнювало  $(292,6 \pm 16,1)$  мкм.

За шаром вторинного некрозу на 14 добу експерименту визначалася грануляційна тканина, що характеризується різною будовою (рис. 5.16).

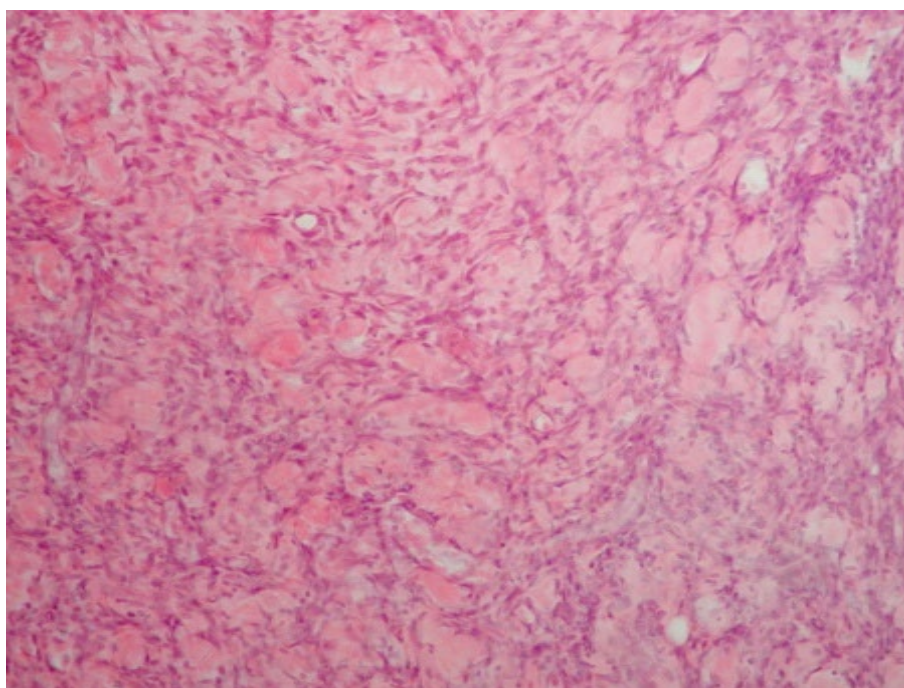


Рис. 5.16. Грануляційна тканина, що заповнює рановий дефект (група кріодеструкція + ЕКФШП, 14 доба). забарвлення гематоксилином і еозином; Зб.  $\times 200$

Так, місцями грануляційна тканина характеризувалася значним вмістом судин капілярного типу різного діаметру і клітинною інфільтрацією, в якій визначалося багато клітин фібробластичного диферону, макрофагів, лімфоцитів з незначною кількістю лейкоцитів. У деяких відділах рани грануляційна тканина характеризувалася не тільки наявністю значної кількості судин і клітинної інфільтрації, а й активацією процесів утворення її



волокнистого компонента. Серед волокон грануляційної тканини переважали колагенові волокна, які мали синій колір при фарбуванні по Маллорі. Середнє значення товщини шару грануляційної тканини склало  $(369,0 \pm 19,1)$  мкм, що в 1,8 рази більше у порівнянні з контрольною групою.

У навколишніх з рановим дефектом тканинах визначалася помірно виражена вогнищева клітинна інфільтрація, що складалася з клітин фібробластичного диферону, лейкоцитів, лімфоцитів і макрофагів (в більшості випадків серед клітинного компонента було виявлено переважання клітин фібробластичного ряду).

Під час гістологічного дослідження на 21 добу експерименту різні структурні зміни в області ранового дефекту були виявлені в усіх випадках (рис. 5.17). Проте, типова пошарова будова зберігалася (шар первинного некрозу, зона демаркаційного лейкоцитарного валу, шар вторинного некрозу і шар грануляційної тканини).

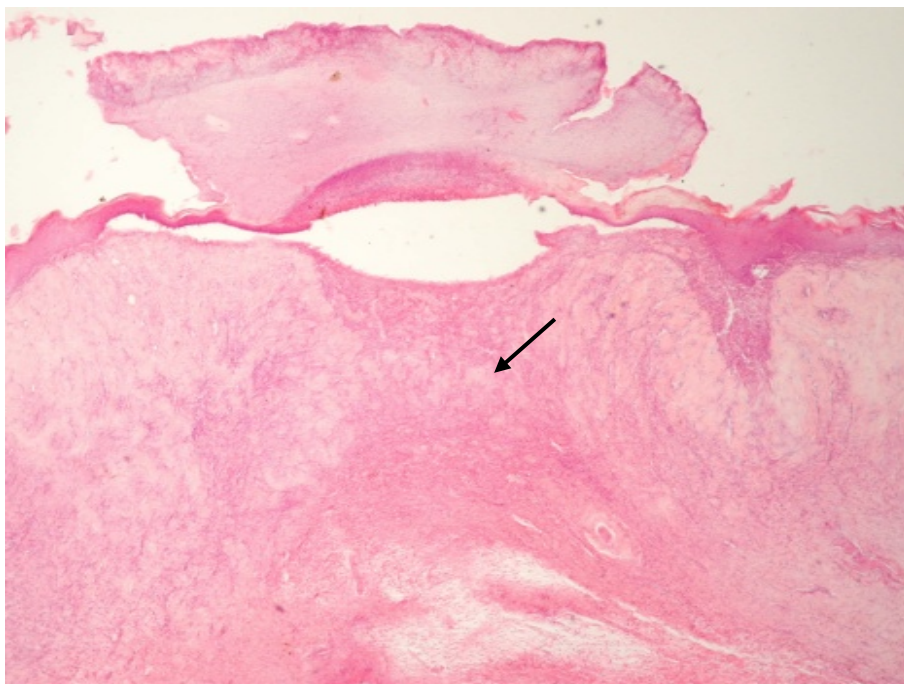


Рис. 5.17. Грануляційна тканина, що заповнює рановий дефект (стрілка) (група кріодеструкція + ЕКФШП, 21 доба). Забарвлення гематоксилином і еозином. Зб.  $\times 200$

Середнє значення товщини шару первинного некрозу склало  $(487,4 \pm 16,6)$  мкм і не мало достовірних відмінностей порівняно з даними у тварин групи контролю. По краях порожнина ранового дефекту була заповнена грануляційною тканиною, по поверхні якої зазначалося заповзання епідермісу. Епітеліальний пласт, що покривав грануляційну тканину, був потовщеним і утворював нечисленні акантотичні розростання в підлеглу тканину. Товщина епітеліального пласта у крайових відділах дорівнювала  $(85,4 \pm 12,0)$  мкм, що в 2,2 рази більше аналогічного показника в групі контролю. Грануляційна тканина характеризувалася наявністю клітинного, судинного і волокнистого компонентів, при цьому у більшості полів зору визначалося переважання волокнистого компонента над судинним і клітинним. Середнє значення товщини шару демаркаційного лейкоцитарного валу перевищувало показник контрольної групи в 1,7 рази і складало  $(162,8 \pm 15,5)$  мкм. Товщина шару вторинного некрозу була в 1,2 рази нижче ніж у тварин, яким замість лікування вводили фізіологічний розчин дорівнювало  $(171,8 \pm 10,6)$  мкм. Середнє значення товщини шару грануляційної тканини складало  $(668,0 \pm 18,9)$  мкм і не мало достовірних відмінностей від аналогічного показника в групі контролю. Слід зазначити, що в цій групі тварин було виявлено ознаки формування придатків шкіри в області регенерату.

### **5.2.3. Гістологічна будова ран у тварин після кріодеструкції шкіри і введення ВКРФ С<sub>60</sub>**

При дослідженні морфологічних особливостей шкіри з підлеглими м'якими тканинами щурів із кріодеструкцією та введенням ВКРФ С<sub>60</sub> на 7 добу у всіх випадках визначався значний рановий дефект, який доходив до дерми, а місцями і до гіподерми (рис. 5.18). В епідермісі, що локалізувався у прикордонних з дефектом ділянках, відзначалися гіперпластичні процеси, що приводило до потовщення епітеліального пласта. Середнє значення товщини епітеліального пласта у прикордонних з рановим дефектом ділянках складало

( $69,9 \pm 11,6$ ) мкм і було достовірно вище ніж в контролі (в 2,6 рази) і після введення екстрактів (в 1,3 рази).

Рановий дефект в досліджуваних фрагментах тканин характеризувався багатошаровою будовою. Самий верхній, досить великий шар (зона первинного некрозу), був представлений тканинним детритом (некротично змінені фрагменти епідермісу, дерми, а місцями і гіподерми), середнє значення товщини якого складало ( $1497,0 \pm 257,6$ ) мкм, що в 1,3 рази нижче ніж в контролі. Достовірних відмінностей порівняно з показниками після введення ЕКФШП не зафіксовано. За зоною первинного некрозу розташовувався демаркаційний лейкоцитарний вал, середнє значення товщини якого складало ( $476,6 \pm 106,6$ ) мкм, що в 1,4 рази вище ніж після введення ЕКФШП. Достовірних відмінностей з аналогічним показником в групі без лікування (контролю) не виявлено.

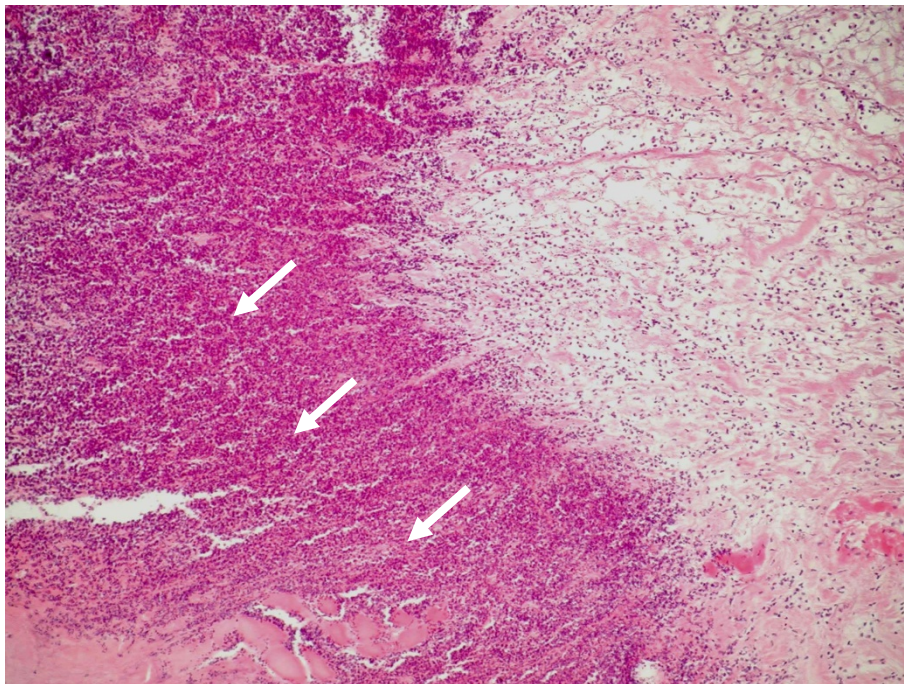


Рис. 5.18. Виразений демаркаційний лейкоцитарний вал (стрілки) (група з кріодеструкція + введення ВКРФ С<sub>60</sub>, 7 доба). Забарвлення гематоксиліном і еозином. Зб. X100

За зоною демаркаційного запалення визначався місцями виражений, місцями помірно виражений шар некротично змінених тканин дерми і гіподерми (зона вторинного некрозу). Середнє значення товщини цього шару складало  $(341,3 \pm 55,3)$  мкм і було нижче показників в контролі і після введення екстрактів в 1,4 і 1,2 рази відповідно.

Наступний шар був представлений грануляційною тканиною, ступінь зрілості якої варіював на різних ділянках дефекту. Центральна частина дефекту була заповнена грануляційною тканиною, яка характеризувалася наявністю нечисленних судин капілярного типу і волокнистих структур, а також поліморфно-клітинної інфільтрації, що складалася з безлічі лейкоцитів, лімфоцитів, макрофагів, клітин фібробластичного ряду (рис. 5.19).

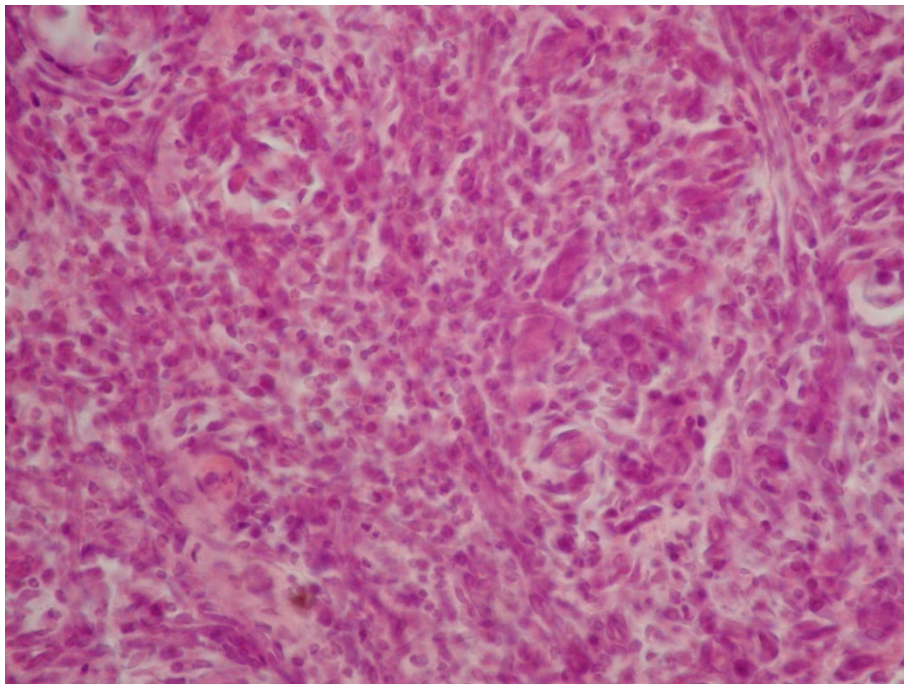


Рис. 5.19. Грануляційна тканина, що заповнює центральну частину ранового дефекту (група з кріодеструкція + введення ВКРФ С<sub>60</sub>, 7 доба). Забарвлення гематоксиліном і еозином. Зб. Х400

У нижніх відділах дефекту, а також на бічних його сторонах (рис. 5.20) в грануляційній тканині серед клітинних елементів відзначалося зменшення



кількості лейкоцитів і збільшення кількості лімфоцитів, макрофагів, клітин фібробластичного ряду. Також в грануляційній тканині визначалися помірні ознаки фіброзоутворення. Новостворені волокна розташовувалися хаотично і забарвлювалися пікрофуксином за Ван-Гізоном у червоний колір, а по Маллорі – у синій. Середнє значення товщини шару грануляційної тканини склало  $(335,0 \pm 35,4)$  мкм і перевищувало значення в контролі і після введення екстрактів в 2,3 і 1,2 рази, відповідно.

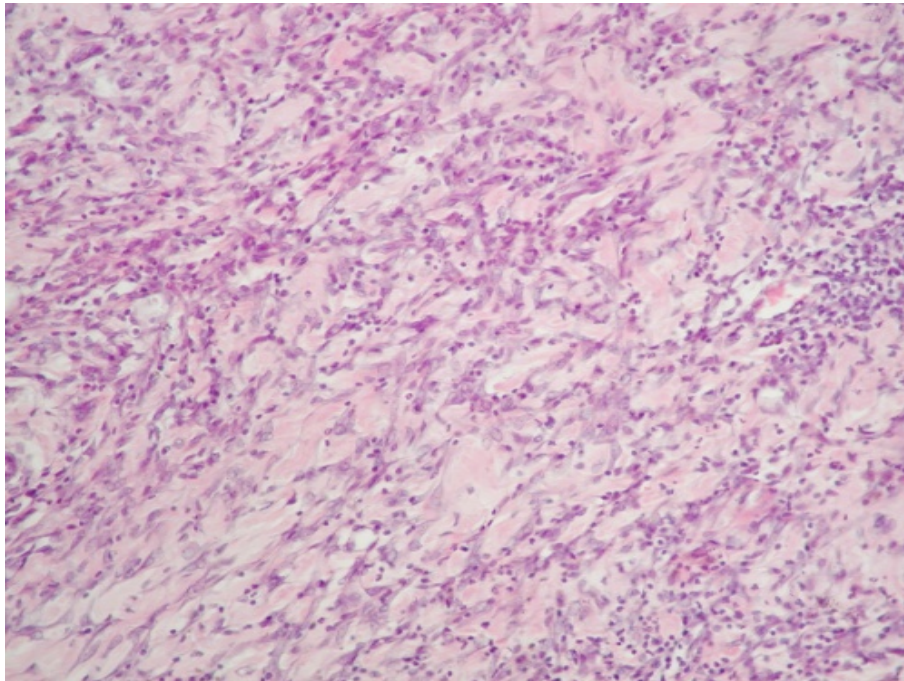


Рис. 5.20. Грануляційна тканина, що заповнює нижні і крайові відділи ранового дефекту (група з кріодеструкція + введення ВКРФ С<sub>60</sub>, 7 доба). забарвлення гематоксиліном і еозином;. Зб. X200

У прилеглій до ранового дефекту тканині дерми та гіподерми з підлеглою м'язовою тканиною визначалися помірні ознаки порушення кровообігу, представлені повнокров'ям судин, дрібновогнищевими крововиливами і набряком. Також у прилеглих тканинах виявлялася місцями помірна (рис. 5.21), місцями виражена (рис. 5.22) клітинна інфільтрація, що складалася з лейкоцитів, лімфоцитів, макрофагів і клітин фібробластичного ряду.

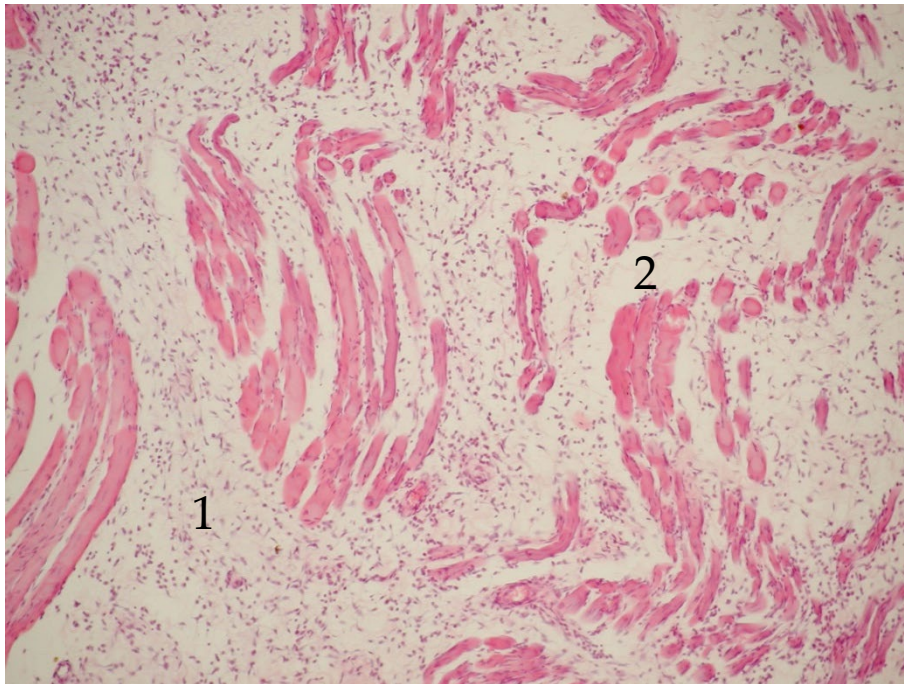


Рис. 5.21. Поперечно-м'язова тканина підлягаюча до ранового дефекту. Помірна клітинна інфільтрація (1) і помірні ознаки набряку (2) (група з кріодеструкція + введення ВКРФ С<sub>60</sub>, 7 доба). Зabarвлення гематоксиліном і еозином. Зб. X100

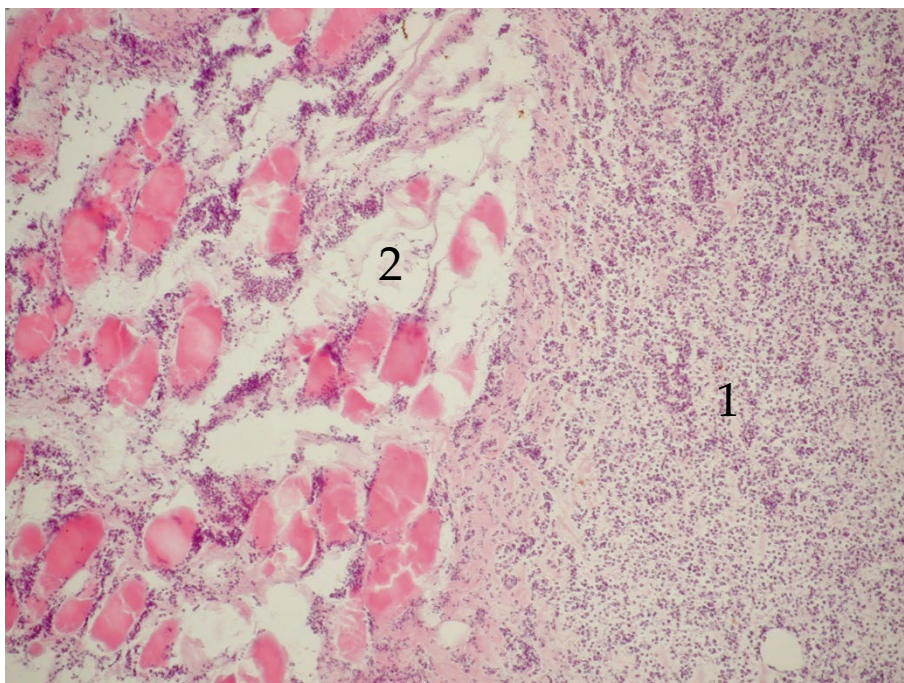


Рис. 5.22. Виражена клітинна інфільтрація (1) і ознаки набряку (2) в навколишніх з рановим дефектом тканин (група з кріодеструкція + введення ВКРФ С<sub>60</sub>, 7 доба).. Зabarвлення гематоксиліном і еозином. Зб. X100



По мірі віддалення від ранового дефекту ознаки порушення кровообігу і набряку, клітинна інфільтрація зменшувалися.

Під час гістологічного дослідження на 14 добу експерименту у всіх випадках даної групи було відзначено потовщення епідермісу у крайових відділах, що оточували рановий дефект. Середнє значення товщини епітеліального пласта дорівнювало ( $84,3 \pm 13,3$ ) мкм, що було достовірно вище за показники в контролі і після введення екстрактів, відповідно в 2,6 і 1,3 рази. На тлі потовщення епітеліального пласта визначалося поступове просування епідермісу з країв рани на грануляційну тканину (рис. 5.25).

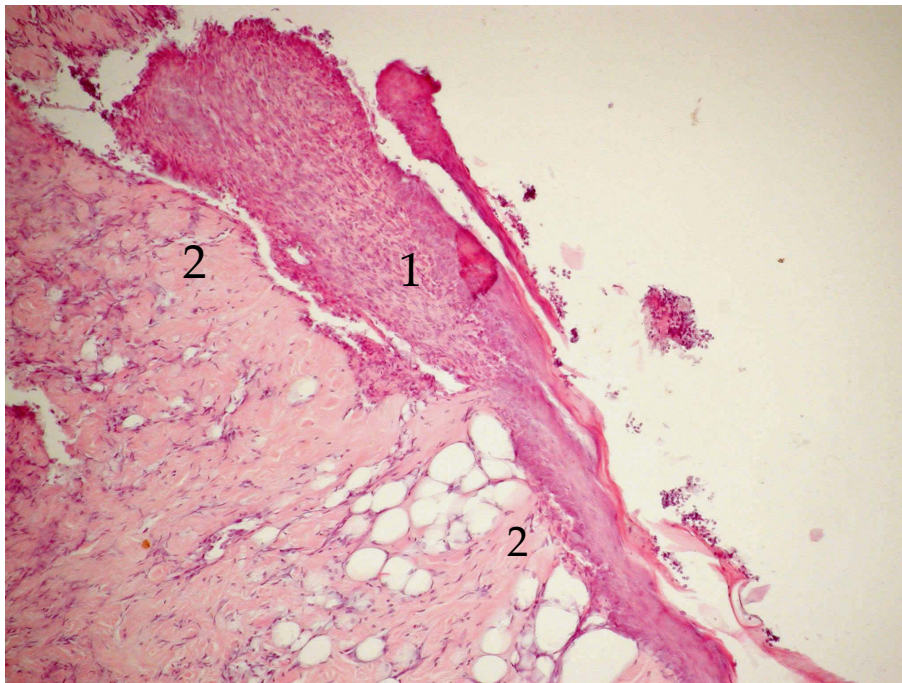


Рис. 5.23. Епідерміс (1) поступово просувається з країв рани, лягаючи на грануляційну тканину(2). (група з кріодеструкція + введення ВКРФ С<sub>60</sub>, 14 доба). Забарвлення гематоксилином і еозином. Зб. X100

Поверхня ранового дефекту була покрита шаром некротично змінених тканин – зона первинного некрозу (рис. 5.24), середнє значення товщини якого складало ( $1202,9 \pm 192,9$ ) мкм і було в 1,3 раз нижче за аналогічний показник в контролі. Достовірних відмінностей по відношенню до показника в групі с введенням екстрактів не виявлено.

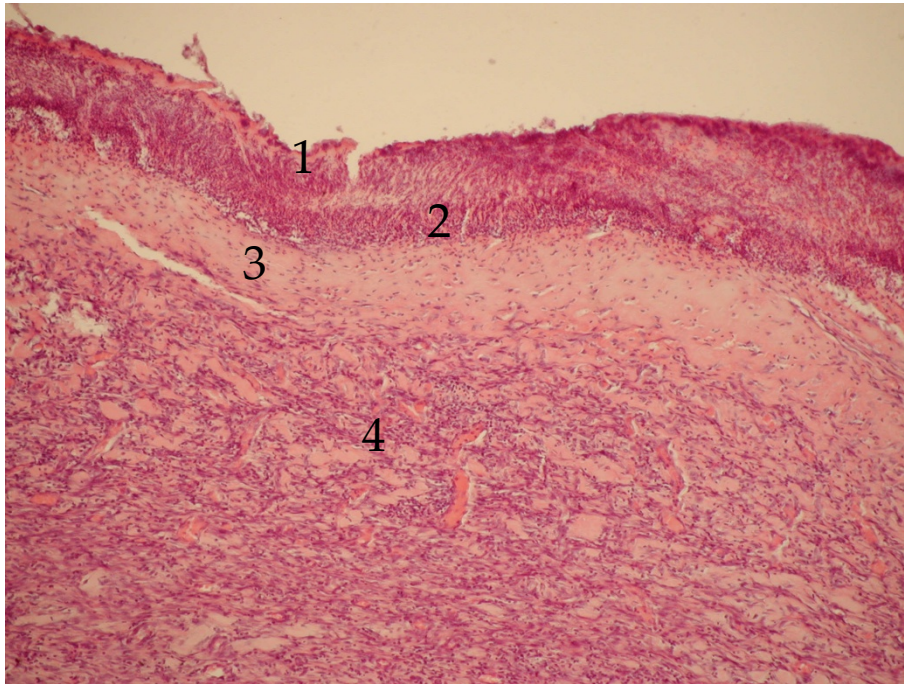


Рис. 5.24. Фрагменти некротизованих тканин (1), демаркаційний лейкоцитарний вал (2), зона вторинного некрозу (3), виражений шар грануляційної тканини (4). (група з кріодеструкція + введення ВКРФ С<sub>60</sub>, 14 доба) Забарвлення гематоксиліном і еозином. Зб. X100

Безпосередньо за шаром некротично змінених тканин слідував демаркаційний лейкоцитарний вал. Середнє значення товщини даного шару склало  $(342,4 \pm 85,9)$  мкм, що в 1,4 і 1,2 рази перевищувало показники в контролі і після введення екстрактів, відповідно.

За зоною демаркаційного запалення визначався тонкий шар некротично змінених тканин (зона вторинного некрозу), середнє значення товщини якого склало  $(260,1 \pm 42,3)$  мкм, що в 1,5 рази нижче за показники в контролі. Достовірних відмінностей значень в групах з введенням ВКРФ С<sub>60</sub> і ЕКФСШП не зафіксовано.

За зоною вторинного некрозу визначався виражений шар грануляційної тканини, яка мала різну будову (рис. 5.25). У більш поверхневих відділах грануляційна тканина характеризувалася наявністю поліморфної клітинної інфільтрації, що складалася з одиничних лейкоцитів, незначної кількості



лімфоцитів, макрофагів і великої кількості клітин фібробластичного ряду. В грануляційній тканині визначалися місцями дрібні, місцями більшого розміру судини капілярного типу, що мали місцями округлу, місцями витягнуту форму та розташовувалися як вертикально, так і горизонтально. Також в грануляційній тканині відзначалися тонкі, ніжні, не упорядковано розташовані волокна сполучної тканини, що місцями склалися у пучки і мали червоний колір при фарбуванні пікрофуксином за Ван-Гізоном та синій колір при фарбуванні по Маллорі.

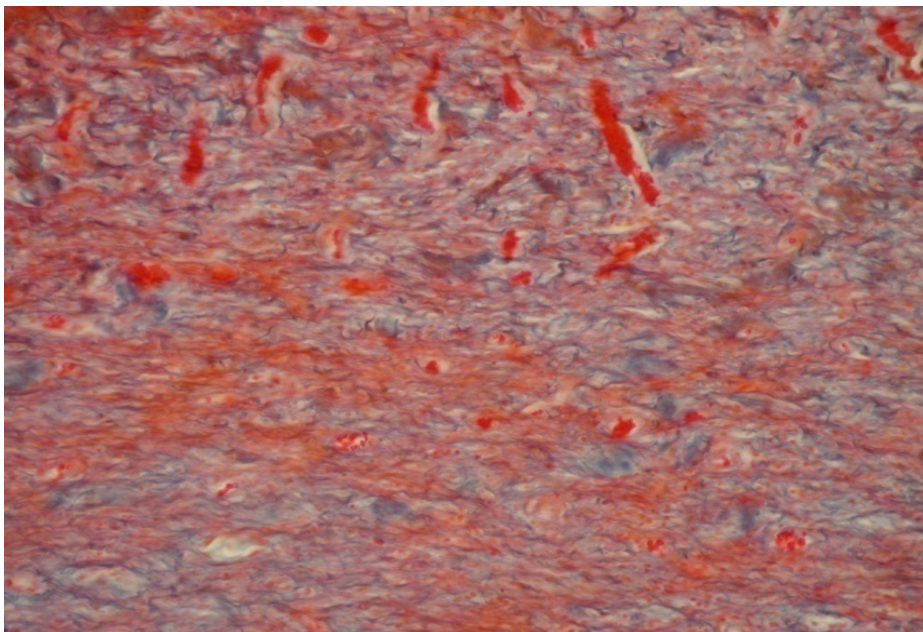


Рис. 5.25. Грануляційна тканина (перехід поверхневих відділів в більш глибокі) (група з кріодеструкція + введення ВКРФ С<sub>60</sub>, 21 доба). Забарвлення по Маллорі. Зб. X200

У більш глибоких відділах грануляційної тканини (у порівнянні з поверхневими відділами) відзначалося зменшення клітинного компонента (переважно за рахунок лейкоцитів) і значне збільшення волокнистого компонента, представленого переважно колагеновими волокнами, розташованими паралельно поверхні дефекту. Колагенові волокна проникали у вигляді пучків у навколишні тканини дерми і гіподерми. Також було відзначено зниження щільності розташування судин у більш глибоких

відділах грануляційної тканини порівняно з поверхневими відділами. Середнє значення товщини шару грануляційної тканини в даній групі складало  $(441,9 \pm 49,2)$  мкм, що достовірно вище показників в контролі і після введення екстрактів в 2,2 і 1,2 рази, відповідно. У навколишніх з рановим дефектом м'яких тканинах будь-яких загально-патологічних процесів не було виявлено.

Під час гістологічного дослідження на 21 добу експерименту у всіх випадках даної групи була виявлена типова пошарова будова рани в зоні кріодеструкції шкіри (шар первинного некрозу, зона демаркаційного лейкоцитарного валу, шар вторинного некрозу і шар грануляційної тканини). В епідермісі, що локалізувався у прикордонних з дефектом ділянках, відзначалися гіперпластичні процеси, що приводили до потовщення епітеліального пласта. В крайових відділах визначалися акантотичні розростання і просування епідермального пласта на сформовану грануляційну тканину (рис. 5.26).

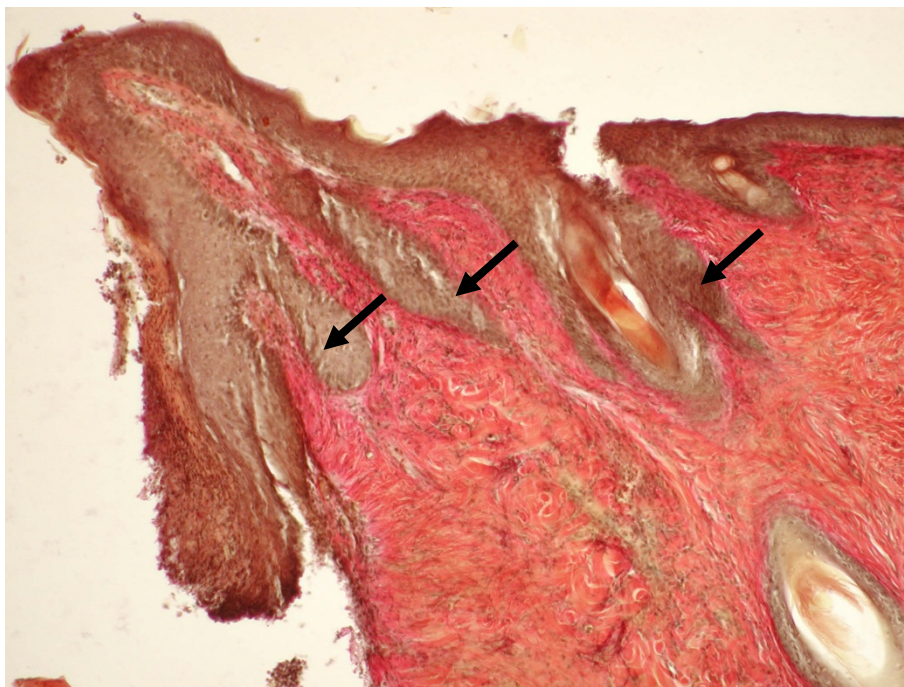


Рис. 5.26 Акантотичні розростання (стрілки) у крайових відділах і проникнення епітеліального пласта під шар некротично змінених тканин. (група кріодеструкція + введення ВКРФ С<sub>60</sub>, 21 доба). Забарвлення пікрофуксином за Ван-Гізоном. Зб.  $\times 100$

Середнє значення товщини епітеліального пласта у прикордонних з рановим дефектом ділянках складало  $(98,1 \pm 10,7)$  мкм, що було в 2,5 рази вище за значення в контролі. Достовірних відмінностей між показниками в групах з введенням фулеренів і екстрактів не було.

Епітеліальний пласт, що розташовується на поверхні регенерату, був потовщеним, з вогнищами гіперпроліферації і формуванням як неглибоких, так і глибоких акантотичних розростань в підлеглу тканину (рис. 5.27). У частині акантотичних розростань були виявлені ознаки помірної дисплазії (рис. 5.28).

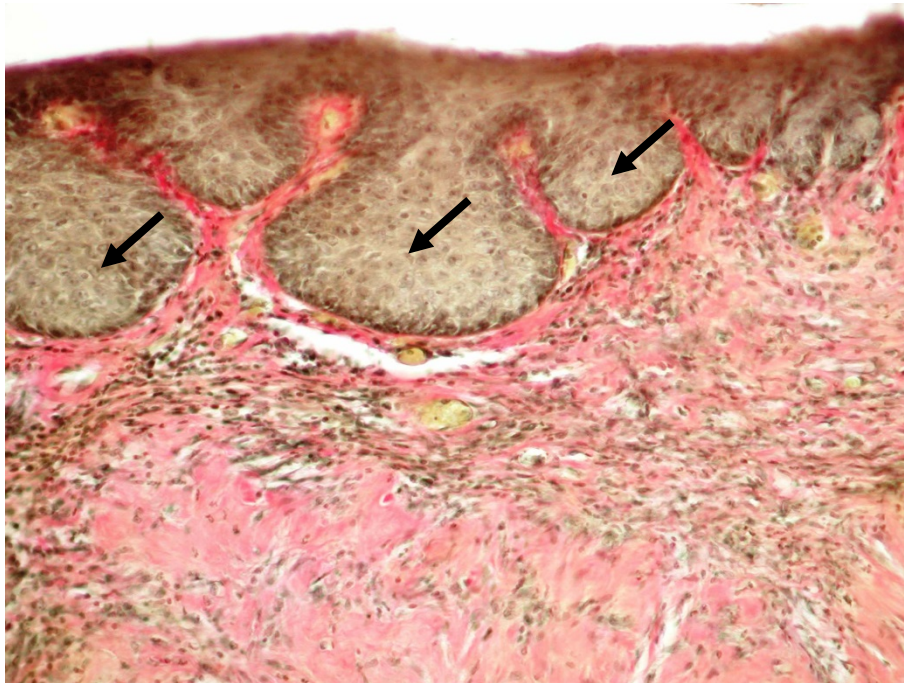


Рис. 5.27. Епітеліальний пласт утворює акантотичні розростання (стрілки). (група з кріодеструкція + введення ВКРФ  $C_{60}$ , 21 доба). Забарвлення пікрофуксином за Ван-Гізоном. Зб. X200

Середнє значення товщини зони первинного некрозу складало  $(431,9 \pm 40,7)$  мкм, що було в 1,3 рази нижче за показники в контролі і достовірно не відрізнялось від значень після введення екстрактів.



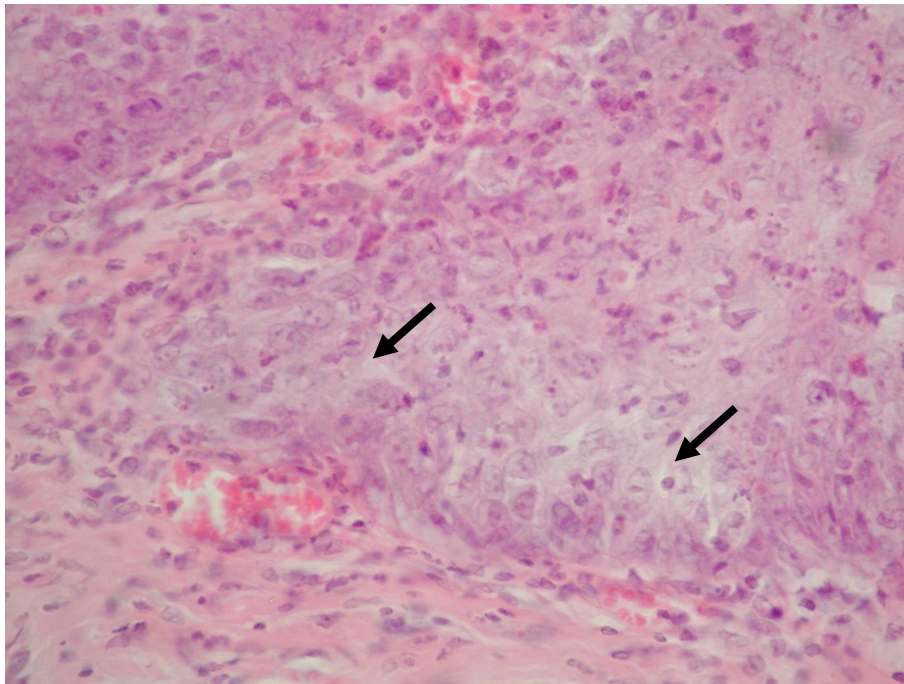


Рис. 5.28. Ознаки помірної дисплазії в акантотичних розростаннях (стрілки). (група з кріодеструкція + введення ВКРФ С<sub>60</sub>, 21 доба) Забарвлення гематоксиліном і еозином. Зб.  $\times 400$

Зону первинного некрозу знизу оточував демаркаційний лейкоцитарний вал середня товщина якого дорівнювала  $(207,1 \pm 67,4)$  мкм, що в 2,2 рази більше ніж значення в контрольній групі. Відмінностей між середньою товщиною демаркаційного лейкоцитарного валу після введення тваринам з кріодеструкцією шкіри ВКРФ С<sub>60</sub> та ЕКФШП відмічено не було. Наступний шар некротично змінених тканин (шар вторинного некрозу) мав середнє значення товщини  $(160,61 \pm 4,93)$  мкм, які не відрізнялися від значень після введення екстрактів. По відношенню до результатів отриманих в контрольній групі зазначений показник був нижче в 1,3 рази.

За зоною вторинного некрозу слідував шар грануляційної тканини, яка мала різну будову у різних відділах регенерату і характеризувалася наявністю значної кількості хаотично розташованих волокон сполучної тканини, що мали червоний колір при фарбуванні пікрофуксином за Ван-Гізеном і синій колір при фарбуванні по Маллорі, а також помірною кількістю судин капілярного типу і поліморфною клітинною інфільтрацією з наявністю

значної кількості клітин фібробластичного ряду, лімфоцитів, макрофагів і поодиноких лейкоцитів. У поверхневих відділах грануляційної тканини (рис. 5.29) клітинний і судинний компоненти були більш вираженими у порівнянні з глибокими відділами.

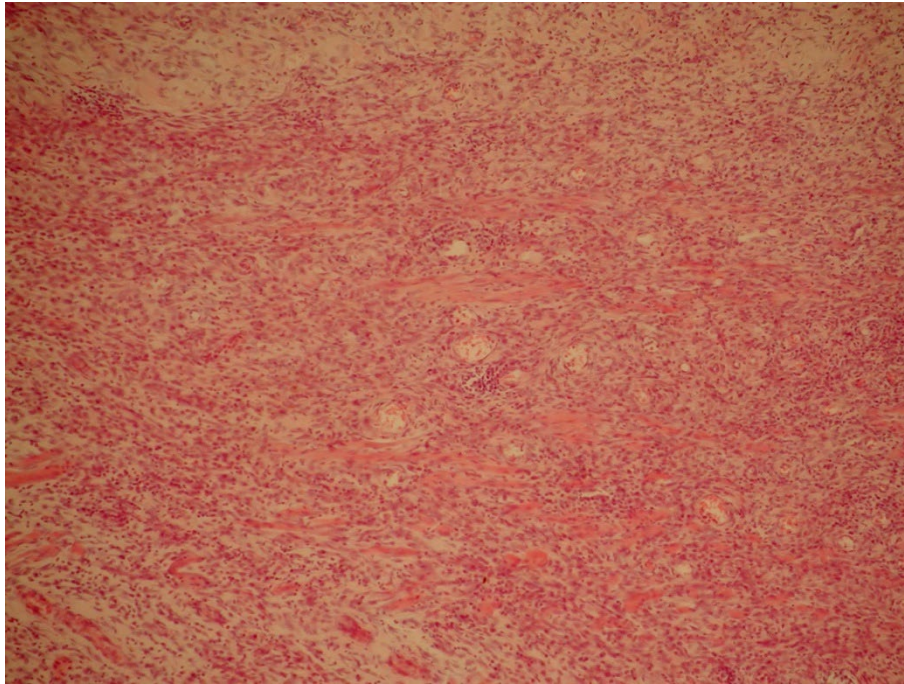


Рис. 5.29. Поверхні відділи грануляційної тканини, що заповнює рановий дефект (група з кріодеструкція + введення ВКРФ С<sub>60</sub>, 21 доба). Зabarвлення гематоксилином і еозином. Зб.  $\times 100$

Судинний компонент характеризувався наявністю місцями дрібних судин капілярного типу з ознаками гіперемії, а місцями – збільшених у розмірах судин капілярного типу. Іноді в грануляційній тканині зазначалося переважання збільшених у розмірах судин капілярного типу, що мали округлу, округло-овальну форму, а в деяких полях зору зазначалося формування судинних порожнин. Клітинний компонент грануляційної тканини характеризувався наявністю клітин фібробластичного диферону, лейкоцитів, лімфоцитів і макрофагів; в більшості випадків серед клітинного компонента визначалося переважання клітин фібробластичного диферону.

Середнє значення товщини шару грануляційної тканини складало  $(776,7 \pm 67,1)$  мкм, що достовірно вище за показники контрольної групи і групи з введенням ЕКФШП в 1,4 і 1,2 рази, відповідно. У більш глибоких відділах грануляційної тканини відзначалося збільшення товщини колагенових волокон (рис. 5.30).

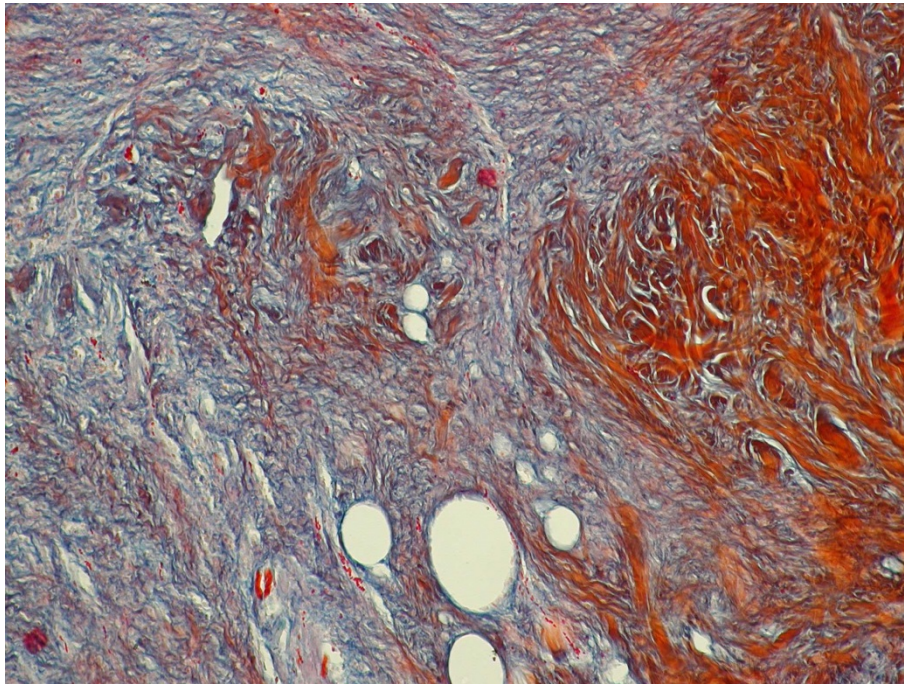


Рис. 5.30. Значна перевага колагенових волокон синього кольору у глибоких відділах регенерату (група кріодеструкція + введення ВКРФ С<sub>60</sub>, 21 доба). Забарвлення по Маллорі. Зб.  $\times 100$

У навколишніх з рановим дефектом тканинах дерми та гіподерми з підлеглими м'язовими тканинами визначалася помірна клітинна інфільтрація, що складалася з клітин фібробластичного диферону, лімфоцитів і макрофагів (у більшості випадків серед клітинного компонента було виявлено переважання клітин фібробластичного диферону).

За шаром грануляційної тканини визначався шар сполучної тканини. Результативність лікування ран визначається якісними і кількісними характеристиками морфологічного еквівалента, що включають структурно-



функціональну оцінку стану шкіри і підлеглих тканин, особливості та тривалість відновного періоду [226].

Слід підкреслити, що на відміну від групи з введенням ЕКФШП, в групі з введенням ВКРФ С<sub>60</sub> придатки шкіри в області регенерату не визначались. Отже, можна стверджувати, що регенерація тканин після введення тваринам з кріодеструкцією шкіри в групі екстрактів є більш органотиповою. Це, в свою чергу, свідчить про кращу «якість» загоювання.

Як відомо, в рановому процесі виділяються три обов'язкові компоненти: пошкодження – запалення – відновлення. Багато вчених у ході ранового процесу виділяють три стадії: 1) травматичне запалення, 2) новоутворення сполучної (грануляційної тканини) та регенерація епітелію, 3) формування і перебудова рубця [255]. При вивченні мікропрепаратів зони кровопливу в усіх групах відзначався великий рановий дефект, який мав багатошарову будову (зона первинного некрозу, демаркаційний лейкоцитарний вал, зона вторинного некрозу, шар грануляційної тканини).

Особливості загоєння шкірних ран залежать від багатьох факторів, у тому числі від їх етіології. При дії низьких температур (кріоушкодження) відзначені більш уповільнені процеси загоєння шкірних ран. Даний факт пояснюють тим, що процес кріодеструкції тканини складається з двох етапів: первинне ушкодження, пов'язане з безпосередньою деструкцією клітин під впливом низької температури, і вторинне ушкодження, обумовлене загибеллю тканин в результаті порушення гемодинаміки [261].

У крайових відділах ранового дефекту усіх груп протягом усього експерименту відзначався потовщений епітелій з ознаками гіперплазії. Реепітелізація рани починається з міграції епітеліальних клітин з країв рани в область тканинного дефекту вже через декілька годин після пошкодження тканини, продовжуючись протягом всіх фаз загоєння рани [22]. Ослаблення міжклітинних контактів і контактів клітин з базальною мембраною, формування периферичних цитоплазматичних актинових філаментів уможливають рух епітеліальних клітин в бік пошкоджених тканин. У міру

просування процесу реепітелізації заново формується базальна мембрана [299]. Відомо, що спочатку в ушкодженому епітелії країв рани відзначається зменшення синтезу дезоксірібонуклеопротейдів і числа мітозів, але вже через 24 години мітотичний індекс і індекс мічених ядер збільшується в кілька разів. Цікаво те, що розміри рани не позначаються на ширині зони мітотичної активності. Інтенсивність проліферації епітелію в області дефектів шкіри непостійна, вона змінюється, підвищуючись і знижуючись через певні проміжки часу. Проліферативна активність епітелію може мати запальний або регенераторний характер [104].

Таким чином, результати проведеного морфометричного дослідження дозволили виявити, що в усіх досліджуваних групах показник середнього значення товщини епітеліального пласта в крайових відділах ран після кріодеструкції був достовірно вищим на норму (інтактні тварини) на протязі всього експерименту (табл. 5.5). Як відомо, регенерація епітелію характеризується трьома взаємопов'язаними процесами: міграцією, проліферацією і диференціюванням клітин. Епітелій, що регенерує, характеризується наявністю гранул глікогену у цитоплазмі, збільшеним вмістом РНП і окислювально-відновних ферментів. По мірі утворення та диференціювання багат шарового епідермального пласта ці якості втрачаються [255].

Ведення експериментальним тваринам ЕКФШП або ВКРФ С<sub>60</sub> супроводжувалось достовірним збільшенням середньої товщини епітеліального пласта по відношенню до значень в контролі (кріодеструкція і введення фізіологічного розчину) у всі терміни спостереження. В той же час на 7 і 14 добу спостереження в групі з введенням ВКРФ С<sub>60</sub> цей показник був достовірно вище ніж в групі з введенням ЕКФШП.

Також при оглядової мікроскопії було відзначено, що епітеліальний пласт в області крайових відділів ранового дефекту або епітеліальний пласт, що покривав поверхню регенерату, утворював акантотичні розростання в підлеглу тканину. Багато вчених, які вивчали морфологічні особливості



загоєння шкірних ран в експерименті, в своїх дослідженнях також відзначали акантотичні розростання. Як відомо, із занурювальним ростом епітелію в пренатальному онтогенезі пов'язано утворення шкірних дериватів, тому поява здатності до утворення випинань у епідермісі, що регенерує, розцінюється багатьма як реалізація морфогенетичних потенцій ранового епідермісу у нових умовах [221].

Таблиця 5.5

Товщина епітеліального пласта шкіри ( $\times 10^{-6}$ м,  $M \pm \sigma$ )

Група	Термін спостереження, доба		
	7	14	21
Інтактні тварини	21,3 $\pm$ 2,9		
Контроль (кріодеструкція + фізрозчин)	26,8 $\pm$ 5,7 <sup>1</sup>	32,9 $\pm$ 6,2 <sup>1</sup>	39,6 $\pm$ 5,9 <sup>1</sup>
Кріодеструкція + ЕКФШП	56,1 $\pm$ 11,1 <sup>1,2</sup>	65,4 $\pm$ 9,3 <sup>1,2</sup>	85,4 $\pm$ 12,0 <sup>1,2</sup>
Кріодеструкція + ВКРФ С <sub>60</sub>	69,9 $\pm$ 11,6 <sup>1,2,3</sup>	84,3 $\pm$ 13,3 <sup>1,2,3</sup>	98,1 $\pm$ 10,7 <sup>1,2</sup>

Примітки. Відмінності статистично достовірні ( $p < 0,05$ ,  $n = 10$ ): 1 – в порівнянні з групою інтактних тварин, 2 – з контролем. 3 – з групою кріодеструкція + ЕКФШП.

Кількість акантотичних розростань епідермісу після кріодеструкції шкіри була помітно більшою у тварин, яким вводили ЕКФШП або ВКРФ С<sub>60</sub>. При цьому, найбільша їх кількість спостерігалася в групі з введенням ВКРФ С<sub>60</sub>. Слід відмітити, що в групі з введенням фулеренів ці розростання були більш глибокими, крім того, у частині полів зору в епідермісі визначалося підвищення мітотичної активності клітин і помірно виражені диспластичні зміни. Одночасна наявність морфологічних ознак дисплазії і підвищеної проліферативної активності клітин є негативною прогностичною ознакою. Якщо допустити, що зазначені зміни епітелію будуть посилюватися, то в

подальшому можливий розвиток вираженої дисплазії, поєднання якої з посиленою проліферацією є характерною особливістю передракових захворювань шкіри.

Під час аналізу товщини шарів ранового дефекту було встановлено, що процеси загоєння ран в контрольній групі (введення фізіологічного розчину) протікали повільніше у порівнянні з групами із введенням ЕКФШП і ВКРФ С<sub>60</sub> на протязі всього експерименту (табл. 5.6).

Таблиця 5.6

Товщина шарів ранового дефекту ( $\times 10^{-6}$ м,  $M \pm \sigma$ )

Група	Показник			
	ЗПН	ДЛВ	ЗВН	ШГТ
	7 доба спостереження			
Контроль (кріодеструкція + фізрозчин)	1975,9±459,2	329,5±162,6	482,7±92,9	148,3±100,0
Кріодеструкція + ЕКФШП	1617,2±231,0 <sup>1</sup>	331,4±82,7	397,8±68,9 <sup>1</sup>	275,5±40,4 <sup>1</sup>
Кріодеструкція + ВКРФ С <sub>60</sub>	1497,0±257,6 <sup>1</sup>	476,6±106,6 <sup>2</sup>	341,3±55,3 <sup>1,2</sup>	335,0±35,4 <sup>1,2</sup>
	14 доба спостереження			
Контроль (кріодеструкція + фізрозчин)	1531,0±306,1	249,8±74,7	393,3±45,0	203,8±61,6
Кріодеструкція + ЕКФШП	1331,0±148,9 <sup>1</sup>	277,8±37,1	292,6±16,1 <sup>1</sup>	369,0±19,1 <sup>1</sup>
Кріодеструкція + ВКРФ С <sub>60</sub>	1202,9±192,9 <sup>1</sup>	342,4±85,9 <sup>1,2</sup>	260,1±42,3 <sup>1</sup>	441,9±49,2 <sup>1,2</sup>
	21 доба спостереження			
Контроль (кріодеструкція + фізрозчин)	579,9±93,5	94,6±24,3	203,3±18,0	541,8±131,4
Кріодеструкція + ЕКФШП	487,4±16,6	162,8±15,5 <sup>1</sup>	171,8±10,6 <sup>1</sup>	668,0±18,9
Кріодеструкція + ВКРФ С <sub>60</sub>	431,9±40,7 <sup>1</sup>	207,1±67,4 <sup>1</sup>	160,6±20,9 <sup>1</sup>	776,7±67,1 <sup>1,2</sup>

Примітки. Відмінності статистично достовірні ( $p < 0,05$ ,  $n=10$ ): 1 – в порівнянні з контролем. 2 – з групою кріодеструкція + екстракти. ЗПН - зона

первинного некрозу. ДЛВ - демаркаційний лейкоцитарний вал. ЗВН - зона вторинного некрозу. ШГТ - шар грануляційної тканини.

Так, порівняно з контролем у згаданих групах на 7 добу спостереження середні значення товщини зон первинного і вторинного некрозу значимо зменшувалися, а шару грануляційної тканини – збільшувались. На 14 добу експерименту спостерігалась майже та сама картина, за винятком достовірного збільшення товщини демаркаційного лейкоцитарного валу у тварин з введенням ВКРФ С<sub>60</sub>. На 21 добу було відмічено достовірне збільшення шару демаркаційного лейкоцитарного валу і зменшення середньої товщини зони вторинного некрозу в групі з введенням ЕКФШП. В той же час в групі тварин, які отримували ВКРФ С<sub>60</sub> було відмічено достовірне покращення всіх досліджуваних показників.

Загоєння ран - це складний процес, що протікає на різних рівнях (молекулярному, субклітинному, клітинному, тканинному і органному), кінцевою метою якого є ліквідація пошкодження з максимальним відновленням анатомічної структури за умови мінімальних функціональних втрат. Багато вчених велику вираженість демаркаційного лейкоцитарного валу пов'язують з прискореним формуванням грануляційної тканини і епітелізацією [255].

На підставі порівняння даних морфометричного дослідження шарів ранового дефекту після кріодеструкції шкіри в групах з введенням ЕКФШП і ВКРФ С<sub>60</sub> встановлено наявність достовірних відмінностей між показниками товщини демаркаційного лейкоцитарного валу на 14 добу спостереження, товщини зони вторинного некрозу на 7 добу, товщини шару грануляційної тканини у всі терміни спостереження.

У разі розвитку глибокого ранового дефекту його порожнину, як правило, заміщує грануляційна тканина, яка потім дозріває і перетворюється в сполучну тканину [91]. Грануляційна тканина характеризується наявністю клітинного, судинного і волокнистого компонентів і в процесі свого

дозрівання питомий обсяг волокнистого компонента збільшується, а питомі обсяги клітинного і судинного компонентів зменшуються [70].

У досліджуваних групах в грануляційній тканині, що заповнювала ранову порожнину, визначався клітинний, судинний і волокнистий компоненти у різному співвідношенні, що свідчило про різний ступень її зрілості. Було відзначено великий вміст судинного компонента в грануляційній тканині після введення ЕКФШП і, особливо, ВКРФ С<sub>60</sub> протягом усього експерименту, ймовірно, це сприяло поліпшенню трофіки грануляційної тканини і, отже, приводило до прискорення темпів загоєння ранового дефекту.

За даними обзорної мікроскопії характер поліморфної клітинної інфільтрації в грануляційній тканині у досліджуваних групах був різним. Так, на 7 добу клітинна інфільтрація була представлена значною кількістю лейкоцитів і незначною кількістю макрофагів, лімфоцитів і клітин фібробластичного диферону різного ступеня зрілості. Клітини імунотетентної системи відіграють важливу роль у забезпеченні розвитку відновного зростання. Лімфоцити здатні виробляти лімфокіни, що пригнічують або стимулюють проліферацію і функціональну активність фібробластів [266]. Зі збільшенням термінів спостереження кількість лейкоцитів зменшувалася, а кількість лімфоцитів, макрофагів і, особливо, клітин фібробластичного ряду наростала.

Як відомо, макрофаги здійснюють не тільки фагоцитоз тканинного детриту, а й виділяють різні біологічно активні речовини, які регулюють міжклітинні і клітинно-тканинні взаємодії. Також макрофаги здатні виділяти індуктори ангіогенезу, що стимулюють проліферацію ендотеліоцитів. Крім того, макрофаги стимулюють продукцію фібрoneктину, що підсилює хемотаксис фібробластів [200]. Протягом усього експерименту введення ВКРФ С<sub>60</sub> підвищувало вміст судинного компонента і кількість макрофагів, лімфоцитів і клітин фібробластичного диферону в грануляційній тканині в усі терміни спостереження, що, вірогідно, приводило до прискорення темпів

загоєння ранового дефекту. У даний час до фібробластичного диферону відносять стовбурові клітини, органоспецифічні клітини-попередники (префібробласти), що диференціюються у фібробласти, репаративні фібробласти, міофібробласти, фіброкласти, фіброцити. Ствоурові клітини і органоспецифічні клітини-попередники є камбіальними, резервними клітинами. Зрілі фібробласти – диференційовані клітини, найактивніші у функціональному відношенні, забезпечують підтримання гомеостазу та виконують синтетичну, резорбтивну і регуляторну функції при оновленні або ремоделюванні тканин. Вони синтезують білки волокон (еластин, колаген) та компоненти міжклітинного матриксу (фібронектин, глікозаміноглікани). Дослідженнями показано наявність двох типів фібробластів. Найбільш численний тип включає в себе короткоживучі фібробласти, для яких характерна інтенсивна проліферація. Вони мають найбільше значення при загоєнні ран. Другий тип – це довгоживучі фібробласти, для яких характерний менший рівень синтетичних процесів [141, 278].

Підсумовуючи дані гістологічного дослідження можна стверджувати, що загоєння ранових дефектів в контрольній групі з кріодеструкцією шкіри і введенням фізіологічного розчину проходило повільніше, ніж в групах де після кріодеструкції вводили ЕКФШП або ВКРФ С<sub>60</sub>. Введення ЕКФШП і ВКРФ С<sub>60</sub> мало подібні ефекти, але фулерени показали більш виражений стимулюючий вплив на репаративні процеси ран, що загоюються. Проте, в групі з екстрактами було відмічено формування придатків шкіри (на 21 добу спостереження), що свідчить про органотиповий тип репарації ранового дефекту. В групі з введенням ВКРФ С<sub>60</sub> товщина епітеліального шару в крайових відділах ран була достовірно вище ніж в групі з введенням ЕКФШП на 7 і 14 добу спостереження. Проте, найбільша кількість і вираженість акантотичних розростань епідермісу спостерігалася в групі з введенням ВКРФ С<sub>60</sub>. Крім того, на відміну від групи ЕКФШП, було зафіксовано підвищення мітотичної активності клітин і помірно виражені диспластичні зміни. При аналізі товщини шарів ранового дефекту більш

виражений стимулюючий вплив ВКРФ С<sub>60</sub> на репаративні процеси порівняно з ЕКФШП було встановлено протягом всього експерименту: на 7 добу відмічено зменшення вираженості шару вторинного некрозу і збільшення шару грануляційної тканини; на 14 добу – підвищення товщини шарів демаркаційного лейкоцитарного валу і грануляційної тканини; на 21 добу – збільшення шару грануляційної тканини. Крім того, після введення ВКРФ С<sub>60</sub> було відзначено більший вміст судинного компонента і більшу кількість макрофагів, лімфоцитів і клітин фібробластичного диферону в грануляційній тканині в усі терміни спостереження, що приводило до прискорення темпів загоєння ранового дефекту. При цьому, одночасну наявність морфологічних ознак дисплазії і підвищеної проліферативної активності клітин епітелію можна розглядати як потенційну передумову розвитку передракових захворювань шкіри. Регенерація тканин у щурів після кріодеструкції шкіри та введення ЕКФШП є більш органотиповою, отже є більш «якісною».

### **5.3. Процеси проліферації і апоптозу в тканинах після кріодеструкції шкіри та підлягаючих м'яких тканин при введенні ЕКФШП і ВКРФ С<sub>60</sub>**

Для вивчення процесів проліферації нами був обран маркер Ki-67, що кодується геном MKI67. Цей ядерний білок експресується в активних фазах клітинного циклу, та відсутній в фазі G<sub>0</sub>. Для дослідження процесів апоптозу ми обрали маркер p53 - фактор транскрипції, який кодується геном TP53. Білок p53 регулює клітинний цикл, активуючи апоптоз в клітинах з пошкодженнями генетичного апарату [32, 66, 185].

При імуногістохімічному дослідженні тканин інтактних щурів з використанням кролячих моноклональних антитіл до Ki-67 в епідермісі, переважно в базальному шарі, були виявлені нечисленні епітеліоцити, які експресують маркер проліферації і мають характерний коричневий колір. В дермі, гіподермі з підлягаючою м'язовою тканиною Ki-67 експресували клітини фібробластичного ряду, ендотеліоцити судин, деякі імунні і м'язові клітини. Експресія маркера Ki-67 також була зафіксована в клітинних

елементах придатків шкіри. Середнє значення абсолютної кількості Ki-67-позитивних клітин в епідермісі склало  $5,1 \pm 0,8$ , а в дермі, гіподермі з підлягаючою м'язовою тканиною -  $2,6 \pm 0,5$ .

При імуногістохімічному дослідженні з моноклональними кролячими антитілами до маркера апоптозу p53 визначалася його експресія в ядрах деяких епітеліоцитів, розташованих переважно в базальних відділах епітеліального пласта; клітинних елементів придатків шкіри; клітин фібробластичного ряду, імунних клітин, ендотеліоцитів судин, розташованих в дермі, гіподермі з підлягаючою м'язовою тканиною. Середнє значення абсолютної кількості p53-позитивних клітин в епідермісі склало  $1,8 \pm 0,45$ , а в дермі, гіподермі з підлягаючою м'язовою тканиною -  $0,7 \pm 0,5$ . При аналізі сукупності отриманих результатів відзначено перевагу проліферативних процесів над процесами апоптозу як в епідермісі, так і в дермі, гіподермі з підлягаючою м'язовою тканиною. Процеси апоптозу і проліферації були більш виражені в епітеліальному шарі в порівнянні з дермою, гіподермою і м'язовою тканиною.

В групі контролю (кріодеструкція та введення фізіологічного розчину) на 7 добу експерименту в тканинах навколо ранового дефекту була виявлена експресія Ki-67 епітеліоцитами базального і шипуватого шарів епідермісу; клітинними елементами придатків шкіри, які локалізувалися в дермі; ендотеліоцитами судин, імунними клітинами і клітинами фібробластичного диферону, що розташовуються в дермі, гіподермі і м'язовій тканині (рис.5.3.1). Експресія маркера Ki-67 ядрами м'язових клітин практично не визначалася. Середнє значення абсолютної кількості Ki-67-позитивних клітин в епідермісі становило  $11,9 \pm 1,7$ , а в дермі, гіподермі з підлягаючою м'язовою тканиною -  $14,5 \pm 2,1$ .

Продукт експресії p53 реєструвався в ядрах епітеліоцитів базального, а місцями і шипуватого шарів епідермісу; клітин придатків шкіри; клітин фібробластичного диферона, імунних клітин, ендотеліоцитів судин, які розташовувалися в дермі з підлягаючими шарами. Дані клітини приймали

характерний коричневий колір. Також була виявлена позитивна реакція в ядрах деяких м'язових клітин. Середнє значення абсолютної кількості p53-позитивних клітин в епідермісі становило  $3,4 \pm 0,5$ , а в дермі, гіподермі з підлягаючою м'язовою тканиною -  $5,5 \pm 0,8$ .

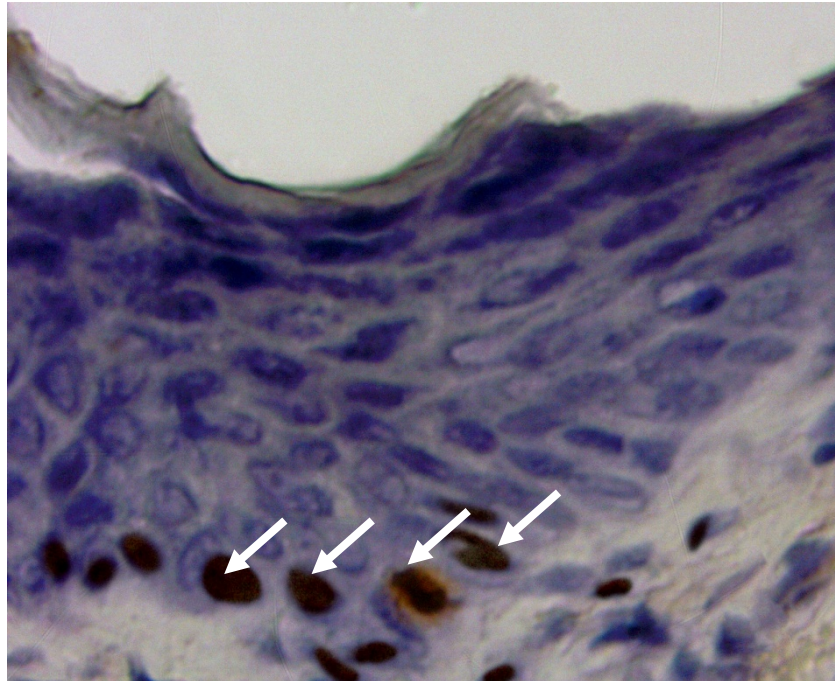


Рис. 5.3.1. 7 доба. Експресія Ki-67 в епідермісі і прилеглих відділах дерми. Імуногістохімічна реакція з моноклональними кролячими антитілами к Ki-67,  $\times 1000$ .

У тканинах навколо ранового дефекту апоптотичні і проліферативні процеси зростали в порівнянні з даними інтактної групи, що обумовлено процесами регенерації і направлено на відновлення і підтримку цілісності шкіри з підлягаючими тканинами. Активізація апоптотичних процесів клітинних елементів даної групи також може бути обумовлена дією пошкоджуючого (температурного) фактора, який призвів до розвитку кріонекрозу. Цікаво те, що в оточуючих рановий дефект тканинах процеси апоптозу і проліферації переважали в дермі, гіподермі та м'язовій тканині в порівнянні з епідермісом, в той час як в інтактній групі дані процеси переважали в епідермісі. В шарі грануляційної тканини, розташованому в дні ранового дефекту, була виявлена експресія маркера проліферації Ki-67 і



маркеру апоптозу p53 переважно клітинами фібробластичного ряду, ендотеліоцитами новоутворених судин, а подекуди і імунними клітинами. Середні значення абсолютної кількості Ki-67- і p53-позитивних клітин становили відповідно  $18,7 \pm 2,8$  і  $9,5 \pm 1,5$ . Аналізуючи процеси апоптозу та проліферації на 7 добу експерименту в тканинах навколо ранового дефекту, так і в грануляційній тканині, розташованій в дні ранового дефекту, проліферативні процеси переважали над апоптотичними.

На 14 и 21 добу експерименту в оточуючих рановий дефект епідермісі, дермі, гіподермі і м'язовому шарі були виявлені клітини, які експресували маркери Ki-67 і p53, подібні до тих, що спостерігалися на 7 добу. На 14 добу середні значення абсолютної кількості Ki-67-позитивних клітин в епідермісі і дермі, гіподермі з підлягаючою м'язовою тканиною становили  $16,0 \pm 2,4$  і  $17,0 \pm 2,5$  відповідно. Середнє значення абсолютної кількості p53-позитивних клітин в епідермісі склало  $6,5 \pm 1,1$ , а в дермі, гіподермі з підлягаючою м'язовою тканиною -  $8,5 \pm 1,4$ . На 21 добу середнє значення абсолютної кількості Ki-67-позитивних клітин в епідермісі становило  $20,4 \pm 3,4$ , а в дермі з підлягаючою гіподермою і м'язовою тканиною -  $19,8 \pm 2,9$ . Середнє значення абсолютної кількості p53-позитивних клітин в епідермісі становило  $8,0 \pm 1,2$ , а в дермі, гіподермі з підлягаючою м'язовою тканиною -  $10,8 \pm 1,7$ .

В оточуючих ранову порожнину тканинах на 14 і 21 добу було виявлено, як і на 7 добу, перевагу процесів проліферації над процесами апоптозу. За якісною оцінкою на 14 добу процеси апоптозу і проліферації переважали в дермі з підлягаючою гіподермою і м'язовою тканиною в порівнянні з епідермисом. На 21 добу апоптотичні процеси переважали в дермі з підлягаючими тканинами в порівнянні з епітеліальним пластом, а процеси проліферації значимо не відрізнялися між вище зазначеними шарами.

В грануляційній і сполучній тканинах, що знаходились у рановій порожнині на 14 та 21 добу експерименту були виявлені клітини фібробластичного ряду, імунні клітини, ендотеліоцити судин, які

експресували Ki-67 і p53 (рис. 5.3.2). Середні значення абсолютної кількості Ki-67- і p53-позитивних клітин на 14 добу становили  $23,4 \pm 3,6$  і  $12,9 \pm 2,0$ , а на 21 добу -  $28,5 \pm 4,6$  і  $15,9 \pm 2,5$ . Аналізуючи отримані результати, можна зробити висновок, що в цих тканинах переважали процеси проліферації над процесами апоптозу.

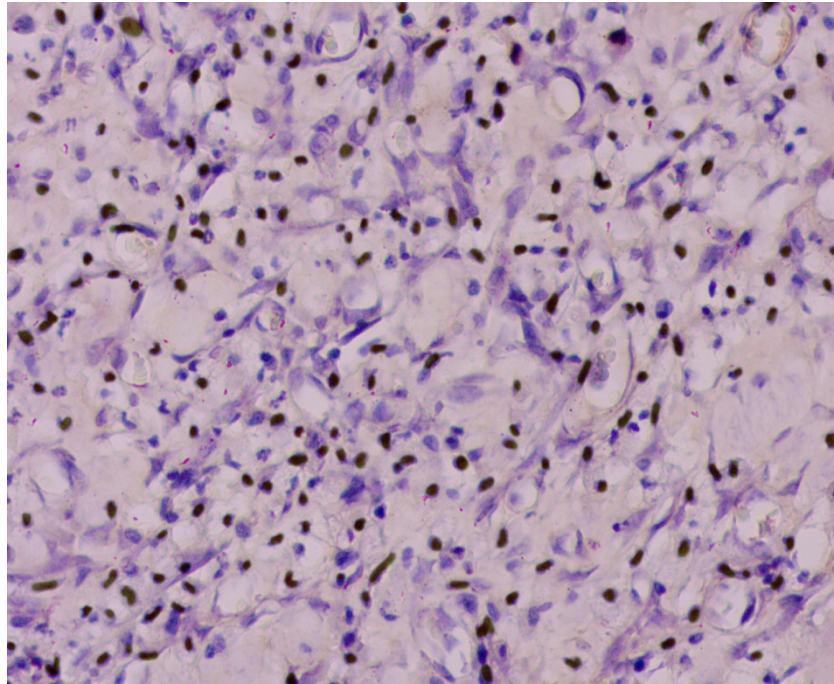


Рис. 5.3.2. 21 доба. Експресія Ki-67 клітинними елементами грануляційної тканини, яка заповнює ранову порожнину. Імуногістохімічна реакція з моноклональними кролячими антитілами к Ki-67,  $\times 400$ .

В групі з кріодеструкцією та введенням ЕКФШП на 7 добу експерименту експресія ядерних білків Ki-67 і p53 була виявлена як в оточуючих рановий дефект епідермісі, дермі, гіподермі, шарі м'язової тканини, так і в грануляційній тканині, розташованій в дні ранового дефекту. Клітини, які експресували Ki-67 і p53, мали характерний коричневий колір, і були представлені епітеліоцитами базального і шипуватого шарів, клітинами придатків шкіри, імунними клітинами, клітинами фібробластичного ряду, ендотеліоцитами судин, м'язовими клітинами, що входять до складу м'язового шару. Максимальною проліферативною і апоптотичною активністю характеризувалися клітини фібробластичного ряду, епітеліоцити

епідермісу, клітини придатків шкіри і ендотеліоцити судин, що, з нашої точки зору, пов'язано з процесами загоєння рани. Клітини фібробластичного ряду, як відомо, беруть участь в утворенні сполучної тканини. В осередку ушкодження з перебігом часу фібробласти дозрівають, і вже зрілі фібробласти характеризуються достатньою синтетичною активністю. При цьому, якість утвореної грануляційної тканини, яка потім дозріває і перетворюється в сполучну тканину, залежить від правильного співвідношення апоптотичних і проліферативних процесів, що протікають в ній. У фізіологічних умовах в грануляційній тканині зі збільшенням проліферативного потенціалу зростає кількість клітин, що знаходяться в стані апоптозу. [81]. Клітини стінок судин також відіграють важливу роль при регенерації шкіри. Мікросудини є центрами клітинної проліферації і диференціювання. Ендотеліоцити і перицити - основні джерела нових клітинних елементів шкіри. Клітини судинних стінок також відіграють важливу роль під час регенерації шкіри. [207].

Середнє значення абсолютної кількості Ki-67-позитивних клітин в епідермісі становило  $17,2 \pm 2,6$ , а в дермі з підлягаючою гіподермою і м'язовою тканиною -  $20,5 \pm 3,0$ . Середнє значення абсолютної кількості p53-позитивних клітин в епідермісі становило  $7,5 \pm 1,3$ , а в дермі, гіподермі з підлягаючою м'язовою тканиною -  $10,5 \pm 1,6$ . В грануляційній тканині, розташованій в дні ранової порожнини, середні значення абсолютної кількості Ki-67- і p53-позитивних клітин склали  $26,0 \pm 3,8$  і  $14,8 \pm 2,1$ , відповідно. На підставі якісного аналізу можна стверджувати, що у зазначених локалізаціях переважали процеси проліферації над апоптозом. Також було відмічено перевагу апоптотичних і проліферативних процесів в дермі, гіподермі і м'язовій тканині в порівнянні з епідермісом.

На 14 и 21 добу експерименту в оточуючих рановий дефект епідермісі, дермі, гіподермі, м'язовому шарі були виявлені Ki-67- і p53-позитивні клітини (рис. 5.3.3), причому дані маркери експресувались тими ж клітинними елементами, що і на 7 добу спостереження.

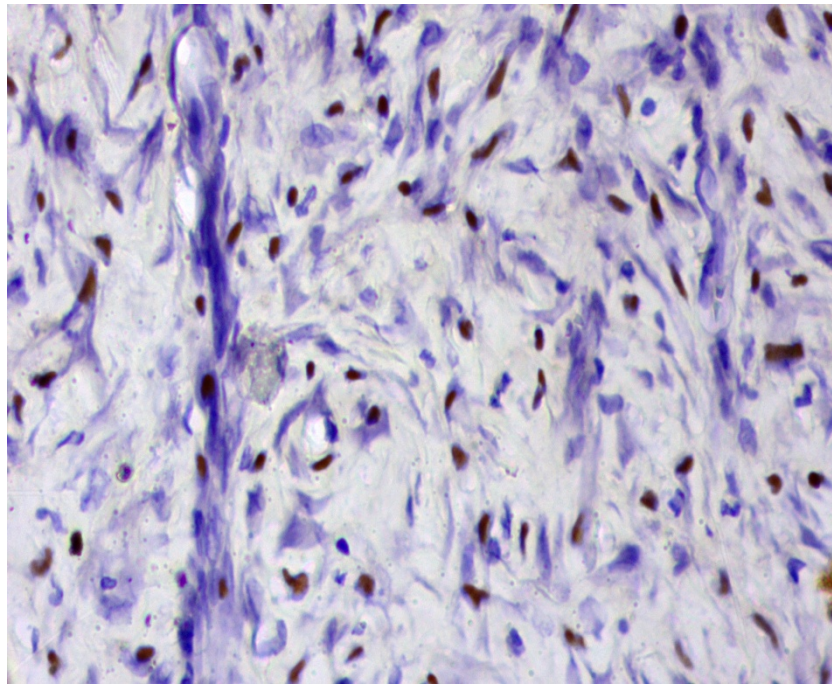


Рис. 5.3.3. 21 доба. Експресія р53 клітинними елементами грануляційної тканини. Імуногістохімічна реакція з моноклональними кролячими антитілами до р53,  $\times 400$ .

На 14 добу середні значення абсолютної кількості Кі-67- і р53-позитивних клітин в епідермісі становили  $23,0 \pm 3,6$  і  $10,6 \pm 1,7$ , в дермі, гіподермі з підлягаючою м'язовою тканиною -  $25,0 \pm 3,6$  і  $12,4 \pm 2,1$ . На 21 добу середні значення абсолютної кількості Кі-67- і р53-позитивних клітин в епідермісі склали  $27,9 \pm 4,2$  і  $11,9 \pm 1,9$ , в дермі, гіподермі з підлягаючою м'язовою тканиною -  $27,8 \pm 3,9$  і  $15,1 \pm 2,4$ .

За результатами якісної оцінки на 14 добу спостереження процеси апоптозу і проліферації переважали в дермі, гіподермі з підлягаючою м'язовою тканиною в порівнянні з епідермісом. На 21 добу апоптотичні процеси переважали в дермі, гіподермі з підлеглою м'язовою тканиною. В рановій порожнині на 14 добу в грануляційній тканині, на 21 добу в грануляційній і сполучній тканинах були виявлені клітини фібробластичного ряду, ендотеліоцити судин, імунні клітини, які експресували Кі-67 і р53. Середні значення абсолютної кількості Кі-67- і р53-позитивних клітин на 14

добу становили  $32,2 \pm 5,1$  і  $17,8 \pm 2,9$ , а на 21 добу -  $37,3 \pm 5,8$  і  $22,5 \pm 3,7$ . Серед досліджених процесів, як і на 7 добу, переважали проліферативні.

В групі з кріодеструкцією та введенням ВКРФ С<sub>60</sub> на 7 добу експерименту в епідермісі, дермі, гіподермі, м'язовій тканині, які оточували холодову рану, а також в грануляційній тканині, розташованій в дні ранової порожнини, була виявлена позитивна імуногістохімічна реакція з моноклональними кролячий антитілами до Ki-67 і p53. Клітини, які експресували дані маркери мали коричневий колір, і були представлені епітеліоцитами базального і шипуватого шарів епідермісу, клітинами придатків шкіри, клітинами фібробластичного диферона, ендотеліоцитами судин, імунними клітинами, м'язовими клітинами. Клітини фібробластичного ряду, епітеліоцити епідермісу характеризувалися максимальною проліферативною і мінімальною апоптотичною активністю. Середнє значення абсолютної кількості Ki-67-позитивних клітин в епідермісі становило  $26,0 \pm 4,0$ , а в дермі з підлеглою гіподермою і м'язовою тканиною -  $30,4 \pm 4,8$ . Середнє значення абсолютної кількості p53-позитивних клітин в епідермісі становило  $4,7 \pm 0,8$ , а в дермі, гіподермі з підлягаючою м'язовою тканиною -  $8,0 \pm 1,2$ . В грануляційній тканині, розташованій в рановій порожнини, середні значення абсолютної кількості Ki-67- і p53-позитивних клітин становили  $37,4 \pm 5,5$  і  $12,4 \pm 2,1$ .

Аналізуючи баланс між проліферативними і апоптотичними процесами, було виявлено домінування процесів проліферації. Також відзначалася перевага процесів апоптозу та проліферації в дермі, гіподермі з підлягаючою м'язовою тканиною в порівнянні з епітеліальним пластом.

На 14 і 21 добу експерименту в оточуючих ранову порожнину тканинах відзначалися особливості апоптотичних і проліферативних процесів, подібні 7 добі спостереження. На 14 добу середні значення абсолютної кількості Ki-67- і p53-позитивних клітин в епідермісі становили  $28,7 \pm 4,8$  і  $5,7 \pm 0,9$ , в дермі, гіподермі з підлягаючою м'язовою тканиною -  $35,9 \pm 5,3$  і  $9,5 \pm 1,6$ . На 21 добу середні значення абсолютної кількості Ki-67- і p53-позитивних



клітин в епідермісі складали  $33,9 \pm 6,0$  і  $3,9 \pm 0,7$ , в дермі, гіподермі з підлягаючою м'язовою тканиною -  $38,9 \pm 5,7$  і  $10,7 \pm 1,7$ , відповідно. В грануляційній і сполучній тканинах, які заповнювали ранову порожнину, були виявлені клітини фібробластичного диферона, імунні клітини, ендотеліоцити судин, які експресували Ki-67 і p53 (рис. 5.3.4), причому особливості експресії були схожі з тими, що були описані на 7 добу. Середні значення абсолютної кількості Ki-67- і p53-позитивних клітин на 14 добу становили  $37,9 \pm 6,2$  і  $14,1 \pm 2,3$ , а на 21 добу -  $41,3 \pm 6,7$  і  $15,0 \pm 2,4$ .

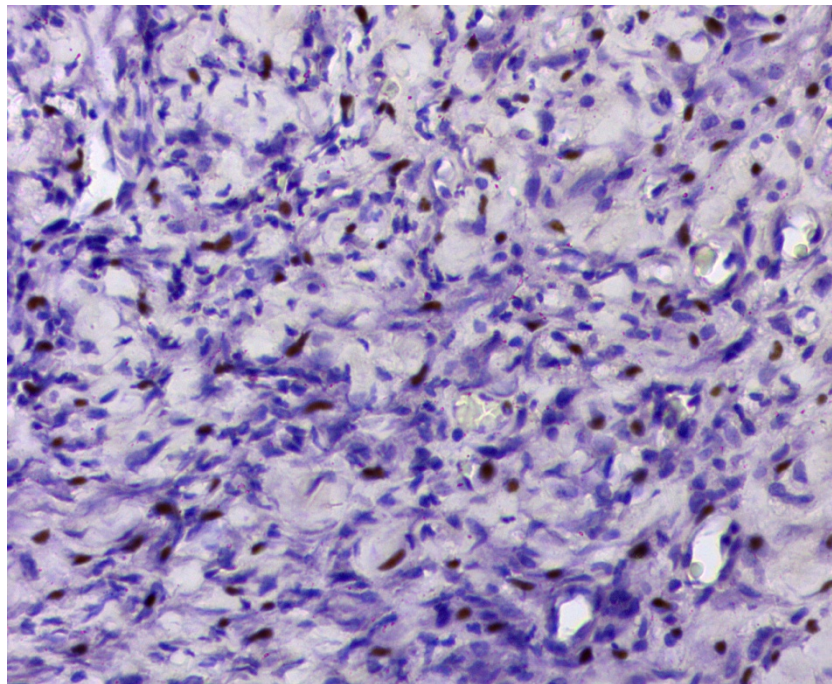


Рис. 5.3.4. 21 доба. Експресія Ki-67 (стрілки) клітинними елементами грануляційної тканини. Імуногістохімічна реакція з моноклональними кролячими антитілами до Ki-67,  $\times 400$ .

Аналізуючи отримані результати можна стверджувати, що зазначені вище апоптотичні і проліферативні процеси в тканинах у інтактних тварин підтримують динамічну рівновагу між проліферацією і елімінацією клітин шкіри і підлеглих м'яких тканин і відіграють важливу роль в збереженні цілісності шкіри. Виявлені у щурів процеси апоптозу і проліферації клітинних елементів в інтактній шкірі з підлеглими тканинами, за даними багатьох науковців, обумовлені фізіологічною регенерацією [220]. Остання,

як відомо, більш виражена в епідермісі в порівнянні з дермою, гіподермою, м'язовою тканиною, що і пояснює відмічені в даному дослідженні на рівні якісної оцінки більш виражені апоптотичні і проліферативні процеси саме в епітеліальному шарі.

Результати проведеного імуногістохімічного дослідження в контрольній групі (кріодеструкція та введення фізрозчину) дали змогу виявити активізацію проліферативних і апоптотичних процесів як в оточуючих рану епідермісі, дермі, гіподермі і м'язовій тканині, так і в грануляційній і сполучній тканинах, що заповнюють ранову порожнину. Серед досліджених процесів відзначалася перевага проліферативних процесів над апоптотичними. Індекс співвідношення проліферації до апоптозу (співвідношення Ki-67 та p53 –позитивних клітин) в епітеліальному шарі контрольної групи дорівнював 3,5, 2,5 і 2,6; в дермі, гіподермі і м'язовій тканині – 2,6, 2 і 1,8 на 7, 14 і 21 добу експерименту, відповідно. В грануляційній і сполучній тканинах індекс «проліферація/апоптоз» складав 1,8 на всі строки спостереження. Виявлена активізація процесів проліферації та апоптозу обумовлена, насамперед, процесами регенерації, спрямованими на репарацію пошкоджених структур і відновлення цілісності шкіри з підлягаючими тканинами. Також виявлена нами індукція апоптозу певною мірою обумовлена низькотемпературним впливом, який використовувався для моделювання процесів деструкції та репарації після кріоабляції шкіри [204].

У щурів, яким після кріодеструкції внутрішньоочеревинно вводили ЕКФШП, на всі строки спостереження відзначається активізація процесів проліферації клітинних елементів в оточуючих холодову рану епідермісі, дермі, гіподермі, м'язовій тканині, а також в грануляційній і сполучній тканинах, заповнюючих ранову порожнину. Проведений порівнювальний аналіз проліферативних процесів в групі з введенням ЕКФШП і контрольної групи (кріодеструкція + фізрозчин) показав підвищення значень абсолютної кількості Ki-67- позитивних клітин: в епідермісі: в 1,5, 1,4 і 1,4 рази на 7, 14 і

21 добу спостереження, відповідно. В дермі, гіподермі, м'язовій тканині абсолютна кількість Ki-67- позитивних клітин на 7, 14 і 21 добу спостереження була вище значень контролю в 1,4, 1,5 і 1,4 рази, відповідно. В грануляційній і сполучній тканинах абсолютна кількість Ki-67- позитивних клітин була вище в 1,4, 1,4 і 1,3 рази на 7, 14 і 21 добу спостереження, відповідно.

Аналіз апоптотичних процесів показав, що внутрішньоочеревинне введення ЕКФШП підвищує значення абсолютної кількості p53- позитивних клітин, в порівнянні з контролем: в епітелії - в 2,2, 1,6 і 1,5 рази, при цьому індекс співвідношення проліферації до апоптоза складав 2,3, 2,2 і 2,1 – на 7, 14 і 21 добу спостереження, відповідно. В дермі, гіподермі, м'язовій тканині зафіксовано підвищення маркеру p53 в 1,9, 1,5 і 1,4 рази, при цьому індекс співвідношення проліферація/апоптоз складав 2, 2 і 1,8 – на 7, 14 і 21 добу спостереження, відповідно. В грануляційній і сполучній тканинах кількість p53-позитивних клітин зростала в 1,6, 1,4 і 1,4 рази, при цьому індекс співвідношення проліферації до апоптоза складав 1,8, 1,8 і 1,7 – на 7, 14 і 21 добу спостереження, відповідно.

У щурів, яким після кріодеструкції внутрішньоочеревинно вводили ВКРФ С<sub>60</sub> на всі строки спостереження відзначається активізація процесів проліферації клітинних елементів в оточуючих холодову рану епітеліальному пласті, дермі, гіподермі, м'язовій тканині, а також в грануляційній і сполучній тканинах, що заповнюють ранову порожнину.

При порівнянні показників даної групи з відповідними показниками групи контролю (кріодеструкція + фізрозчин) в епідермісі (Рис.5.3.5) було виявлено підвищення значень абсолютної кількості Ki-67- позитивних клітин: в 2,2, 1,8 і 1,7 рази – на 7, 14 і 21 добу спостереження, відповідно.

В дермі, гіподермі, м'язовій тканині (Рис.5.3.6) в групі з введенням ВКРФ С<sub>60</sub>, значення маркеру Ki-67 підвищувалось: в 2,1, 2,1 і 2 рази – на 7, 14 і 21 добу спостереження, відповідно.



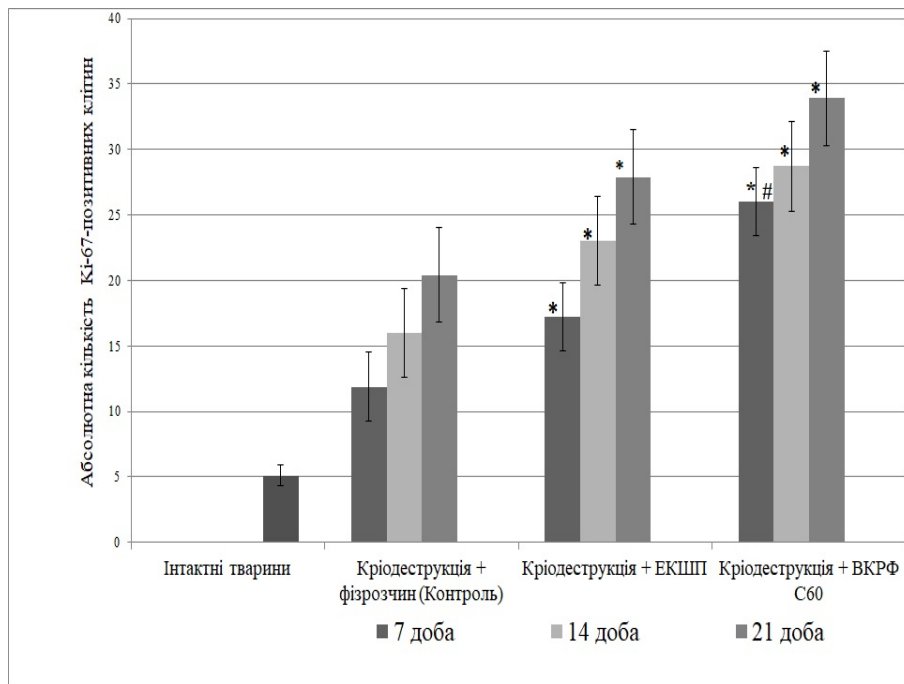


Рис. 5.3.5. Абсолютна кількість Кі-67-позитивних клітин в епідермісі. Примітки. Відмінності статистично достовірні ( $p < 0,05$ ,  $n = 10$ ): \* – в порівнянні з контролем. # – з групою кріодеструкція + ЕКФШП.

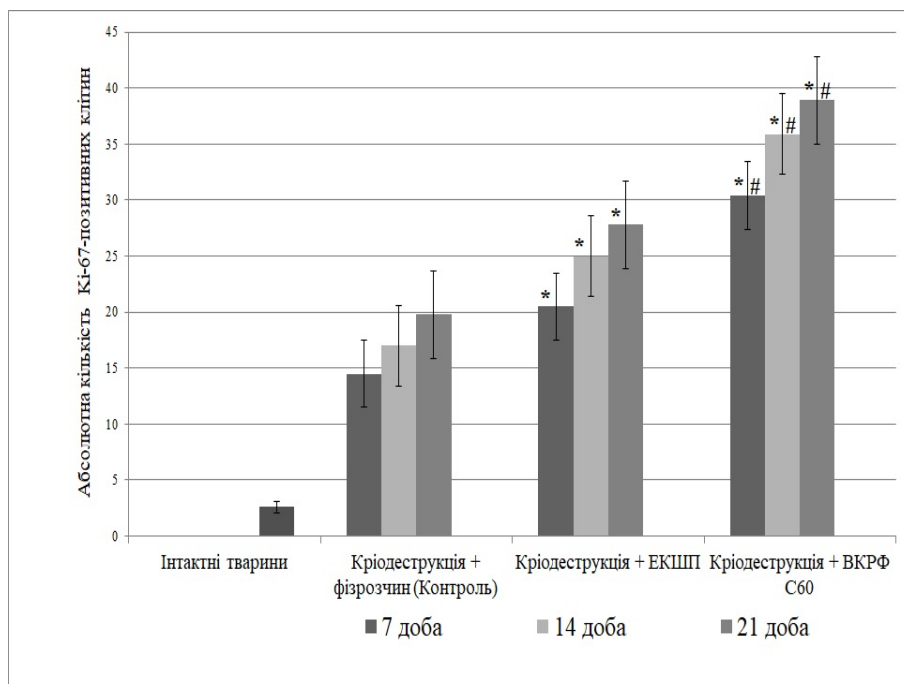


Рис. 5.3.6. Абсолютна кількість Кі-67-позитивних клітин в дермі, гіподермі, м'язовій тканині. Відмінності статистично достовірні ( $p < 0,05$ ): \* – в порівнянні з контролем. # – з групою кріодеструкція + ЕКФШП.

В грануляційній і сполучній тканинах (Рис.5.3.7), в групі тварин, яким після кріодеструкції вводили ВКРФ С<sub>60</sub>, абсолютна кількість Ki-67-позитивних клітин зростала в 2, 1,6 і 1,5 рази – на 7, 14 і 21 добу спостереження, відповідно.

В результаті порівняння кількості Ki-67- позитивних клітин в усіх дослідних групах, встановлено, що цей показник на 7 добу в групі з введенням ВКРФ С<sub>60</sub>, був вище, в епітелії та шарі грануляційної тканини, ніж в групі з введенням ЕКФШП в 1,5 та 1,4 рази, відповідно. Значення кількості клітин, що експресують маркер Ki-67 в групі з введенням ВКРФ С<sub>60</sub> в дермі, гіподермі, м'язовій тканині підвищувалось в 1,5, 1,4 і 1,4 рази, порівняно з групою, якій вводили ЕКФШП, на 7, 14 і 21 добу спостереження, відповідно.

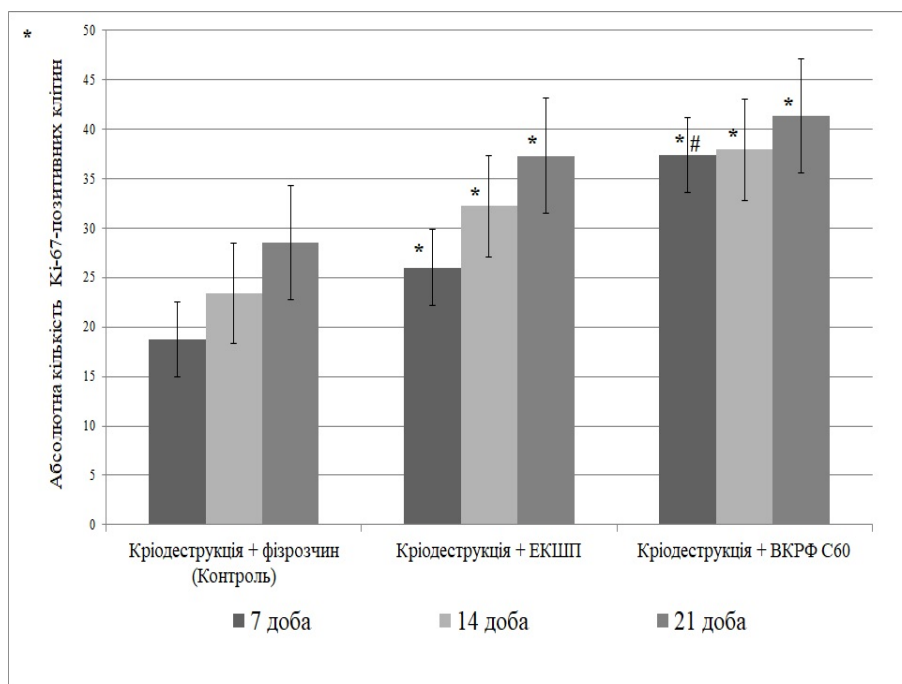


Рис. 5.3.7. Абсолютна кількість Ki-67-позитивних клітин в грануляційній або сполучній тканині. Відмінності статистично достовірні ( $p < 0,05$ ): \* – в порівнянні з контролем. # – з групою кріодеструкція + ЕКФШП.

В результаті порівняння кількості Ki-67- позитивних клітин в усіх дослідних групах, встановлено, що цей показник на 7 добу в групі з введенням ВКРФ С<sub>60</sub>, був вище, в епітелії та шарі грануляційної тканини, ніж

в групі з введенням ЕКФШП в 1,5 та 1,4 рази, відповідно. Значення кількості клітин, що експресують маркер Ki-67 в групі з введенням ВКРФ С<sub>60</sub> в дермі, гіподермі, м'язовій тканині підвищувалось в 1,5, 1,4 і 1,4 рази, порівняно з групою, якій вводили ЕКФШП, на 7, 14 і 21 добу спостереження, відповідно.

При порівнянні показників абсолютної кількості p53-позитивних клітин в групі з введенням ВКРФ С<sub>60</sub> з контролем: в епітеліальному шарі (Рис.5.3.8) на 21 добу виявлено зниження цього показника у 2 рази, на 7 і 14 добу – відмінності були відсутні. Тобто на на 7 і 14 добу експерименту ніякого ефекту від введення ВКРФ С<sub>60</sub> не зафіксовано, а на 21 добу було виявлено суттєве пригнічення активності процесів апоптозу.

В групі з введенням ВКРФ С<sub>60</sub>: в епітеліальному шарі індекс співвідношення проліферації до апоптозу складав: 5.5, 5 та 8.7 – на 7, 14 і 21 добу спостереження, відповідно

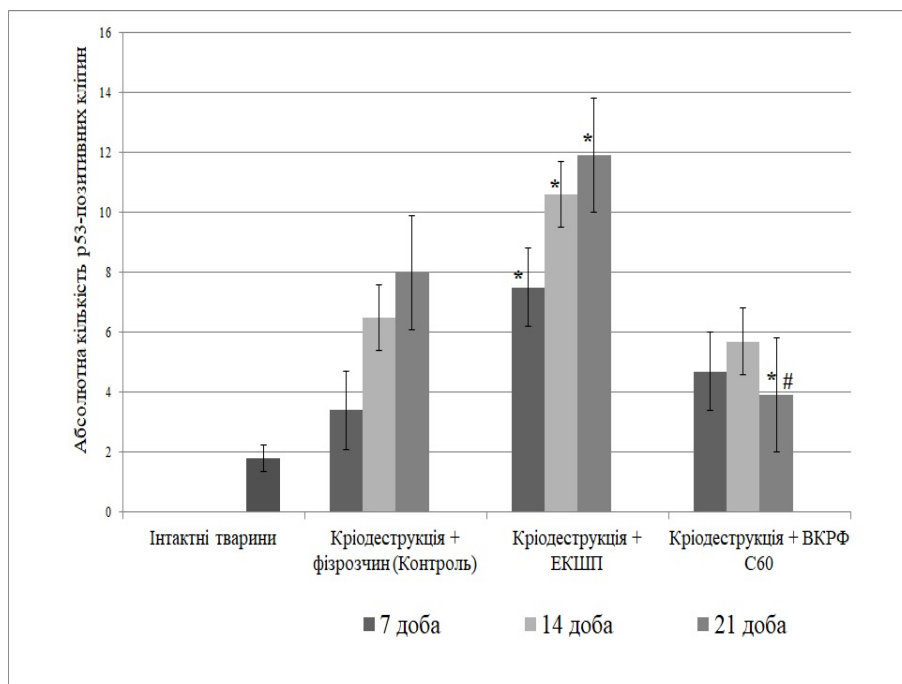


Рис. 5.3.8. Абсолютна кількість p53-позитивних клітин в епідермісі. Відмінності статистично достовірні ( $p < 0,05$ ): \* – в порівнянні з контролем. # – з групою кріодеструкція + ЕКФШП.

В дермі, гіподермі і м'язовій тканині (Рис.5.3.9) показник маркеру p53 зростав в 1,5 рази в порівнянні з контрольною групою лише на 7 добу спостереження, на 14, 21 добу – відмінності були відсутні. Слід зазначити, що достовірних відмінностей між показниками в групах з введенням ЕКФШП і ВКРФ С<sub>60</sub> не було. Тобто їх вплив на активність процесів апоптозу був однаковим, хоча стимулюючий вплив ВКРФ С<sub>60</sub> на проліферацію клітин був вищим ніж у ЕКФШП.

В групі з введенням ВКРФ С<sub>60</sub> в дермі, гіподермі і м'язовій тканині індекс співвідношення «проліферація/апоптоз» складав 3.8, 3.8 та 3.6 – на 7, 14 і 21 добу спостереження, відповідно.

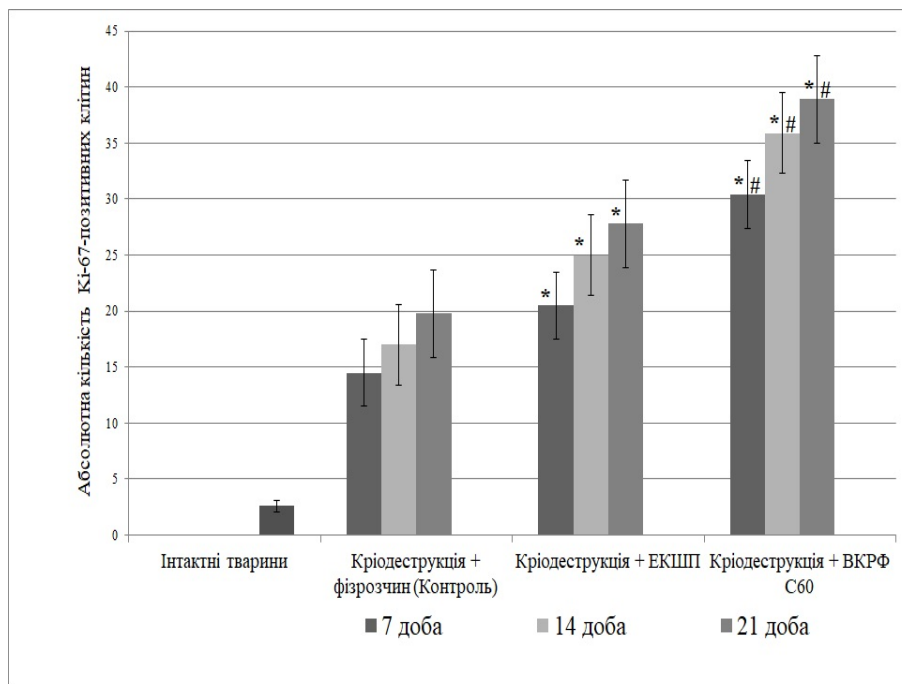


Рис. 5.3.9. Абсолютна кількість p53-позитивних клітин в дермі, гіподермі, м'язовій тканині. Відмінності статистично достовірні ( $p < 0,05$ ): \* – в порівнянні з контролем. # – з групою кріодеструкція + ЕКФШП.

В грануляційній і сполучній тканинах (Рис.5.3.10) абсолютна кількість p53-позитивних клітин на 7 добу зростала в 1,3 рази, на 14, 21 добу – ефекту від введення ВКРФ С<sub>60</sub> виявлено не було.

В групі з введенням ВКРФ С<sub>60</sub> в грануляційній і сполучній тканинах індекс співвідношення проліферації до апоптоза склав 3, 2.7 і 2.8 – на 7, 14 і 21 добу спостереження, відповідно.

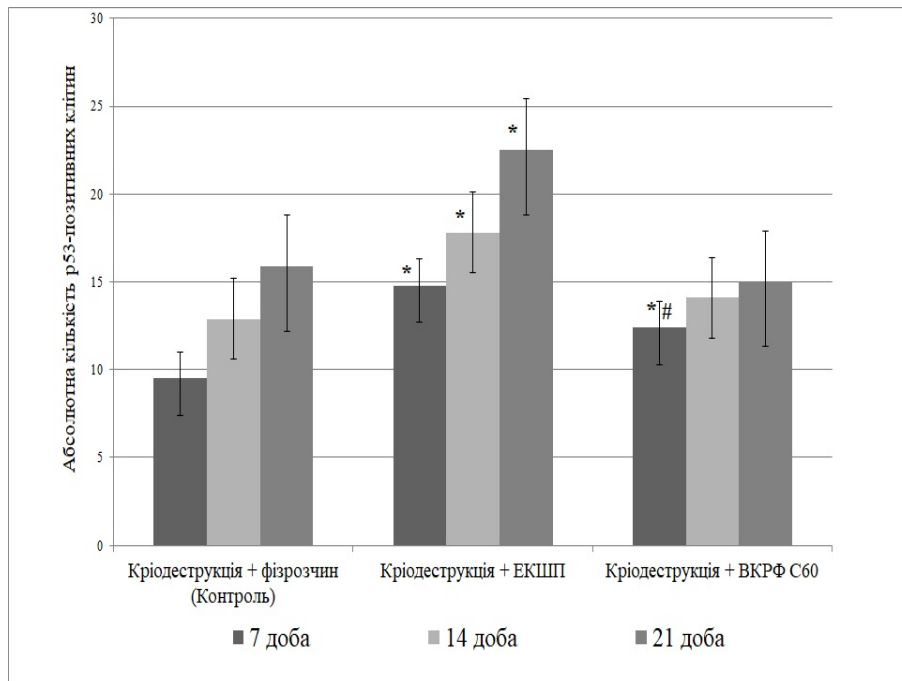


Рис. 5.3.10. Абсолютна кількість р53-позитивних клітин в грануляційній або сполучній тканині. Відмінності статистично достовірні ( $p < 0,05$ ): \* – в порівнянні з контролем. # – з групою кріодеструкція + ЕКФСШ.

Експресія маркера р53 у тварин, які отримували ВКРФ С<sub>60</sub>, в епідермісі була в 3 рази нижче, ніж в групі з введенням ЕКФСШ на 21 добу експерименту, на тлі підвищення проліферативної активності на протязі всього експерименту. В грануляційній або сполучній тканині тварин, що отримували ВКРФ С<sub>60</sub>, експресія маркера р53 була в 1,2 рази нижче, за показник групи з введенням ЕКФСШ на 21 добу експерименту.

Таким чином, в разі внутрішньочеревного введення ВКРФ С<sub>60</sub> при імуногістохімічному дослідженні по-перше, виявлена стимуляція проліферативного потенціалу клітин фібробластичного ряду зі зниженням їх апоптотичної активності, що в подальшому може призвести до надмірного формування сполучної тканини і утворення келоїдних рубців. Подібні зміни

функціональної активності фібробластів описані в морфогенезі спайкоутворення [256]. Фібробласти зони росту келоїдних рубців, за даними Є.Ю. Шаповалова і співавт., мають властивості зростаючої клітинної популяції з високим антиапоптотичним індексом і індексом проліферації, які не диференціюються в належній для дефінітивної шкіри мірі. [274]. По-друге, виявлена при імуногістохімічному дослідженні надмірна проліферативна активність і знижена апоптотична активність в епітеліальному шарі, а ще й описані в попередньому розділі диспластичні зміни в даному шарі, можуть стати фоном для розвитку епітеліальних пухлин.

Підсумовуючи дані макроскопічного дослідження, на 7 добу після кріодеструкції, у щурів усіх груп формувалася чітко виражена зона кріонекрозу, площа якого достовірно не відрізнялась між групами. В групі контролю на 7 добу після кріодеструкції спостерігалася помірна гіперемія і набряк, інфільтрація країв ран, гнійні виділення, місцями відмежовані скупчення гною. Тоді як в групах з введенням ЕКФШП або ВКРФ С<sub>60</sub> місцеві ознаки запалення були менш виражені: був відсутній набряк, інфільтрація та гнійні виділення. На 14-ту добу експерименту середнє значення площі ран в групі з введенням фулеренів було меншим в 1,6 рази, ніж в групі з введенням екстрактів, та в 1,7 рази меншим за показник в групі контролю. На 21-шу добу спостереження середнє значення площі ранових дефектів було меншим в обох експериментальних групах, у порівнянні з контрольною групою, а саме - в 1,9 рази в групі з введенням екстрактів, та в 1,4 рази - в групі з використанням фулеренів. Таким чином, введення ВКРФ С<sub>60</sub> та ЕКФШП після кріодеструкції шкіри достовірно прискорювало темп загоєння ран у безшерстих щурів,.

Проаналізувавши дані гістологічного дослідження з морфометрією можна стверджувати, що загоєння ранових дефектів в контрольній групі щурів (кріодеструкції шкіри і введення фізіологічного розчину) проходило повільніше, ніж в групах де після кріодеструкції вводили ЕКФШП або ВКРФ

C<sub>60</sub>. Введення ЕКФШП і ВКРФ C<sub>60</sub> мало подібний ефект, але фулерени показали більш виражений стимулюючий вплив на репаративні процеси ран, що загоюються. Проте, в групі з екстрактами на 21 добу спостереження було відмічено формування придатків шкіри, що свідчить про органотиповий тип репарації ранового дефекту. В групі з введенням ВКРФ C<sub>60</sub> товщина епітеліального шару в крайових відділах ран була достовірно вище ніж в групі з введенням ЕКФШП на 7 і 14 добу спостереження. Проте, найбільша кількість і вираженість акантотичних розростань епідермісу спостерігалася в групі з введенням ВКРФ C<sub>60</sub>. Крім того, в групі з введенням ВКРФ C<sub>60</sub> було зафіксовано підвищення мітотичної активності клітин і помірно виражені диспластичні зміни. При аналізі товщини шарів ранового дефекту більш виражений стимулюючий вплив ВКРФ C<sub>60</sub> на репаративні процеси порівняно з ЕКФШП було встановлено протягом всього експерименту: на 7 добу відмічено зменшення вираженості шару вторинного некрозу і збільшення шару грануляційної тканини; на 14 добу – підвищення товщини шарів демаркаційного лейкоцитарного валу і грануляційної тканини; на 21 добу – збільшення шару грануляційної тканини. Після введення ВКРФ C<sub>60</sub> було відзначено більший вміст судинного компонента і більшу кількість макрофагів, лімфоцитів і клітин фібробластичного диферону в грануляційній тканині в усі терміни спостереження, що приводило до прискорення темпів загоєння ранового дефекту.

Результати проведеного імуногістохімічного дослідження з моноклональними кролячими антитілами до маркерів Ki-67 та p53 показали, що у тварин контрольної групи в тканинах навколо ранового дефекту активність апоптотичних і проліферативних процесів зростала в порівнянні з даними інтактної групи. Індекс співвідношення проліферації до апоптоза в епітеліальному шарі контрольної групи дорівнював 3,5, 2,5 і 2,6; в дермі, гіподермі і м'язовій тканині – 2,6, 2 і 1,8 на 7, 14 і 21 добу експерименту, відповідно. В грануляційній і сполучній тканині цей індекс складав 1,8 на всі строки спостереження. Виявлена активізація процесів проліферації та

апоптозу обумовлена, процесами регенерації, спрямованими на відновлення пошкоджених структур і підтримку цілісності шкіри з підлягаючими тканинами. Також, зазначена нами індукція апоптозу, певною мірою обумовлена низькотемпературним впливом.

У щурів, яким після кріодеструкції внутрішньочеревинно вводили ЕКФШП, на всі строки спостереження відзначається активізація процесів апоптозу та проліферації клітинних елементів в усіх шарах ранового дефекту. Індекс співвідношення процесів проліферації до процесів апоптоза в епітеліальному шарі даної групи дорівнював 2,3, 2,2 і 2,1; в дермі, гіподермі і м'язовій тканині – 2, 2 і 1,8; в грануляційній і сполучній тканинах – 1,8, 1,8 та 1,7 на 7, 14 і 21 добу експерименту, відповідно.

Використання ЕКФШП після кріодеструкції, з огляду на виявлену збалансованість процесів апоптозу та проліферації, наведені результати морфологічного дослідження та в подальшому, тобто на більш пізніших термінах експерименту, призведе до органотипової регенерації з практично повним відновленням нормальної будови шкіри. Таким чином, регенерація тканин у щурів після кріодеструкції шкіри та введення ЕКФШП є більш органотиповою, отже є більш «якісною».

При введенні ВКРФ С<sub>60</sub> підвищувалась абсолютна кількість Ki-67 позитивних клітин у всіх шарах ранового дефекту та на всі строки спостереження, при цьому ці показники були вище ніж в групі з введенням ЕКФШП: в епітелії та шарі грануляційної тканини – на 7 добу, в дермі, гіподермі, м'язовій тканині – на всі строки спостереження. Застосування ВКРФ С<sub>60</sub> підвищувало абсолютну кількість P53-позитивних клітин на 7 добу експерименту в дермі, гіподермі, м'язовій тканині, а також в грануляційній і сполучній тканинах, в той же час ці значення були нижчі, ніж в групі з введенням ЕКФШП. В епітеліальному шарі на 21 добу активність процесів апоптозу була нижча, ніж в групі контролю та групі з введенням ЕКФШП. В групі з введенням ВКРФ С<sub>60</sub> індекс співвідношення проліферації до апоптоза дорівнював: в епітеліальному шарі – 5,5, 5,5 і 8,7; в дермі, гіподермі і м'язовій



тканині – 3.8, 3.8 і 3.7; в грануляційній і сполучній тканинах – 3, 2.7 і 2,8 – на 7, 14 і 21 добу експерименту, відповідно

Внутрішньочеревне введення ВКРФ С<sub>60</sub> після кріодеструкції викликає стимуляцію проліферативного потенціалу клітин фібробластичного ряду зі зниженням їх апоптотичної активності, що в подальшому може призвести до надмірного формування сполучної тканини і утворення келоїдних рубців [256]. Фіброласти зони росту келоїдних рубців, мають властивості зростаючої клітинної популяції з високим антиапоптотичним індексом і індексом проліферації, які не диференціюються в належній для дефінітивної шкіри мірі. [274]. Одночасна наявність морфологічних ознак дисплазії, підвищеної проліферативної активності і зниженої апоптотичної активності клітин епітелію в групі з веденням ВКРФ С<sub>60</sub> можна розглядати як потенційну передумову розвитку епітеліальних новоутворень

Результати, наведені в даному підрозділі, опубліковані в роботах [121, 120, 167, 118, 119, 168]:

## РОЗДІЛ 6

### **БІОХІМІЧНІ ПОКАЗНИКИ КРОВІ ЩУРІВ З КРІОДЕСТРУКЦІЄЮ ШКІРИ ТА ВВЕДЕННЯМ ЕКСТРАКТУ КРІОКОНСЕРВОВАНИХ ФРАГМЕНТІВ ШКІРИ ПОРОСЯТ І ВОДНОГО КОЛОЇДНОГО РОЗЧИНУ ФУЛЕРЕНІВ C<sub>60</sub>**

#### **6.1 Показники активності ПОЛ в сироватці крові**

Дослідження біохімічних параметрів сироватки крові є рутинним підходом в оцінці змін, що виникають в організмі при діагностиці широкого кола захворювань. Біохімічні показники сироватки крові відображають зміни в організмі на системному рівні після операційної травми, в т. ч. кріодеструкції шкіри, Насамперед стан ПОЛ, антиоксидантних систем та маркерів запалення і деструкції.

Надлишкову активацію вільнорадикальних процесів вважають універсальним механізмом ураження клітин при різних патологічних станах. Отримано численні підтвердження, що вільні радикали, інтенсифікація перекисного окислення ліпідів і ослаблення системи антирадикального захисту організму відіграють важливу роль у патогенезі різних захворювань [146].

В сучасній біології і медицині активація ПОЛ розглядається як універсальна відповідь живої системи на дію екстремальних факторів. Загалом, прооксидантно-антиоксидантний статус відображає баланс між двома протилежно спрямованими діями в організмі: антиоксидантними властивостями (захист) та утворенням вільних радикалів (пошкодження). Вплив екстремальних чинників призводить до зміщення рівноваги між ними у прооксидантний бік і розвитку так званого окислювального стресу. Антиоксидантна система здійснює контроль вільнорадикальних реакцій в організмі від їх ініціації, і до утворення малонового діальдегіду і гідроперекисів.

### 6.1.1 Рівень дієнових кон'югатів

Перекисне окислення практично на всіх етапах свого перебігу утворює ряд продуктів, які є результатом взаємодії вільних радикалів як між собою, так і з біологічними макромолекулами [150].

Як видно з табл. 6.1, на 7 добу експерименту концентрація дієнових кон'югатів в сироватці крові статистично достовірно перевищувала норму у всіх випадках.

Таблиця 6.1

Концентрація дієнових кон'югатів в сироватці крові щурів (мкмоль/л)

Умови експерименту	Термін спостереження, доба		
	7	14	21
Інтактні тварини	27,01±1,59		
Контроль (кріодеструкція + фізрозчин)	45,92±4,47 <sup>1</sup>	40,49±4,24 <sup>1</sup>	39,48±4,31 <sup>1</sup>
Кріодеструкція + ЕКФШП	41,28±4,96 <sup>1</sup>	35,87±3,56 <sup>1</sup>	28,05±3,13 <sup>2</sup>
Кріодеструкція + ВКРФ С <sub>60</sub>	42,06±4,57 <sup>1</sup>	28,41±3,11 <sup>2</sup>	28,08±3,25 <sup>2</sup>

Примітки: Відмінності статистично достовірні ( $p < 0,05$ ,  $n=10$ ): 1 – в порівнянні з інтактними тваринами; 2 – в порівнянні з кріодеструкцією та введенням фізіологічного розчину.

В контрольній групі значення цього показника було вище в 1,7 рази від концентрації в групі інтактних тварин. При цьому, в групах з введенням екстракту кріоконсервованих фрагментів шкіри поросят і водного колоїдного розчину фулерену С<sub>60</sub> отримані значення статистично не відрізнялись від даних, отриманих у контрольній групі, та перевищували значення норми в 1,5 та 1,6 рази відповідно.

На 14 добу в контрольній групі рівень дієнових кон'югатів був в 1,5 рази вище за норму. В групі тварин, яким вводили екстракт цей показник перевищував норму в 1,3 рази. При цьому введення екстракту не супроводжувалося статистично достовірними змінами показників по відношенню до результатів контрольної групи тварин. В групі тварин, які отримували фулерени C<sub>60</sub> було зафіксовано нормалізацію рівня дієнових кон'югатів.

На 21 добу рівень дієнових кон'югатів не відрізнявся від значень у інтактних тварин в групах з введенням екстрактів або фулеренів C<sub>60</sub>. В групі контролю цей показник перевищував значення норми в 1,5 рази.

### 6.1.2. Рівень ТБК-активних продуктів

Аналогічна ситуація спостерігалася при дослідження концентрації ТБК- активних продуктів в сироватці крові щурів (табл. 6.2).

Таблиця 6.2

Концентрація ТБК-активних продуктів в сироватці крові щурів (нмоль/л)

Умови експерименту	Термін спостереження, доба		
	7	14	21
Інтактні тварини	5,13±0,16		
Контроль (кріодеструкція + фізрозчин)	8,76±0,87 <sup>1</sup>	7,82±0,72 <sup>1</sup>	7,10±0,73 <sup>1</sup>
Кріодеструкція + ЕКФШП	8,01±0,89 <sup>1</sup>	7,38±0,81 <sup>1</sup>	5,50±0,60 <sup>2</sup>
Кріодеструкція + ВКРФ C <sub>60</sub>	7,94±0,83 <sup>1</sup>	5,76±0,54 <sup>2</sup>	5,24±0,61 <sup>2</sup>

Примітки: Відмінності статистично достовірні ( $p < 0,05$ ,  $n=10$ ): 1 – в порівнянні з інтактними тваринами; 2 – в порівнянні з кріодеструкцією та введенням фізіологічного розчину.

На 7 добу експерименту концентрація ТБК - активних продуктів в сироватці крові перевищує значення норми у всіх випадках. При цьому, в контрольній групі тварин значення цього показника було вище в 1,7 рази. В групах з введенням екстрактів або фулеренів  $C_{60}$  отримані значення достовірно не відрізнялись від даних у щурів контрольної групи та перевищували значення інтактних тварин в 1,6 рази.

На 14 добу експерименту в контрольній групі і в групі з введенням екстрактів рівень ТБК - активних продуктів зберігався вищим за норму в 1,5 та 1,4 рази відповідно. При цьому введення екстрактів не супроводжувалося статистично достовірними змінами показників по відношенню до результатів в контрольній групі. В групі з введенням фулеренів  $C_{60}$  було зафіксовано нормалізацію рівня ТБК - активних продуктів.

На 21 добу експерименту рівень ТБК - активних продуктів в групах, де вводили екстрактів або фулеренів  $C_{60}$  не відрізнявся від значень у інтактних тварин. В групі контролю показник був вище, ніж в групі інтактних тварин в 1,4 рази.

Скоріше зниження активності оксидантних процесів при введенні фулеренів  $C_{60}$  ймовірно пояснюється їх здатністю знижувати рівень активних форм кисню в сироватці та тканинах та впливати на NF- $\kappa$ B сигнальний шлях [29]. Наноструктура на основі вуглецю - фулерен  $C_{60}$  є одним з найпотужніших утилізаторів вільних радикалів [21].

### **6.1.3. Активність супероксиддисмугази**

Особливе значення, можуть мати зміни в вмісті і активності ферментів першої лінії антиоксидантного захисту, до числа яких відносяться супероксиддисмугаза і каталаза [153, 223]. У зв'язку з цим для нормального функціонування антиоксидантної системи важливим є збереження визначених співвідношень між її окремими ферментами [196]. Це доводить необхідність визначення стану антиоксидантного захисту.

Активність супероксиддисмутази на 7 добу в усіх експериментальних групах була меншою за норму (табл. 6.3).

В групі контролю значення показника було нижче за норму в 2,3 рази і статистично не відрізнялось від даних, отриманих в групах з введенням ЕКФШП або ВКРФ С<sub>60</sub>. В групах щурів, які отримували екстракти або фулеренів С<sub>60</sub> активність супероксиддисмутази була нижче за значення норми в 1,9 рази.

Таблиця 6.3

Активність супероксиддисмутази в сироватці крові щурів (у.о./мл)

Умови експерименту	Термін спостереження, доба		
	7	14	21
Інтактні тварини	4,94±0,43		
Контроль (кріодеструкція + фізрозчин)	2,11±0,26 <sup>1</sup>	2,31±0,33 <sup>1</sup>	2,86±0,30 <sup>1</sup>
Кріодеструкція + ЕКФШП	2,58±0,31 <sup>1</sup>	3,38±0,42 <sup>1,2</sup>	4,27±0,46 <sup>2</sup>
Кріодеструкція + ВКРФ С <sub>60и</sub>	2,58±0,34 <sup>1</sup>	3,66±0,42 <sup>1,2</sup>	4,85±0,59 <sup>2</sup>

Примітки: Відмінності статистично достовірні ( $p < 0,05$ ,  $n=10$ ): 1 – в порівнянні з інтактними тваринами; 2 – в порівнянні з кріодеструкцією та введенням фізіологічного розчину.

На 14 добу активність супероксиддисмутази також була менше норми в усіх групах, але в групі з введенням екстракту або розчину фулерену вона була вище, ніж в контрольній групі. В контрольній групі активність супероксиддисмутази була нижче за норму в 2,1 рази, а в групах з введенням екстрактів або фулеренів С<sub>60</sub> – в 1,4 та 1,3 рази, відповідно. Введення

екстрактів або фулеренів C<sub>60</sub> супроводжувалось підвищенням активності, по відношенню до даних контрольної групи в 1,5 або 1,6 рази відповідно.

На 21 добу спостереження ці показники в групах щурів, яким вводили екстракти або фулеренів C<sub>60</sub> не відрізнялися від значень в групі інтактних тварин. В той же час активність супероксиддисмутази в контрольній групі була нижче ніж у інтактних щурів в 1,7 рази.

#### 6.1.4. Активність каталази

Активність каталази в сироватці крові має таку ж динаміку, як і активність супероксиддисмутази (рис. 6.4).

Таблиця 6.4

Активність каталази в сироватці крові щурів (у.о./мл)

Умови експерименту	Термін спостереження, доба		
	7	14	21
Інтактні тварини	3,65±0,32		
Контроль (кріодеструкція + фізрозчин)	1,76±0,22 <sup>1</sup>	1,93±0,17 <sup>1</sup>	2,03±0,21 <sup>1</sup>
Кріодеструкція + ЕКФШП	2,07±0,23 <sup>1</sup>	2,73±0,2 <sup>1,2</sup>	3,37±0,4 <sup>2</sup>
Кріодеструкція + ВКРФ C <sub>60</sub>	1,91±0,23 <sup>1</sup>	2,60±0,21 <sup>1,2</sup>	3,42±0,41 <sup>2</sup>

Примітки. Відмінності статистично достовірні ( $p < 0,05$ ,  $n=10$ ): 1 – в порівнянні з інтактними тваринами; 2 – в порівнянні з кріодеструкцією та введенням фізіологічного розчину.

Активність каталази на 7 добу в усіх експериментальних групах була меншою за норму. При цьому, в контрольній групі значення показника було нижче за норму в 2,1 рази. В групах з введенням екстрактів або фулеренів C<sub>60</sub>

активність каталази достовірно не відрізнялась від даних, отриманих у щурів контрольної групи, та була нижче норми в 1,8 та 1,9 рази відповідно.

На 14 добу активність каталази також була менше норми в усіх групах, В контрольній групі активність ферменту була нижче за норму в 1,9 раз, а в групі з веденням екстракту або розчину фулерен – в 1,3 та 1,4 рази відповідно. Введення екстрактів або фулеренів  $C_{60}$  супроводжувалось, підвищенням активності, по відношенню до значень контрольної групи в 1,4 рази.

На 21 добу спостереження показник в групах щурів, яким вводили екстракти або фулеренів  $C_{60}$  не відрізнялися від значень в групі інтактних тварин. В той же час активність каталази в контрольній групі була нижче ніж у інтактних щурів в 1,8 рази.

Оскільки регуляторні пептиди є оркестрантами регенеративно-відновних процесів [179, 181], вони можуть стимулювати репаративні процеси в шкірі та прискорювати відновлення антиоксидантної системи.

## **6.2. Показники запалення і деструкції тканин в сироватці крові**

### **6.2.1. Вміст С-реактивного білка**

Суттєве значення мають гуморальні пептидні та поліпептидні медіаторні системи, що активуються шляхом каскадного протеолізу і забезпечують розвиток і генералізацію запальної реакції, а також різні клітини, що сприймають ці медіатори як сигнали активації [60].

С-реактивний білок був першим ідентифікованим представником групи білків гострої фази. Практично всі ці білки є нормальними складовими плазми крові, що мають різні фізико-хімічні властивості. Характерна риса, що об'єднує ці білки в одну групу – збільшення в крові їх концентрації у відповідь на цілий ряд стимулів (інфекційні хвороби, запалення, травма, некроз, пухлинний ріст), що призводять до тканинного пошкодження. Доведено, що підвищення рівня білків гострої фази у крові відбувається за



рахунок посилення їх синтезу печінкою з розвитком так званого синдрому системної запальної відповіді на системному рівні [160].

C-реактивний білок є вторинним регулятором системної запальної відповіді та імуномодулятором, який активує функцію клітин пухкої сполучної тканини, клітин ретикулоендотеліальної системи, а також клітин, які реалізують реакції вродженого імунітету шляхом посилення постачання їй субстратів для отримання енергії (синтезу АТФ). Після секреції C-реактивного білка, маючи спорідненість до фосфоліпідів, зв'язується з ліпопротеїнами дуже низької щільності і циркулює з ними в плазмі крові та міжклітинному середовищі. Більшість лікарів і науковців розглядають C-реактивний білок як маркер запалення. Запускаючи комплемент, адгезію, хемотаксис, фагоцитоз, модулюючи активність імунокомпетентних клітин і тромбоцитів C-реактивний білок фактично здійснює зв'язок між різними ланками запального процесу [107, 161].

На 7 добу спостереження концентрація C-реактивного білка в сироватці крові перевищувала норму в усіх групах. В контрольній групі перевищення показника становило 3,0 рази. (табл. 6.6).

На 14 добу в контрольній групі перевищення норми становило 2,5 рази, при введенні ЕКФШП та ВКРФ  $C_{60}$  – в 1,5 та 1,6 рази, відповідно. В порівнянні з контролем, введення екстрактів або фулеренів  $C_{60}$  знижувало рівень C-реактивного білка в 1,6 та 1,5 рази відповідно.

На 21 добу в контрольній групі перевищення значень норми C-реактивного білка становило 2,1 рази. В дослідних групах концентрація цього білка поверталася до норми. Показники C-реактивного білка при введенні ЕКФШП або ВКРФ  $C_{60}$  були нижче, порівняно з контролем, в 2,0 та 1,9 рази.

Протизапальний ефект фулеренів  $C_{60}$  ймовірно пояснюється їх здатністю до блокування дегрануляції тканових макрофагів та продукції цитокінів.[101, 80, 135, 72].

Концентрація С-реактивного білка в сироватці крові щурів (мг/мл)

Умови експерименту	Термін спостереження, доба		
	7	14	21
Інтактні тварини	1,21± 0,11		
Контроль (кріодеструкція + фізрозчин)	3,62± 0,37 <sup>1</sup>	2,98± 0,30 <sup>1</sup>	2,62± 0,26 <sup>1</sup>
Кріодеструкція + ЕКФШП	2,69± 0,23 <sup>1,2</sup>	1,85± 0,16 <sup>1,2</sup>	1,31± 0,12 <sup>2</sup>
Кріодеструкція + ВКРФ С <sub>60</sub>	2,74± 0,24 <sup>1,2</sup>	1,97± 0,19 <sup>1,2</sup>	1,39± 0,13 <sup>2</sup>

Примітки: Відмінності статистично достовірні ( $p < 0,05$ ,  $n=10$ ) : 1 – в порівнянні з інтактними тваринами; 2 – в порівнянні з кріодеструкцією та введенням фізіологічного розчину.

Пептидні медіаторні системи дуже різноманітні. Вони включають відповідні системи пептидів плазми крові, лейкокініни, цитокіни, лізосомальні і інші ферменти, катіонні неферментні білки, транспортні білки, нейропептиди, чинники росту клітин та ін. [273]. Практично всі пептидні медіатори, що забезпечують запальну відповідь на системному рівні, функціонально об'єднуються з продукуючими клітинами, і клітинами, на які вони впливають. З іншого боку, генералізація запалення на регіональному і організменному рівнях є обов'язковою підготовчою фазою включення адаптивної складової систем імунореактивності [273]. Отже, від того, як протікає ця фаза, багато в чому залежатиме функціонування всієї імунної системи на етапі розгортання запалення та участі в цьому процесі адаптивних систем.

### 6.2.2. Вміст церулоплазміну

Церулоплазмін це фермент, який виконує багато функцій, поряд з такими відомими, як транспорт і регулювання обороту міді в організмі та феррооксидазною активністю, він має антиоксидантну дію, є білком гострої фази запалення та регулює рівень деяких біогенних амінів в організмі [159, 158, 251, 191].

Важливими є властивості церулоплазміну, на підставі яких він був класифікований як білок гострої фази запалення. Встановлено, що рівень церулоплазміну в сироватці крові значно змінюється при різних інфекційних захворюваннях; гострому і хронічному запальних процесах, що супроводжуються деструктивними і некротичними змінами в тканинах; при злоякісному пухлинному рості, при спадкових ацерулоплазмінеміях, при ішемічній хворобі серця [158, 251].

Наростання рівня церулоплазміну на фоні інфекційно-запальних ускладнень відповідає уявленням про цей білок, як інтерлейкін-6 залежний реактант острофазних реакції крові. Результати зіставлення рівня церулоплазміну та інших досліджуваних показників узгоджуються із загальноприйнятими поглядами на роль процесів ПОЛ в патогенезі інфекційно-запальних захворювань. [38, 112].

Концентрація церулоплазміну на 7 добу значно збільшується, на відміну від активності супероксиддисмутази та каталази (рис. 6.5).

На 7 добу експерименту концентрація церулоплазміну в сироватці крові перевищує значення норми у всіх випадках. В контрольній групі тварин значення цього показника було вище в 3 рази.

В групах з введенням екстрактів або фулеренів  $C_{60}$  отримані значення перевищували значення інтактних тварин в 2,4 та 1,8 рази відповідно. При цьому, в порівнянні з даними щурів контрольної групи, при введенні екстрактів або фулеренів  $C_{60}$  показник знижувався в 1,3 та 1,7 рази відповідно.

Концентрація церулоплазміну в сироватці крові щурів (мг/л)

Умови експерименту	Термін спостереження, доба		
	7	14	21
Інтактні тварини	106,31±7,95		
Контроль (кріодеструкція + фізрозчин)	314,75±26,82 <sup>1</sup>	279,74±23,86 <sup>1</sup>	210,65±20,15 <sup>1</sup>
Кріодеструкція + ЕКФШП	252,65±20,17 <sup>1,2</sup>	200,42±18,00 <sup>1,2</sup>	121,90±10,38 <sup>2</sup>
Кріодеструкція + ВКРФ С <sub>60</sub>	190,49±17,50 <sup>1,2</sup>	210,57± 18,88 <sup>1,2</sup>	117,79±9,59 <sup>2</sup>

Примітки: Відмінності статистично достовірні ( $p < 0,05$ ,  $n=10$ ) : 1 – в порівнянні з інтактними тваринами; 2 – в порівнянні з кріодеструкцією та введенням фізіологічного розчину.

На 14 добу експерименту в контрольній групі рівень церулоплазміну перевищував норму у 2,6 рази. В групах з введенням екстрактів або фулеренів С<sub>60</sub> показники церулоплазміну залишалися вищими за норму в 1,9 та 2 рази відповідно. При цьому введення екстрактів або фулеренів С<sub>60</sub> супроводжувалося зниженням рівня цього показника, по відношенню до результатів в контрольній групі, в 1,3 та 1,7 рази відповідно.

На 21 добу експерименту рівень церулоплазміну в контрольній групі був вище значень у щурів інтактною групи в 2,0 рази, в той же час, в обох експериментальних групах середні значення цього показника не відрізнялися від норми. В порівнянні з контролем, в групах з введенням ЕКФШП або ВКРФ С<sub>60</sub> рівень церулоплазміну знижувався в 1,7 та 1,8 рази відповідно.

У відповідь на дію пошкоджуючих чинників - стрес, інфекція, травма, в тому числі кріодеструкція шкіри, запускається процес адаптації організму,

направлений на ліквідацію наслідків пошкодження і оптимізацію функціонування основних систем життєзабезпечення [201, 280, 244]. При цьому неминуче активується цитокінова мережа, яка інтегрує роботу імунної, нервової і ендокринної систем, що супроводжується багатократним збільшенням навантаження на її компоненти. Перш за все це відноситься до тих складових, які спеціалізовані на виконанні регуляторних функцій і забезпеченні адекватного гемопоезу.

Мобілізація можливостей організму для забезпечення адекватності відповіді і ліквідації наслідків дії ушкоджуючого чинника супроводжується загибеллю клітин і використанням біологічно активних молекул як регуляторної, так і ефекторної ланок імунної системи.

### **6.2.3. Вміст молекул середньої маси**

В клініці концентрація молекул середньої маси в крові є маркером наявності та виразності синдрому метаболічної інтоксикації в організмі [189]. Молекули середньої маси також присутні в організмі здорових людей в незначній кількості. Згідно даних [151]. молекули середньої маси це: пептиди, глікопептиди, продукти деградації фібриногену, фрагменти колагену, альбуміну, тромбіну, похідні ліпідів, фосфоліпідів та ін. Даний показник використовується як маркер інтоксикації різного генезу для визначення ступеня тяжкості патологічного процесу.

Досліджено ряд ефектів молекул середньої маси як в фізіологічних умовах, так і при патології. Загальновідоме значення молекул середньої маси як критерію ендогенної інтоксикації [218, 222].

Вважається, що значне підвищення вмісту молекул середньої маси в крові за різної патології виступає прогностично несприятливим показником, завдяки вираженому нейротоксичному впливу на структури головного мозку [151, 234, 263]. Молекули середньої маси порушують фізико-хімічні властивості клітинних мембран і роблять їх більш доступними для різного роду пошкоджуючих впливів. Проте, серед молекул середньої маси можуть

бути і регуляторні пептиди, які присутні в сироватці крові в нормі та можуть утворюватися в організмі у відповідь на травму чи при інших патологічних станах.

Концентрація молекул середньої маси в сироватці крові щурів залишається більше норми на всі терміни спостереження в усіх групах тварин.

На 7 добу перевищення норми в групах контролю, з введенням екстрактів або фулеренів становило 2,0 ,2,3 та 1,8 рази, відповідно. В групах з введенням екстрактів або фулеренів  $C_{60}$  концентрація молекул середньої маси достовірно не відрізнялась від даних, отриманих у щурів контрольної групи. (табл. 6.7).

Таблиця 6.7

Концентрація молекул середньої маси в сироватці крові щурів (у.о.)

Умови експерименту	Термін спостереження, доба		
	7	14	21
Інтактні тварини	0,32 ± 0,03		
Контроль (кріодеструкція + фізрозчин)	0,63 ± 0,05 <sup>1</sup>	0,77 ± 0,06 <sup>1</sup>	0,57 ± 0,05 <sup>1</sup>
Кріодеструкція + екстракти	0,73 ± 0,06 <sup>1</sup>	0,65 ± 0,05 <sup>1</sup>	0,55 ± 0,05 <sup>1</sup>
Кріодеструкція + фулерени	0,58 ± 0,06 <sup>1</sup>	0,55 ± 0,05 <sup>1,2</sup>	0,42 ± 0,04 <sup>1,2</sup>

Примітки: Відмінності статистично достовірні ( $p < 0,05$ ,  $n=10$ ): 1 – в порівнянні з інтактними тваринами; 2 – в порівнянні з кріодеструкцією та введенням фізіологічного розчину.

На 14 добу спостереження в контрольній групі цей показник був в 2,4 рази вище значень інтактної групи. В групах з введенням екстрактів або фулеренів  $C_{60}$  концентрація молекул середньої маси була вище норми в 2,0 та 1,7 рази, відповідно.

На 21 добу вміст молекул середньої маси перевищував норму в контрольній групі в 1,8 рази. При введенні екстрактів цей показник був вище нормальних значень в 1,7 рази. В той час, як в групі з введенням фулеренів  $C_{60}$  перевищення концентрації становило 1,3 рази від значень інтактних тварин..

Відносно показників молекул середньої маси в групі контролю, на 14 та 21 добу в групі з введенням фулеренів  $C_{60}$  цей показник знижувався в 1,4 рази. В групі з введенням екстракту концентрація молекул середньої маси достовірно не відрізнялась від контролю на 14 та 21 добу

#### **6.2.4. Рівень метаболітів оксиду азоту**

Останнім часом увагу дослідників в різних галузях біології та медицини привертає оксид азоту, який є одним з ключових ланок у патофізіології окисного стресу [182].

Оксид азоту виробляється різними клітинами організму: ендотеліоцитами, моноцитами, лімфоцитами, миоцитами, нейтрофілами, макрофагами, фібробластами, нейронами, гепатоцитами. На цей час вже доведено, що оксид азоту є одним з основних медіаторів протипухлинної дії активованих макрофагів [73].

Реакція оксиду азоту з киснем супроводжується утворенням стабільних кінцевих продуктів - нітриту і нітрату, які є непрямими маркерами концентрації оксиду азоту в організмі [26]. Оксид азоту сприяє генерації супероксидних аніонів, переоксидів ліпідів, лейкотрієнів, і це оксидантне середовище активує деструктивні процеси і індукує некроз тканин [247].

Відомо, що є важливим регулятором фізіологічних і біохімічних процесів, що ферментативним шляхом безперервно синтезується в організмі та є потенційно токсичною молекулою за певних обставин [199].

Клітина відповідь на вплив оксиду азоту є різноплановою. Баланс між регуляторними і цитотоксичними властивостями молекул середньої маси залежить від фенотипу клітини-мішені, концентрації оксиду азоту в тканинах, та редокс-стану молекул оксиду азоту та оточуючих молекул в тканинах [19, 199].

Радикал оксиду азоту в організмі вступає в реакцію з киснем, іонами металів і супероксидним аніон-радикалом, результатом останньої є утворення токсичного потужного оксид анта - пероксинітриту [87].

Оксид азоту виступає фізіологічним месенджером в мітохондріях, який регулює швидкість транспорту електронів. В залежності від концентрації в клітинах утвореного пероксинітриту та активних форм кисню може розвиватись мітохондріальна дисфункція, яка призводить до загибелі клітини через механізми апоптозу чи некроз [29].

Вміст нітратів в сироватці крові на 7 добу експерименту в усіх групах тварин був достовірно вище норми.

Так, в контрольній групі перевищення становило 1,7 рази, а в обох експериментальних групах - 1,5 рази. При цьому, значення отримані в експериментальних групах достовірно не відрізнялась від Даниних, отриманих у щурів контрольної групи

Так, на 14 добу спостереження в групі з введенням фізіологічного розчину вміст нітратів був вище норми в 1,9 рази, а в дослідних групах – в 1,4. В порівнянні з контролем, вміст нітратів в групах з введенням ЕКФШП та ВКРФ С<sub>60</sub> був меншим в 1,4 рази.

На 21 добу експерименту вміст нітратів в групі контролю був підвищеним в 1,2 рази відносно норми. Концентрація нітратів в сироватці крові поверталась до норми в групах з введенням ЕКФШП або ВКРФ С<sub>60</sub> та був нижче, відносно контролю в 1,2 рази. (табл. 6.8)



## Концентрація нітратів в сироватці крові щурів (мкмоль/мл)

Умови експерименту	Термін спостереження, доба		
	7	14	21
Інтактні тварини	45,16 ± 3,81		
Контроль (кріодеструкція + фізрозчин)	75,93 ± 7,35 <sup>1</sup>	85,42 ± 7,82 <sup>1</sup>	56,19 ± 5,31 <sup>1</sup>
Кріодеструкція + ЕКФШП	66,33 ± 6,44 <sup>1</sup>	62,07 ± 5,96 <sup>1,2</sup>	48,52 ± 4,98 <sup>2</sup>
Кріодеструкція + ВКРФ С <sub>60</sub>	65,51 ± 6,22 <sup>1</sup>	61,98 ± 5,79 <sup>1,2</sup>	46,85 ± 4,55 <sup>2</sup>

Примітки: Відмінності статистично достовірні ( $p < 0,05$ ,  $n=10$ ): 1 – в порівнянні з інтактними тваринами; 2 – в порівнянні з кріодеструкцією та введенням фізіологічного розчину.

Вміст нітритів сироватки крові на 7 добу експерименту в групі контролю та групі з введенням ЕКФШП фіксували вище норми в 1,3 рази. В групі з введенням фулеренів С<sub>60</sub> значення цього показника не відрізнялося від норми. При цьому, значення отримані в експериментальних групах достовірно не відрізнялась від даних, отриманих у щурів контрольної групи

Так, на 14 добу спостереження в групі з введенням фізіологічного розчину вміст нітритів був вище норми в 1,6 рази, а в дослідних групах – в 1,3 рази. В порівнянні з контролем, вміст нітритів в групах з введенням екстрактів та фулеренів був меншим в 1,3 рази.

На 21 добу експерименту вміст нітратів в групі контролю був підвищеним в 1,4 рази відносно норми. Вміст нітритів повертався до норми в групах з введенням екстрактів або фулеренів С<sub>60</sub> і був меншим в 1,2 рази за контрольні значення. (табл. 6.9)

Концентрація нітритів в сироватці крові щурів (кмоль/мл)

Умови експерименту	Термін спостереження, доба		
	7	14	21
Інтактні тварини	5,62 ± 0,47		
Контроль (кріодеструкція + фізрозчин)	7,52 ± 0,70 <sup>1</sup>	9,13 ± 0,89 <sup>1</sup>	7,90 ± 0,69 <sup>1</sup>
Кріодеструкція + ЕКФШП	7,34 ± 0,68 <sup>1</sup>	7,24 ± 0,67 <sup>1,2</sup>	6,57 ± 0,53 <sup>2</sup>
Кріодеструкція + ВКРФ C <sub>60</sub>	6,82 ± 0,65	7,15 ± 0,62 <sup>1,2</sup>	6,60 ± 0,57 <sup>2</sup>

Примітки: Відмінності статистично достовірні ( $p < 0,05$ ,  $n=10$ ): 1 – в порівнянні з інтактними тваринами; 2 – в порівнянні з кріодеструкцією та введенням фізіологічного розчину.

Узагальнюючи результати досліджень біохімічних показників в сироватці крові піддослідних тварин можна стверджувати, що кріодеструкція шкіри супроводжувалася розвитком окисного стресу, підвищенням вмісту первинних і вторинних продуктів ПОЛ на тлі пригнічення ферментативної ланки системи антиоксидантного захисту. При цьому, у щурів, яким вводили фізіологічний розчин (контрольна група), на всі строки спостерігалось збільшення вмісту дієнових кон'югатів і ТБК-активних продуктів та зниження активності супероксиддисмутази і каталази в сироватці крові тварин. При цьому, на всі строки експерименту, мало місце підвищення рівня таких маркерів запалення та деструкції тканин, як церуллоплазмін, С-реактивний білок, молекули середньої маси, нітрати та нітрити.

Застосування екстракту кріоконсервованих фрагментів шкіри поросят і водного колоїдного розчину фулерену C<sub>60</sub> у тварин з кріодеструкцією шкіри

сприяло відновленню балансу про- і антиоксидантної систем. Встановлено нормалізацію вмісту дієнових кон'югатів і ТБК-активних продуктів після введення водного колоїдного розчину фулерену  $C_{60}$  починаючи з 14 доби спостереження, та на 21 добу після застосування екстрактів; Спостерігалось достовірне збільшення активності супероксиддисмутази і каталази починаючи з 14 доби експерименту в обох вказаних групах. При цьому, на 21 добу середні значення активності супероксиддисмутази та каталази повертались до норми.

Оскільки фулерени  $C_{60}$  є потужними утилізаторами вільних радикалів, зниження рівня первинних та вторинних продуктів ПОЛ (показників окисного стресу) при введенні фулеренів  $C_{60}$  ймовірно пояснюється їх здатністю знижувати рівень активних форм кисню в сироватці крові та тканинах

Введення експериментальним тваринам екстрактів і фулеренів достовірно знижувало рівень маркерів деструктивно-запальних процесів в сироватці крові. Так, було відзначено зниження рівня С-реактивного білку відносно контролю вже з 7 добу експерименту, а також його нормалізацію на 21 добу експерименту в групах з введенням екстракту та фулеренів .

Застосування екстрактів або фулеренів  $C_{60}$  сприяло зниженню вмісту церулоплазмину відносно значень контрольної групи починаючи з 14 доби спостереження, тоді як на 21 добу вміст його повертався до нормальних значень.

Зниження вмісту молекул середньої маси в сироватці крові відбувалося на 14 та 21 добу експерименту після введення розчину фулеренів, тоді як ці значення в групі контролю та після введення екстрактів залишалися вище норми на всі строки спостереження.

Також, при введенні як екстрактів, так і фулеренів  $C_{60}$  після кріодеструкції шкіри відмічали зниження концентрації нітратів та нітритів з 14 доби експерименту відносно значень контрольної групи. На 21 добу

спостереження вміст нітратів та нітритів в дослідних групах повертався до значень норми і був менше, ніж в групі контролю.

Терапевтичні ефекти екстрактів кріоконсервованих фрагментів шкіри порожняк пов'язують регуляторною дією пептидів, які входять до їх складу. Ця дія спрямована насамперед на лімфоїдні клітини (лімфоцити), Вони здатні зв'язування з деякими специфічними рецепторами, змінювати експресію поверхневих клітин плазматичних мембран, впливаючи на процеси апоптозу.

Зниження маркерів деструкції та запалення в групі з введенням розчину фулеренів C<sub>60</sub> може пояснюватися не тільки їх антиоксидантними ефектами, але й здатністю блокувати дегрануляцію тканових макрофагів та впливати на продукцію і цитокінів.

Результати, наведені в даному підрозділі, опубліковані в роботах [165, 170, 169, 117].

## АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Загальновідомо, що низькотемпературний вплив є важливим чинником лікування багатьох захворювань, у тому числі захворювань шкіри. Широке застосування в дерматології знайшли методи кріохірургії - використання з лікувальною метою низьких температур.

Кріодеструкція патологічних утворень шкіри має давню історію і, на сьогоднішній день, є загально визнаним методом хірургічного лікування. Розробка нових і удосконалення існуючих підходів до використання кріодеструкції для лікування захворювань шкіри неможливі без проведення експериментів *in vivo*, що передбачає створення експериментальних моделей.

Нами була розроблена експериментальна модель процесів деструкції і репарації після кріоабляції шкіри у безшерстих щурів, відповідно до якої температура в зоні кріовпливу була нижче за  $-50^{\circ}\text{C}$  впродовж усього контакту шкіри з аплікатором кріоінструмента (120с).

Місцеві зміни в ділянці кріодеструкції виявлялися розвитком великого, як по глибині, так і по протяжності ранового дефекту, що характеризується наявністю зони первинного некрозу, демаркаційного лейкоцитарного валу, зони вторинного некрозу і тонкого шару грануляційної тканини. Виникнення і поширення в біологічних тканинах крижаного фронту, можна назвати основним етіологічним фактором первинного некрозу тканин. У ділянках, де температура тканин не опускалася нижче точки кріостійкості клітин, їх загибель, можна пояснити широким колом метаболічних порушень, викликаних опосередкованим впливом охолодження на функціонування клітин. Основними етіологічними факторами таких порушень можна назвати ішемічні розлади, викликані тромбозом судин мікроциркуляторного русла і запальну реакцію, що розвиваються після відігрівання тканин.

На системному рівні виявлено розвиток окисного стресу, що виявлявся підвищенням вмісту первинних і вторинних продуктів перекісного окислення ліпідів та зниженням активності супероксиддисмутази і каталази в сироватці

крові піддослідних тварин. Крім того, в сироватці крові було визначено підвищення вмісту церуллоплазміну і С-реактивного білка.

Отже, представлена експериментальна модель кріодеструкції шкіри у безшерстих щурів, характеризується місцевими і системними проявами деструкції і запалення і може бути використана для вивчення процесів, що виникають після кріохірургічного лікування новоутворень у людини.

Оцінка безпеки введення наночастинок в організм людини і тварин є ключовим моментом створення біологічно активних речовин на основі наноматеріалів. Клінічні та біохімічні дослідження крові є універсальними методами оцінки функціонального стану різних органів, їх використовують як скрінінг негативного впливу на організм..

Тому, в другому блоці досліджень нами були досліджені спектральні характеристики водних колоїдних розчинів ВКРФ  $C_{60}$  двома найбільш часто вживаними в медичній практиці розчинниками - водою для ін'єкцій і фізіологічним розчином. Було встановлено, що на спектрах поглинання ВКРФ  $C_{60}$ , розведеного водою для ін'єкцій, максимуми смуг поглинання реєстрували при 208, 265 і 347 нм, що узгоджується з даними про спектри немодифікованого фулерена  $C_{60}$ , описаними в літературі. При застосуванні в якості розчинника ВКРФ  $C_{60}$  фізіологічного розчину ширина смуг поглинання збільшувалася, їх інтенсивність знижувалася, а максимуми зміщувалися в більш довгохвильову область на 16 нм. Саме тому в наступних експериментах *in vivo* для розведення ВКРФ  $C_{60}$  перед застосуванням ми використовували воду для ін'єкцій.

Нами було показано, що ВКРФ  $C_{60}$  в концентрації 34,7 мкмоль/л при інтраперитоніальному введенні щурам в разовій дозі 1 мг/кг проявляв певну токсичність. А саме, викликав підвищення активності АСТ і АЛТ в сироватці крові в 1,9 та 2 рази, і помірний анізоцитоз: збільшувалося стандартне відхилення відносної ширини розподілу еритроцитів за об'ємом на в 1,2 і 1,3 рази відповідно на 1 добу і 5 добу. Застосування ВКРФ  $C_{60}$  в концентрації 34,7 мкмоль/л на 1 добу експерименту супроводжувалося зворотнім

лейкоцитозом (кількість лейкоцитів підвищується в 1,4 рази) з підвищенням вмісту сегментоядерних нейтрофілів в 1,6 рази, На 5 добу спостереження встановлено збільшення стандартного середнього об'єму еритроцитів в 1,1 рази, значущих змін біохімічних показників не виявлено

Показано, що інтраперитоніальне введення розчину фулеренів  $C_{60}$  в концентрації 173 мкмоль/л супроводжувалось помірним анізоцитозом, збільшувалося стандартне відхилення відносної ширини розподілу еритроцитів за об'ємом на 1,1 і 1,2 рази на 1 добу і 5 добу відповідно. Коефіцієнт варіації відносної ширини розподілу еритроцитів за об'ємом зростав в 1,2 рази на 5 добу. Біохімічні показники сироватки крові не змінювались на всі строки експерименту.

Відмінності в біологічних ефектах після внутрішньоочеревинного введення ВКРФ  $C_{60}$  в різних концентраціях ми пояснюємо їх агрегацією і випадінням в осад при введенні більш концентрованого розчину, внаслідок чого не забезпечувалось надходження цільової дози фулеренів в системний кровообіг. Це підтверджується наявністю темних плям на поверхні очеревини при макроскопічній оцінці місця введення ВКРФ  $C_{60}$  в концентрації 173 мкмоль/л. Тому у подальших дослідженнях ми використовували ВКРФ  $C_{60}$  з концентрацією 34,7 мкмоль/л.

Враховуючи зворотні токсичні ефекти після внутрішньоочеревинного введення ВКРФ  $C_{60}$ , в подальших дослідженнях нами було вирішено знизити разову дозу ВКРФ  $C_{60}$  до 0,1 мг/кг маси тіла тварини.

В третьому блоці ми дослідили вплив внутрішньоочеревинного введення ЕКФШП та ВКРФ  $C_{60}$  на загоєння ран після кріодеструкції, використовуючи розроблену нами експериментальну модель процесів деструкції і репарації тканин після кріоабляції шкіри. Щурам першої експериментальної групи після кріодеструкції в черевну порожнину вводили водний колоїдний розчин фулеренів  $C_{60}$  в концентрації 34,7 мкмоль/л в разовій дозі 0,1 мг/кг маси тіла, щоденно, протягом 5 днів. В другій експериментальній групі тваринам після кріодеструкції вводили екстракт кріоконсервованих фрагментів шкіри

поросят в дозі 0,5 мг/кг маси тварини в черевну порожнину один раз на добу, щоденно, протягом всього експерименту. В контрольній групі після кріодеструкції вводили фізрозчин. На 7, 14, 21 добу спостереження вивчали макроскопічну картину ран, проводили планіметричне та комплексне гістологічне дослідження з морфометрією та імуногістохімічне дослідження шкіри з підлеглими м'якими тканинами. Для імуногістохімічного дослідження використовували моноклональні антитіла до p53 і Ki-67. Розраховували індекс співвідношення проліферації до апоптозу, для чого ділили абсолютну кількість Ki-67 на абсолютну кількість p53 позитивних клітин. В сироватці крові визначали такі показники ПОЛ: рівень дієнових кон'югатів, ТБК-активних продуктів, активності супероксиддисмутази, каталази; маркери деструкції і запалення: концентрації церулоплазміну, С-реактивного білка, молекул середньої маси, нітратів та нітритів.

Підсумовуючи данні макроскопічного дослідження, у щурів усіх груп на 7 добу після кріодеструкції формувалася чітко виражена зона кріонекрозу, площа якого достовірно не відрізнялась між групами. В групах з введенням ЕКФШП або ВКРФ С<sub>60</sub> на 7 добу після кріодеструкції місцеві ознаки запалення були менш виражені: був відсутній набряк, інфільтрація та гнійні виділення, тоді як в групі контролю спостерігалася помірна гіперемія і набряк, інфільтрація країв ран, гнійні виділення, а місцями відмежовані скупчення гною. На 14-ту добу експерименту середнє значення площі ран в групі з введенням фулеренів було меншим в 1,6 рази, ніж в групі з введенням екстрактів, та в 1,7 рази меншим за показник в групі контролю. На 21-шу добу спостереження середнє значення площі ранових дефектів було меншим в обох експериментальних групах, у порівнянні з контрольною групою, а саме - в 1,9 рази в групі з введенням екстрактів, та в 1,4 рази - в групі з використанням фулеренів. Таким чином, введення ВКРФ С<sub>60</sub> та ЕКФШП після кріодеструкції шкіри достовірно прискорювало темп загоєння ран у безшерстих щурів,.



Узагальнюючи дані гістологічного дослідження з морфометрією можна стверджувати, що загоєння ранових дефектів в контрольній групі щурів проходило повільніше, ніж в групах де після кріодеструкції вводили ЕКФШП або ВКРФ С<sub>60</sub>. Введення ЕКФШП і ВКРФ С<sub>60</sub> мало подібний ефект, але фулерени показали більш виражений стимулюючий вплив на репаративні процеси ран, що загоюються. Проте, в групі з екстрактами на 21 добу спостереження було відмічено формування придатків шкіри, що свідчить про органотиповий тип репарації ранового дефекту. В групі з введенням ВКРФ С<sub>60</sub> товщина епітеліального шару в крайових відділах ран була достовірно вище ніж в групі з введенням ЕКФШП на 7 і 14 добу спостереження. Проте, найбільша кількість і вираженість акантотичних розростань епідермісу спостерігалася в групі з введенням ВКРФ С<sub>60</sub>. Крім того, в групі з введенням ВКРФ С<sub>60</sub> було зафіксовано підвищення мітотичної активності клітин і помірно виражені диспластичні зміни. При аналізі товщини шарів ранового дефекту більш виражений стимулюючий вплив ВКРФ С<sub>60</sub> на репаративні процеси порівняно з ЕКФШП було встановлено протягом всього експерименту: на 7 добу відмічено зменшення вираженості шару вторинного некрозу і збільшення шару грануляційної тканини; на 14 добу – підвищення товщини шарів демаркаційного лейкоцитарного валу і грануляційної тканини; на 21 добу – збільшення шару грануляційної тканини. Після введення ВКРФ С<sub>60</sub> було відзначено більший вміст судинного компонента і більшу кількість макрофагів, лімфоцитів і клітин фібробластичного диферону в грануляційній тканині в усі терміни спостереження, що приводило до прискорення темпів загоєння ранового дефекту.

Результати проведеного імуногістохімічного дослідження з моноклональними кролячими антитілами до маркерів Ki-67 та p53 показали, що у тварин контрольної групи в тканинах навколо ранового дефекту активність апоптотичних і проліферативних процесів зростала в порівнянні з даними інтактної групи. Індекс співвідношення проліферації до апоптоза в епітеліальному шарі контрольної групи дорівнював 3,5, 2,5 і 2,6; в дермі,

гіподермі і м'язовій тканині – 2,6, 2 і 1,8 на 7, 14 і 21 добу експерименту, відповідно. В грануляційній і сполучній тканині цей індекс складав 1,8 на всі строки спостереження. Виявлена активізація процесів проліферації та апоптозу обумовлена, процесами регенерації, спрямованими на відновлення пошкоджених структур і підтримку цілісності шкіри з підлягаючими тканинами. Також, зазначена нами індукція апоптозу, певною мірою обумовлена низькотемпературним впливом.

У щурів, яким після кріодеструкції внутрішньочеревинно вводили ЕКФШП, на всі строки спостереження відзначається активізація процесів апоптозу та проліферації клітинних елементів в усіх шарах ранового дефекту. Індекс співвідношення процесів проліферації до процесів апоптоза в епітеліальному шарі даної групи дорівнював 2,3, 2,2 і 2,1; в дермі, гіподермі і м'язовій тканині – 2, 2 і 1,8; в грануляційній і сполучній тканинах – 1,8, 1,8 та 1,7 на 7, 14 і 21 добу експерименту, відповідно.

Використання ЕКФШП після кріодеструкції, з огляду на виявлену збалансованість процесів апоптозу та проліферації, наведені результати морфологічного дослідження та в подальшому, тобто на більш пізніших термінах експерименту, призведе до органотипової регенерації з практично повним відновленням нормальної будови шкіри. Таким чином, регенерація тканин у щурів після кріодеструкції шкіри та введення ЕКФШП є більш органотиповою, отже є більш «якісною».

При введенні ВКРФ С<sub>60</sub> підвищувалась абсолютна кількість Ki-67 позитивних клітин у всіх шарах ранового дефекту та на всі строки спостереження, при цьому ці показники були вище ніж в групі з введенням ЕКФШП: в епітелії та шарі грануляційної тканини – на 7 добу, в дермі, гіподермі, м'язовій тканині – на всі строки спостереження. Застосування ВКРФ С<sub>60</sub> підвищувало абсолютну кількість P53-позитивних клітин на 7 добу експерименту в дермі, гіподермі, м'язовій тканині, а також в грануляційній і сполучній тканинах, в той же час ці значення були нижчі, ніж в групі з введенням ЕКФШП. В епітеліальному шарі на 21 добу активність процесів

апоптозу була нижча, ніж в групі контролю та групі з введенням ЕКФШП. В групі з введенням ВКРФ С<sub>60</sub> індекс співвідношення проліферації до апоптоза дорівнював: в епітеліальному шарі – 5,5, 5,5 і 8,7; в дермі, гіподермі і м'язовій тканині – 3,8, 3,8 і 3,7; в грануляційній і сполучній тканинах – 3, 2,7 і 2,8 – на 7, 14 і 21 добу експерименту, відповідно

Внутрішньочеревне введення ВКРФ С<sub>60</sub> після кріодеструкції викликає стимуляцію проліферативного потенціалу клітин фібробластичного ряду зі зниженням їх апоптотичної активності, що в подальшому може призвести до надмірного формування сполучної тканини і утворення келоїдних рубців [256]. Фібробласти зони росту келоїдних рубців, мають властивості зростаючої клітинної популяції з високим антиапоптотичним індексом і індексом проліферації, які не диференціюються в належній для дефінітивної шкіри мірі. [274]. Одночасна наявність морфологічних ознак дисплазії, підвищеної проліферативної активності і зниженої апоптотичної активності клітин епітелію в групі з введенням ВКРФ С<sub>60</sub> можна розглядати як потенційну передумову розвитку епітеліальних новоутворень

Узагальнюючи результати досліджень біохімічних показників в сироватці крові піддослідних тварин можна стверджувати, що кріодеструкція шкіри супроводжувалася розвитком окисного стресу, підвищенням вмісту первинних і вторинних продуктів ПОЛ на тлі пригнічення ферментативної ланки системи антиоксидантного захисту. При цьому, на всі строки експерименту, мало місце підвищення рівня таких маркерів запалення та деструкції тканин, як церуллоплазмін, С-реактивний білок, молекули середньої маси, нітрати та нітроти. Застосування екстракту кріоконсервованих фрагментів шкіри поросят і водного колоїдного розчину фулерену С<sub>60</sub> у тварин з кріодеструкцією шкіри сприяло відновленню балансу про- і антиоксидантної систем. Встановлено нормалізацію вмісту дієнових кон'югатів і ТБК-активних продуктів після введення водного колоїдного розчину фулерену С<sub>60</sub> починаючи з 14 доби спостереження, та на 21 добу після застосування екстрактів; Спостерігалось достовірне збільшення

активності супероксиддисмутази і каталази починаючи з 14 доби експерименту в обох вказаних групах. При цьому, на 21 добу середні значення активності супероксиддисмутази та каталази повертались до норми. Оскільки фулерени  $C_{60}$  є потужними утилізаторами вільних радикалів. Зниження рівня первинних та вторинних продуктів ПОЛ (показників окисного стресу) при введенні фулеренів  $C_{60}$  ймовірно пояснюються їх здатністю знижувати рівень активних форм кисню в сироватці крові та тканинах. Введення експериментальним тваринам екстрактів і фулеренів достовірно знижувало рівень маркерів деструктивно-запальних процесів в сироватці крові. Так, було відзначено зниження рівня С-реактивного білку відносно контролю вже з 7 доби експерименту, а також його нормалізацію на 21 добу експерименту в групах з введенням екстракту та фулеренів. Застосування екстрактів або фулеренів  $C_{60}$  сприяло зниженню вмісту церулоплазмину відносно значень контрольної групи починаючи з 14 доби спостереження, тоді як на 21 добу вміст його повертався до нормальних значень. Зниження вмісту молекул середньої маси в сироватці крові відбувалося на 14 та 21 добу експерименту після введення розчину фулеренів, тоді як ці значення в групі контролю та після введення екстрактів залишалися вище норми на всі строки спостереження. Також, при введенні як екстрактів, так і фулеренів  $C_{60}$  після кріодеструкції шкіри відмічали зниження концентрації нітратів та нітритів з 14 доби експерименту відносно значень контрольної групи. На 21 добу спостереження вміст нітратів та нітритів в дослідних групах повертався до значень норми і був менше, ніж в групі контролю. Терапевтичні ефекти екстрактів кріоконсервованих фрагментів шкіри порожать пов'язують регуляторною дією пептидів, які входять до їх складу. Зниження маркерів деструкції та запалення в групі з введенням розчину фулеренів  $C_{60}$  може пояснюватися не тільки їх антиоксидантними ефектами, але й здатністю блокувати дегрануляцію тканових макрофагів, впливати на рівень продукції цитокінів та їх активність..

## ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі представлено теоретичне узагальнення і нове вирішення актуальної наукової задачі кріомедицини щодо оптимізації лікування ран після кріоабляції шкіри, шляхом застосування комплексу регуляторних біоорганічних сполук у складі екстракту кріоконсервованих фрагментів шкіри поросят та, в порівняльному аспекті, водного колоїдного розчину фулерену  $C_{60}$ . Показано, що за кріодеструкції шкіри екстракт і розчин фулерену мають подібні ефекти як на місцевому, так і на системному рівні і можуть знайти застосування при розробці нових патогенетично обґрунтованих підходів в лікуванні ран. Втім, введення фулерену на відміну від екстрактів викликало дисбаланс проліферації і апоптозу клітин, що несе ризик утворення келоїдних рубців а також виникнення пухлин епітеліального походження.

1. Розроблено експериментальну модель процесів деструкції і репарації тканин після кріоабляції шкіри у безшерстих щурів, придатну для вивчення процесів, що виникають після кріохірургічного лікування новоутворень. Параметри охолодження відповідали вимогам до кріохірургічних технологій лікування: методика кріовпливу передбачала різке зниження температури в місці контакту аплікатора і шкіри до  $-75,5 \pm 7,9^\circ\text{C}$  з поступовим підвищенням температури протягом 120 с до  $-59,1 \pm 6,5^\circ\text{C}$ . Показано місцеві і системні прояви деструкції і запалення, а саме: великий рановий дефект з зонами первинного, внаслідок прямого деструктивного впливу заморожування, і вторинного, в результаті гемодинамічних змін, некрозу тканин та демаркаційного лейкоцитарного валу; окисний стрес, що виявлявся підвищенням вмісту первинних і вторинних продуктів ПОЛ та зниженням активності супероксиддисмутази і каталази в сироватці крові; підвищення вмісту церулоплазміну і С-реактивного білка в сироватці крові.

2. Біологічні ефекти введення в черевну порожнину водного колоїдного розчину фулерену  $C_{60}$  в дозі 1мг/кг залежать від його концентрації. Розчин з

концентрацією 173 мкмоль/л має меншу активність ніж розчин з концентрацією 34,7 мкмоль/л, що пов'язане з його меншою біодоступністю внаслідок агрегації і випадіння фулерену в осад в місці введення. Введення розчину з концентрацією 34,7 мкмоль/л викликало зворотне підвищення вмісту лейкоцитів в 1,4 рази з підвищенням вмісту сегментоядерних нейтрофілів та зростання активності аспартатамінотрансферази і аланінамінотрансферази в 1,9 та 2 рази в крові щурів, а також помірний анізоцитоз еритроцитів на всі строки спостереження. Застосування розчину фулерену в концентрації 173 мкмоль/л супроводжувалось лише помірним анізоцитозом еритроцитів на всі строки спостереження.

3. Введення екстракту кріоконсервованих фрагментів шкіри поросят і водного колоїдного розчину фулерену  $C_{60}$  прискорювало загоювання ран після кріодеструкції шкіри, що проявлялося зменшенням деструкції і запалення і збільшенням проявів репарації тканин на макро- і мікроскопічному рівні. Проте, фулерен показав більший стимулюючий ефект, що проявлялося: більшою товщиною епітелію і шару грануляційної тканини, меншою вираженістю шару вторинного некрозу на 7 добу; меншою площею ран, більшою товщиною епітелію, шарів демаркаційного лейкоцитарного валу і грануляційної тканини на 14 добу; більшою вираженістю шару грануляційної тканини на 21 добу, а також більшим вмістом судин, макрофагів, лімфоцитів і клітин фібробластичного диферону в грануляційній тканині в усі терміни спостереження. Втім, введення фулерену призводило до гіперстимуляції мітотичної активності епітеліоцитів, подекуди, з помірними ознаками дисплазії. Регенерація тканин після застосування екстракту була більш органотиповою, що проявлялося формуванням додатків шкіри на 21 добу спостереження.

4. Застосування після кріодеструкції шкіри екстракту кріоконсервованих фрагментів шкіри поросят супроводжувалось збалансованою активізацією проліферації і апоптозу клітин. Стимулюючий ефект водного колоїдного розчину фулерену  $C_{60}$  на процеси проліферації

клітин не відрізнявся від ефекту екстрактів або був вищим. Це проявлялося: більшою представленістю маркеру проліферації Ki-67 в епітелії і грануляційної тканини на 7 добу; в дермі, гіподермі і м'язовій тканині – на всі строки спостереження. Вираженість апоптозу після введення фулерену не відрізнялась або була нижче ніж після застосування екстракту. Це проявлялося меншою кількістю клітин з маркером апоптозу p53: в епітелії на всі строки; в дермі, гіподермі і м'язовій тканині – на 14 і 21; в грануляційній і сполучній тканинах – на 21 добу спостереження. Дисбаланс процесів проліферації і апоптозу після введення фулерену несе ризик утворення келоїдних рубців а також, враховуючи диспластичні зміни в епітелії, виникнення пухлин епітеліального походження.

5. Ведення екстракту кріоконсервованих фрагментів шкіри поросят і водного колоїдного розчину фулерену C<sub>60</sub> після кріодеструкції шкіри знижувало в сироватці крові рівень маркерів деструктивних та запальних процесів. Встановлено нормалізацію вмісту дієнових кон'югатів і ТБК-активних продуктів після введення розчину фулеренів починаючи з 14 доби спостереження, та на 21 добу після застосування екстрактів; підвищення активності супероксиддисмутази і каталази на 14 добу, та її нормалізацію на 21 добу експерименту після введення екстрактів і фулеренів. Встановлено зниження показників С-реактивного білка і церулоплазміну після кріодеструкції шкіри з їх нормалізацію на 21 добу, а також зниження вмісту нітратів та нітритів на 14 і 21 добу спостереження після введення екстрактів і фулеренів; зниження вмісту молекул середньої маси на 14 та 21 добу після введення фулеренів.

**СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ**

1. Abdullah A, McCauley RL, Herndon DN. Stimulation of human dermal fibroblasts with interleukin 2. *J Burn Care Rehabil.* 1991; 12(1): 23–25.
2. Abramovits W, et al. *Dermatological Cryosurgery and Cryotherapy.* Springer-Verlag: London; 2016. doi 10.1007 / 978-1-4471-6765-5\_4
3. Ahmed MR, Basha SH, Gopinath D, Muthusamy R, Jayakumar R. Initial upregulation of growth factors and inflammatory mediators during nerve regeneration in the presence of cell adhesive peptide-incorporated collagen tubes. *Journal of the Peripheral Nervous System.* 2005; 10(1): 17–30.
4. Andrew JTG, Stark J, Chan C. Understanding specificity and sensitivity of T-cell recognition. *Trends in Immunology.* 2005; 26(12): 653–659.
5. Andrews MD. Cryosurgery for common skin conditions. *Am Fam Physician.* 2004; 69(10): 2365–2372.
6. Arford S. Treatment of frostbite: a cold-induced injury. *J Wound Ostomy Continence Nurs.* 2008; 35(6): 625–630.
7. *Atlas of Cryosurgery.* Ed. N. Korpan. New York; Wien: Springer; 2002. 513 p.
8. Avdeyev MV, Aksenov VL, Tropin TV. [Models of clustering of fullerenes in solutions]. *Zhurnal Fizicheskoy Khimii.* 2010; 84(8): 1405–16. Russian.
9. Baker GL, Gupta A, Clark ML, Valenzuela BR, Staska LM, Harbo SJ, et al. Inhalation toxicity and lung toxicokinetics of C<sub>60</sub> fullerene nanoparticles and microparticles. *Toxicol Sci.* 2008; 101(1): 122–31.
10. Baust JG, Gage AA, Bjerklund Johansen TE, Baust JM. Mechanisms of cryoablation: clinical consequences on malignant tumors. *Cryobiology.* 2014; 68(1): 1–11.
11. Baust JG, Snyder KK, Santucci KL, Robilotto AT, Van Buskirk RG, Baust JM. Cryoablation: physical and molecular basis with putative immunological consequences. *Int J Hyperthermia.* 2019 Nov; 36(1): 10–16. doi: 10.1080/02656736.2019.1647355



12. Berger CN, Donne Le P, Windemann H. Use of substances of animal origin in pharmaceuticals and compliance with the TSE-risk guideline – a market survey. *Biologicals*. 2005; 33(1): 1–7.
13. Bepalova IG, Rogoza LA, Galchenko SY, Sandomyrsky BP. Extracts of cryopreserved fragments of pig spleen and piglet skin affect the healing of cold wounds in rats. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine*. 2015; 25(2): 151–161.
14. Bilgic S, Ozkan H, Ozenc S, et al. Treating frostbite *Can FamPhysician*. 2008 Mar; 54(3): 361–3.
15. Blanchard JA, Barve S, Joshi-Barve S, et al. Cytokine production by CAPAN-1 and CAPAN-2 cell lines. *Dig Dis Sci*. 2000; 45(5): 927–932.
16. Breitbart EW. Cryosurgery: method and results. *Hautarzt*. 1983; 34(12): 612–619.
17. Brown GL, Nanney LB, Griffen J. Enhancement of wound healing by topical treatment with epidermal growth factor. *N Engl J Med*. 1989; 321(2): 76–79.
18. Bulavin L, Adamenko I, Prylutsky Yu, Durov S, Graja A, Bogucki A, et al. Structure of fullerene C<sub>60</sub> in aqueous solution. *Phys Chem Chem Phys*. 2000; 2(8): 1627–9.
19. Burlaka AP, Sydoryk EP. [Radical oxygen species and nitric oxide in tumor process]. Kyiv: Naycova Dymka; 2006. Ukrainian.
20. Burlaka AP, Sidorik EP, Prylutska SV, et al. Catalytic system of the reactive oxygen species on the C<sub>60</sub> fullerene basis. *Exp Oncol*. 2004; 26(4): 326–327.
21. Byelinska IV, Kuznietsova HM, Dziubenko NV, et al. Effect of C<sub>60</sub> fullerenes on the intensity of colon damage and hematological signs of ulcerative colitis in rats. *Materials Science and Engineering*. 2018; 93: 505–517.
22. Bykov VL, Leontiyeva IV, Kulayeva VV, et al. [Tissue, cell and molecular biology of hemostasis and reepithelialization in the healing wounds of the oral mucosa]. *Morphology*. 2019; 156 (6): 64–76. Russian.

23. Castro E, Hernandez Garcia A, Zavala G, Echegoyen L. Fullerenes in biology and medicine. *J Mater Chem B*. 2017; 5(32): 6523–6535. doi: 10.1039/C7TB00855D
24. Chalmers IM. Cold injury in 2 patients with connective tissue disease-frostbite arthritis plus. *J Rheumatol*. 2000; 27(10): 2526–2529.
25. Chang X, Vikesland PJ. Effects of dilution on the properties of C60. *Environ Pollut*. 2013; 181: 51–9.
26. Chatterjee A, Catravas JD. Endothelial nitric oxide (NO) and its pathophysiologic regulation. *Vascul Pharmacol*. 2008; 49 (4–6): 134–140.
27. Cranwell WC, Sinclair R. Optimising cryosurgery technique. *Aust Fam Physician*. 2017; 46(5): 270–274. PMID: 28472571.
28. De Graaf M, Geerlinks A, Koster HJ. Incubation at 37°C prior to cryopreservation decreases viability of liver slices after cryopreservation by rapid freezing. *Cryobiology*. 2002; 45(1): 1–9.
29. Dellinger AL, Cunin P, Lee D, et al. Inhibition of inflammatory arthritis using fullerene nanomaterials. *PLoS One*. 2015; 10(4):e0126290. doi:10.1371/journal.pone.0126290.
30. Dragojevic-Simica V, Jacevic V, Dobric S, et al. Anti-inflammatory activity of fullereneol c60(oh)24 nanoparticles in a model of acute inflammation in rats. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*. 2011; 6(2): 819–827.
31. Du Clos TW. Function of C-reactive protein. *Ann Med*. 2000; 32(4): 274–278.
32. Dube' N, et al. Genetic ablation of protein tyrosine phosphatase 1B accelerates lymphomagenesis of p53-null mice through the regulation of B-cell development. *Cancer Res*. 2005; 65(21): 10088–95.
33. Elimelech M, Gregory J, Jia X, Williams RA. Particle deposition and aggregation: measurement, modeling and simulation; Butterworth-Heinemann: Oxford, U.K.; 1995.
34. El-Wahsh M, Fuller B, Davidson B, et al. Hepatic cold hypoxia and oxidative stress: implications for ICAM-1 expression and modulation by

glutathione during experimental isolated liver preservation. *Cryobiology*. 2003; 47(2): 165–173.

35. Eming SA, Whitsitt JS, He L. Particle-mediated gene transfer of PDGF isoforms promotes wound repair. *J Invest Dermatol*. 1999; 112(3): 297–302.

36. Erinjeri JP, Clark TW. Cryoablation: mechanism of action and devices. *J Vasc Interv Radiol*. 2010; 21(8): S187–91. doi: 10.1016/j.jvir.2009.12.403.

37. Farax CS, Savaget NW. Cryotherapy for treatment of oral lesions. *Austral Dent J*. 2006; 51(1): 2–5.

38. Fisher AE, Naughton DP. Therapeutic chelators for the twenty first century: new treatments for iron and copper mediated inflammatory and neurological disorders. *Curr Drug Deliv*. 2005; 2(3): 261–268.

39. Florin-Christensen A, Roux ME, Marquez MG, et. al. Compartmentalisation between gut and lung mucosae in a model of secondary immunodeficiency: effect of thymomodulin. *Int. J Immunopathol Pharmacol*. 2003; 16(2): 151–156.

40. Franzen LE, Ghassemifar MR, Lonnberg B, et. al. Stimulation of protracted connective tissue repair in normal mice by transforming growth factor beta 1. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg*. 1996; 30(4): 267–273.

41. Gage A, Baust J. Mechanisms of tissue injury in cryosurgery. *Cryobiology*. 1998; 37(3): 171–186.

42. Gage AA, Baust JM, Baust JG. Experimental cryosurgery investigations in vivo. *Cryobiology*. 2009; 59(3): 229–243.

43. Gangy A. Percutaneous Spinal Tumor Management. *Neuroradiology Journal*. 2009; 22(1): 131–139.

44. Gharbi N, Pressac M, Hadchouel M, Szwarc H, Wilson S, Moussa F. Fullerene is a powerful antioxidant in vivo with no acute or subacute toxicity. *Nano Lett*. 2005; 5: 2578–2585.

45. Goltsev A, Bondarovich M, Babenko N, Gaevska Y, Dubrava T, Ostankov M. Use of nanomaterials in cryobiology and cryomedicine. *Problems of*

Cryobiology and Cryomedicine. 2020; 30(4): 313–330.  
doi:<https://doi.org/10.15407/cryo30.04.313>.

46. Gong SL, Dong LH, Liu GW, et al. Effects of corticosterone, cAMP, cGMP, Ca<sup>2+</sup>, and protein kinase C on apoptosis of mouse thymocytes induced by X-ray irradiation. *Biomed Environ Sci*. 2008; 21(2): 167–172.

47. Griswold JA. White blood cell response to burn injury. *Semin Nephrol*. 1993; 13(4): 409–415.

48. Grohn KJ, Moyer BS, Wortel DC, Fisher CM, Lumen E, Bianchi AH, Kelly K, Campbell PS, Hagrman DE, Bagg RG, Clement J, Wolfe AJ, Basso A, Nicoletti C, Lai G, Provinciali M, Malavolta M, Moody KJ. C60 in olive oil causes light-dependent toxicity and does not extend lifespan in mice. *Geroscience*. 2020 Oct 29. doi: 10.1007/s11357-020-00292-z

49. Grynyuk II, Prylutska SV, Slobodyanik NS, Chunikhin OYu, Matyshevska OP. The aggregate state of C<sub>60</sub>-fullerene in various media. *Biotechnologia Acta*. 2013; 6(6): 71–6.

50. Herndon DN, Spies M. Modern burn care. *J Trauma*. 2004; 57(1): 37–41.

51. Horie M, Nishio K, Kato H, Shinohara N, Nakamura A, Fujita K, Kinugasa S, Endoh S, Yamamoto K, Yamamoto O, Niki E, Yoshida Y, Iwahashi H. In vitro evaluation of cellular responses induced by stable fullerene C<sub>60</sub> medium dispersion. *J. Biochem*. 2010; 148: 289–298.

52. Iloyd AR, Johnston J. Cytokines and cytokine receptors in health and disease. *Cytokine*. 1993; 5(5): 399–405.

53. Injac R, Perse M, Cerne M, et al. Protective effects of fulleranol C<sub>60</sub> (OH)<sub>24</sub> against doxorubicin-induced cardiotoxicity and hepatotoxicity in rats with colorectal cancer. *Biomaterials*. 2009 Feb; 30(6): 1184–96. doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.10.060.

54. Jorgensen PH. Growth hormone, skin and wound healing - experimental studies in the rat. *APMIS Suppl*. 1997; 72: 1–54.

55. Kanzler MH, Gorsulowsky DC, Swanson NA. Basic mechanisms in the

healing cutaneous wound. *J Dermatol Surg Oncol*. 1986; 12(11): 1156–1164.

56. Kerna NA, Flores JV, Pruitt KD, Nwokorie U, Holets H. The application of fullerene derivatives in human nutrition: brain health, immunity, longevity, quality of life, skin tone, sports performance, vitality, and weight loss. *EC Nutrition*. 2020 SEP 15; 15.11: 01–06 doi: 10.31080/ecnu.2020.15.00873

57. Kinoshita M, Seki S, Ono S. Paradoxical effect of IL-18 therapy on the severe and mild *Escherichia coli* infections in burn- injured mice. *Ann Surg*. 2004; 240(2): 313–320.

58. Kleptsyna YS, Afonina IA. [Influence of different doses of cadmium on biochemical and hematological parameters of the blood laying hens]. *Modern Problems of Science and Education*. 2014; 4. Russian.

59. Kobzar OL, Trush VV, Tanchuk VYu, Vovk AI. Inhibitory potential of polyhydroxylated fullerenes against protein tyrosine phosphatase 1B. *Ukr Biochem J*. 2015; 87(4): 24–31.

60. Kolonin MG, Sun J, Kim-Anh Do, et. al. Synchronous selection of homing peptides for multiple tissues by in vivo phage display. *The FASEB Journal*. 2006; (20): 979–981.

61. Kovalov GO, Vlasov OO, Myroshnychenko MS, Sandomirskiy BP. Experimental model of skin cryodestruction. *Problems of Cryobiology and Cryomedicine*. 2019; 29(1): 88–101.

62. Kreuz S, Fischle W. Oxidative stress signaling to chromatin in health and disease. *Epigenomics*. 2016; 8(6): 843–862.

63. Ksander GA, Ogawa Y, Chu GH, et al. Exogenous transforming growth factor-beta 2 enhances connective tissue formation and wound strength in guinea pig dermal wounds healing by secondary intent. *Ann Surg*. 1990; 211(3): 288–294.

64. Kuznietsova H, Lynchak O, Dziubenko N, Herheliuk T, Prylutsky Y, Rybalchenko V, Ritter U. Water-soluble pristine C60 fullerene attenuates acetaminophen-induced liver injury. *Bioimpacts*. 2019; 9(4): 227–237. doi: 10.15171/bi.2019.28

65. Kuznietsova HM, Dziubenko NV, Lynchak OV, Herheliuk TS, Zavalny DK, Remeniak OV, Prylutskyi YI, Ritter U. Effects of pristine C<sub>60</sub> fullerenes on liver and pancreas in  $\alpha$ -naphthylisothiocyanate-induced cholangitis. *Dig Dis Sci*. 2020 Jan; 65(1): 215–224. doi: 10.1007/s10620-019-05730-3

66. Lessard L, Stuible M, Tremblay LM. The two faces of PTP1B in cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2010; 1804(3): 613–619.

67. Ling V. Multidrug resistance: molecular mechanisms and clinical relevance. *Cancer Chemother. Pharmacol*. 1997; 40(7): 3–8.

68. Lynch SE, Castilla de GR, Williams RC, et. al. The effects of short-term application of a combination of platelet-derived and insulin-like growth factors on periodontal wound healing. *J Periodontol*. 1991; 62(7): 458–467.

69. Mac Auley D.C. Ice therapy: how good is the evidence? *Int J Sports Med*. 2001; 22(1): 379–384.

70. Maksimova NV, Lyundup AV, Lubimov RO, Melnichenko GA, Nikolenko VN. [Pathophysiological aspects of wound healing in normal and diabetic foot]. *Vestn Ross Akad Med Nauk*. 2014; 11–12: 110–117 Russian.

71. Malcherek P, Schultz G, Wingren U, et. al. Formation of healing tissue and angiogenesis in repair of connective tissue stimulated by epidermal growth factor. *Scand J Plast Reconstr Sur Hand Surg*. 1994; 28(1): 1–7.

72. Mamontova TV, Mykytiuk MV, Bobrova NO, Kutsenko LO, Vesnina LE, Kaïdashev IP. [The anti-inflammatory effect of fullerene C<sub>60</sub> on adjuvant arthritis in rats]. *Fiziol Zh*. 2013; 59(3):102 doi: 10.102110. Ukrainian.

73. Mardente S, Zicari A, Consorti F, Mari E, Di Vito M, Leopizzi M, Della Rocca C, Antonaci A. Cross-talk between NO and HMGB1 in lymphocytic thyroiditis and papillary thyroid cancer. *Oncol Rep*. 2010; 24(6): 1455–61.

74. Mertz PM, Sauder DL, Davis SC, et. al. IL-1 as a potent inducer of wound re-epithelization. *Prog Clin Biol Res*. 1991; 365: 473–480.

75. Mishra S. Nanotechnology in medicine. *Indian Heart J*. 2016; 68(3): 437–39.

76. Mnikhovich MV, Yeremin NV, Fomina LV, et al. [Intercellular and cell-matrix interactions in wound healing]. *Journal of Anatomy and Histopathology*. 2013; 2(2): 63–83. Russian.
77. Munder PG, Stiefel T, Widmann KH, et al. Antitumoral effect of xenogenic substances in vivo and in vitro. *Onkologie*. 1982; 5(2): 98–104.
78. 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): 781–784.
79. Nielsen GD, Roursgaard M, Jensen KA, Poulsen SS, Larsen ST. In vivo biology and toxicology of fullerenes and their derivatives. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2008 Sep; 103(3): 197–208. doi: 10.1111/j.1742-7843.2008.00266.x.
80. Norton SK, Wijesinghe DS, Dellinger A, Sturgill J, Zhou Z, Kepley CL. Epoxyeicosatrienoic acids are involved in the C(70) fullerene derivative-induced control of allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2012; 130(3): 761–769. doi: 10.1016/j.jaci.2012.04.023 PMID: 22664166.
81. Nozdrin V, Gorelova M, Belousova T. [Age-related changes of the epidermis of men's scalp]. *Morfologiya (Saint Petersburg, Russia)*. 2011; 139: 74–81. Russian.
82. Obminiska-Mrukowicz B, Szczypka M. Effect of calf thymus extract and zinc supplementation on the cellular response of mice exposed to restraint stress. *Pol J Vet Sci*. 2005; 8(1): 1–9.
83. Pasquali P. *Cryosurgery: A Practical Manual*. 2015. doi 10.1007/978-3-662-43939-5.
84. Phillips GD, Stone AM, Jones BD, et al. Vascular endothelial growth factor (rhVEGF165) stimulates direct angiogenesis in the rabbit cornea. In vivo. 1994; 8(6): 961–965.
85. Pickart L. The human tri-peptide GHK and tissue remodeling. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. 2008; 19(8): 969–988.

86. Piotrovskiy L, Yeropkin M, Yeropkina Y, Dumpis M, Kiselev I. [Mechanisms of the biological action of fullerenes – dependence on the aggregate state]. *Psikhofarmakol Biol Narkol*. 2007; 7(2): 1548–54. Russian.

87. Poderoso J. The formation of peroxynitrite in the applied physiology of mitochondrial nitric oxide. *Arch Biochem Biophys*. 2009; 484(2): 214–20.

88. Pogozhykh O, Prokopyuk V, Figueiredo C, Pogozhykh D. Placenta and placental derivatives in regenerative therapies: experimental studies, history, and prospects. *Stem Cells Int*. 2018 Jan 18; 2018: 4837930. doi: 10.1155/2018/4837930

89. Porter AE, Muller K, Skepper J, Midgley P, Welland M. Uptake of C<sub>60</sub> by human monocyte macrophages, its localization and implications for toxicity: Studied by high resolution electron microscopy and electron tomography. *Acta Biomater*. 2006; 2(4): 409–419.

90. Priya KS, Arumugam G, Wells A. *Celosia argentea* Linn. Leaf extract improves wound healing in a rat burn wound model. *Wound repair regen*. 2004; 12(6): 618–625.

91. Proshin AV. [Morphological characteristics of the wound process in patients with purulent-necrotic forms of the lower extremities lesions in diabetes mellitus]. *Vestnik NovSU*. 2010; 59: 63–66. Russian.

92. Prylutska S, Bilyy R, Overchuk M, et al. Water-soluble pristine fullerenes C<sub>60</sub> increase the specific conductivity and capacity of lipid model membrane and form the channels in cellular plasma membrane. *J Biomed Nanotechnol*. 2012 Jun; 8(3): 522–7.

93. Prylutska SV, Burlaka AP, Prylutskyi YuI, et al. Pristine C<sub>60</sub> fullerenes inhibit the rate of tumor growth and metastasis. *Exp Oncol*. 2011; 33: 162–164.

94. Qaryoute S, Mirdad I, Hamail AA. Usage of autograft and allograft skin in treatment of burns in children. *Burns*. 2001; 27(6): 599–602.

95. Qin XM, Duan MX, Deng B, et al. Isolation and identification of a new thymic peptide from calf thymus. *Biochemistry*. 2004; 69(8): 921–925.



96. Ritter U, Prylutsky Yu, Evstigneev MP, Davidenko NA, Cherepanov VV, Senenko AI, et al. Structural features of highly stable reproducible C<sub>60</sub> fullerene aqueous colloid solution probed by various techniques. *Fullerenes, Nanotubes and Carbon Nanostructures*. 2014; 23: 530–4.

97. Robson M, Kucukcelebi A. Effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on wound contraction. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1994; 13(2): 41–46.

98. Robson MC, Phillips LG, Lawrence WT. The safety and effect of topically applied recombinant basic fibroblast growth factor on the healing of chronic pressure sores. *Ann Surg*. 1992; 216(4): 401–406.

99. Robson MC, Phillips LG, Thomason A, et. al. Platelet-derived growth factor BB for the treatment of chronic pressure ulcers. *Lancet*. 1992; 339(4): 23–25.

100. Rouse JG, Yang J, Barton AR, MonteiroReviere NA. Fullerene-based amino acid nano particle interactions with human epidermal keratinocytes. *Toxicol in vitro*. 2006; 20: 1313–1320.

101. Ryan JJ, Bateman HR, Stover A, Gomez G, Norton SK, Kepley CL. Fullerene nanomaterials inhibit the allergic response. *J Immunol*. 2007; 179: 665–672. PMID: 17579089.

102. Salomon GD, Kasid A, Cromack DT, et. al. The local effects of cachectin/tumor necrosis factor on wound healing. *Ann Surg*. 1991; 214(2): 175–180.

103. Sayes CM, Marchione AA, Reed KL, Warheit DB. Comparative pulmonary toxicity assessments of C<sub>60</sub> water suspensions in rats: few differences in fullerene toxicity *in vivo* in contrast to *in vitro* profiles. *Nano Lett*. 2007; 7(8): 2399–406.

104. Serov VV, Schekhter AB. [Connective tissue (functional morphology and general pathology)]. M. : Medicine; 1981. 312 p. Russian.

105. Shafranov VV, Borhunova EN, Taganov AV, et al. [Theory and mechanism of injury of biological tissues at the local freezing]. Russian

Journal of Pediatric Surgery, Anesthesia and Intensive Care. 2011; 1: 124–134. Russian.

106. Shipelin VA, Arianova EA, Trushina EN, Avrenyeva LI, Batishcheva SY, Cherkashin AV, et al. [Toxicological and sanitary characterization of fullerene C<sub>60</sub> administered through the rat gastrointestinal tract]. Hygiene and Sanitation. 2012; 2: 90–4. Russian.

107. Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest*. 2006; (11): 1793–1801.

108. Shpakova NM, Nipot EE, Ishchenko IO, Prylutska SV, Bogutska KI, Cherepanov VV, et al. [Effect of c60 fullerene on viscoelastic properties of human erythrocytes membrane]. *Physiol J*. 2014; 60(5): 82–8. Ukrainian.

109. Siméon A, Wegrowski Y, Bontemps Y, Maquart FX. Expression of glycosaminoglycans and small proteoglycans in wounds: modulation by the tripeptide-copper complex glycyl-L-Histidyl-L-lysine-Cu(2+). *J Invest Dermatol*. 2000; 115(6): 962–968.

110. Slyunyayeva MK. [Change in the activity of indicator serum enzymes with subcutaneous injection of iron nanoparticles]. *Bulletin of medical Internet conferences*. 2012; 2(4): 181. Russian.

111. Thiele JR., Zeller J, Bannasch H, et al. Targeting C-reactive protein in inflammatory disease by preventing conformational changes. *Mediators Inflamm*. 2015; 2015: 9. doi: 10.1155/2015/372432.

112. Тарасов НИ, Волчегорский ИА, Васильев АЮ. Динамика содержания перекисленных липидов и церулоплазмина в сыворотке крови больных с неосложненным и осложненным послеоперационным периодом трансуретральной электрорезекции доб рокачественной гиперплазии предстательной желе зы. *Урология*. 2001; (1): 16–18.

113. Umemoto EY, Speck M, Shimoda LM, et al. Single-walled carbon nanotube exposure induces membrane rearrangement and suppression of receptor-mediated signalling pathways in model mast cells. *Toxicol Lett*. 2014; 229(1): 198–209. doi:10.1016/j.toxlet.2014.06.009

114. Uspenskaya MV, Popov VA, Makin DN, et al. [The use of fullerenes in bioactive wound dressings]. *Scientific and Technical Journal of Information Technologies, Mechanics and Optics*. 2008; 8(2): 78–83. Russian.

115. Vlasov OO, Byelochkina IV, Kovalev GA, Panov SI, Prylutskyi YuI, Sandomirsky BP. Effect of aqueous colloid solution of C<sub>60</sub> fullerene on hematological parameters in rats. In: *International research and practice conference: nanotechnology and nanomaterials «NANO-2016»*; August 24–27, Lviv. 2016. Lviv, Ukraine, 2016. P. 510.

116. Vlasov OO, Kovalov GA, Belochkina IV, Panov SI, Iefimova IA, Sandomirsky BP. Effect of fullerene C<sub>60</sub> on biochemical parameters of liver and kidneys. *Cryobiology*. 2015; 71(3): 558.

117. Vlasov OO, Kovalov GO, Chizh MO, Galchenko SYe. Influence of cryopreserved piglets skin fragments or aqueous colloidal solution of C<sub>60</sub> fullerene on destruction and inflammation severity after skin cryodestruction. In: *The 57th Annual Meeting of the Society for Cryobiology «CRYO 2020»*, 21–23 July, Chicago. 2020. Chicago, USA, 2020. p.13–14.

118. Vlasov OO, Kovalov GO, Halchenko SYe, Chyzh MO. Effect of cryopreserved fragments of piglet's skin extract or aqueous colloidal solution of fullerene C<sub>60</sub> on wound healing after skin cryoablation. In: *1st International scientific and practical conference «Modern science: problems and innovations»*; April 5–7, Stockholm. 2020. Stockholm SSPG Publish; Stockholm, Sweden, 2020. P. 84–87.

119. Vlasov OO, Kovalov GO, Myroshnychenko MS. Effect of extract of cryopreserved piglets skin fragments and aqueous colloidal solution of fullerene C<sub>60</sub> on epidermis morphology in cold skin wound. In: *The 57th Annual Meeting of the Society for Cryobiology «CRYO 2020»*, 21–23 July, Chicago. 2020. Chicago, USA, 2020. p.59–60.

120. Vlasov OO, Kovalov GO, Myroshnychenko MS. Morphological assessment of wound healing after cryodestruction of skin using an aqueous colloidal solution of C<sub>60</sub> fullerenes. *Wiadomości Lekarskie*. 2020; 73(4): 642–647.

121.Vlasov OO, Kovalov GO, Myroshnychenko MS. Morphological features of a cold skin wound under the influence of an extract of cryopreserved skin fragments of piglets (experimental study). *Wiadomości Lekarskie*. 2020; 73(2): 306–311.

122.Vlasov OO, Panov SI, Kovalov GA, Belochkina IV, Nipot EE, Shpakova NM, Iefimova IA, Sandomirsky BP. Effect of C<sub>60</sub> fullerene aqueous colloid solution on biochemical parameters of liver and visco-elastic membrane properties of rat's erythrocytes. In: *Central European Conference on Regenerative Medicine*; March 14-15, Bydgoszcz. 2015. Bydgoszcz, Poland, 2015. p. 72–74.

123.Vlasov OO, Panov SI, Nipot OYe, Byelochkina IV, Kovalov GO, Shpakova NM, Synchykova OP, Sandomyrsky BP. Effect of C<sub>60</sub> fullerene aqueous colloid solution on visco-elastic membrane properties of erythrocytes. In: *V Ukrainian-German Symposium on Physics and Chemistry of Nanostructures and on Nanobiotechnology*; September 21-25, Kyiv. 2015. Kyiv, Ukraine, 2015. P. 114.

124. Vogt PM, Lehnhardt M, Wagner D. Determination of endogenous growth factors in human wound fluid: temporal presence and profiles of secretion. *Plast Reconstr Surg*. 1998; 102(1): 117–123.

125. Wegrowski Y, Maquart FX, Borel JP. Stimulation of sulfated glycosaminoglycan synthesis by the tripeptide-copper complex glycyl-L-histidyl-L-lysine-Cu<sup>2+</sup>. *Life Sci*. 1992; 51(13): 1049–1056.

126.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): 403–409.

127.Wittmers LEJr. Pathophysiology of cold exposure. *Minn Med*. 2001 Nov; 84(11): 30–6.

128.Wu Y, Potempa LA, El Kebir D, Filep JG. C-reactive protein and inflammation: conformational changes affect function. *Biol Chem*. 2015; 396(11): 1181–1197.

129. Yamago S, Tokuyama H, Nakamura E, Kikuchi K, Kananishi S, Sueki K, Nakahara H, Enemoto S, Ambe F. In vivo biological behavior of a water-miscible fullerene: labeling, absorption, distribution, excretion and acute toxicity. *Chem. Biol.* 1995; 2: 385–389.

130. 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.

131. Yang ZR, Liu JY, Yan PH. Effect of cold acclimation on hemorheological behavior in rats with frostbite. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2003; 29(2): 103–9.

132. Ye Z, Zhang J, Townsend D, Tew K. Oxidative stress, redox regulation and diseases of cellular differentiation. *Biochim Biophys Acta.* 2015; 1850(8): 1607–1621.

133. Yu CH, Chen HM, Chang CC. Cotton-swab cryotherapy for oral leukoplakia. *Head neck.* 2009; 31(8): 983–988.

134. Zeinalov OA, Kombarova SP, Bagrov DV, Petrosyan MA, Tolibova GH, Feofanov AV. [About the influence of metal oxide nanoparticles on living organisms physiology]. *Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy*, 2016; 14(3): 24–33. Russian.

135. Zhou Z, Lenk RP, Dellinger A, Wilson SR, Sadler R, Kepley CL. Liposomal formulation of amphiphilic fullerene antioxidants. *Bioconjug Chem.* 2010; 21: 1656–1661.

136. Zimmerman E, Crawford P. Cutaneous cryosurgery. *Am Fam Physician.* 2012; 86(12): 1118–1124.

137. Абрафикова ЛГ, Петренко ТФ, Высеканцев ИП. Влияние гипотермического хранения и криоконсервирования на сохранность кожи и фибробластов человека. *Пробл. криобиологии.* 2008; 18(3): 275–277.

138. Автандилов ГГ. Медицинская морфометрия. М.: Медицина; 1990. 384 с.

139. Актуальные проблемы криобиологии. Под ред. Н.С. Пушкаря.

Киев: Наук. Думка; 1982. 608 с.

140. Алейник ДЯ, Гординская НА, Чарыкова ИН. Продукция медиаторов воспаления у пострадавших с ожоговой травмой и постожоговыми рубцами. Иммунология. 2008; (4): 234–235.

141. Алексеева НТ, Глухов АА, Остроушко АП. Роль клеток фибробластического дифферона в процессе заживления ран. Вестник экспериментальной и клинической хирургии. 2012; 5(3): 601–608.

142. Арипова ТУ, Батырбеков АА, Аскараров ТА, и др. Новые отечественные полифункциональные иммуномодуляторы. Ташкент: 2006. 200 с.

143. Архаров АМ, Архаров ИА, Антонов АН, и др. Машины низкотемпературной техники. Криогенные машины и инструменты. Москва: МГТУ им. Н.Э. Баумана; 2011.

144. Арьев ТЯ. Ожоги и отморожения. Л.: Медицина; 1971. 285 с.

145. Ашмарин ИП, Обухова МД. Регуляторные пептиды, функционально-непрерывная совокупность. Иммунология. 2002; (3): 40–48.

146. Барабой ВА, Брехман ИИ, Головитин ВГ. Перекисное окисление липидов и стресс. СПб.: Наука; 1992. 268 с.

147. Барабой ВА, Орел ВЭ, Карнаух ИМ. Методические особенности исследования перекисного окисления. В кн.: Перекисное окисление и радиация. Киев, Наукова думка; 1991. С. 52–75.

148. Баринов ЭФ, Айзятупов РФ, Баринова МЭ, Сулаева ОН. Функциональная морфология кожи: от основ гистологии к проблемам дерматологи. Клиническая дерматология и венерология. 2012; 10(1): 90–93.

149. Белоус АМ. Проблемы регенерации тканей при местном криовоздействии. Пробл. криобиологии. 1992; (1): 14–18.

150. Беленічев ІФ, Левицький ЄЛ, Губський ЮІ, Коваленко СІ, Марченко ОМ. Антиоксидантна система захисту організму (огляд). Совр. пробл. токсикол. 2002; (3): 24–31.

151. Бондаренко ВВ, Нетюхайло ЛГ, Аветіков ДС. Молекули середньої маси в тканинах слинних залоз при експериментальній опіковій хворобі. Таврический медико-биологический вестник. 2012; 15(3), ч. 1 (59): 49–50.

152. Буйко АС, Елагина ВА, Сафроненкова ИА, и др. Криогенное лечение злокачественных эпителиальных опухолей кожи век. Медицинская криология. Н. Новгород: 2003; (4): 51–54.

153. Булатова ИА, Щёктова АП, Суздальцева КН, Щёкотов ВВ, Улитина ПВ, Жижилев ЕВ. Супероксиддисмутаза и глутатионредуктаза при хроническом гепатите с и неалкогольной жировой болезни печени. Фундаментальные исследования. 2014; (7–3): 455–459.

154. Бызов ВВ, Высеканцев ИП, Гальченко СЕ, и др. Влияние эндобронхиального введения экстракта криоконсервированных фрагментов ксеноселезенки на некоторые факторы местного иммунитета в комплексной терапии больных с абсцессами легких. Пробл. криобиологии. 2001; (4): 65–70.

155. Бызов ВВ, Высеканцев ИП, Гальченко СЕ, и др. Опыт применения эндотрахеального введения экстракта криоконсервированных фрагментов ксеноселезенки в комплексном лечении больных с гнойными процессами в легких. Пробл. криобиологии. 2001; (3): 87–88.

156. Бызов ВВ. Применение криоконсервированных фрагментов ксеноселезенки в лечении больных с гнойными процессами легких и плевры. Пробл. криобиологии. 2000; (1): 81–85.

157. Быков НМ, Чалисова НИ, Зезюлин ПН. Реципрокные соотношения пролиферативной активности в центральной и периферической зонах органотипической культуры селезенки при действии вилона у крыс разного возраста. Успехи геронтол. 2003; (11): 104–108.

158. Вавилова ТП, Гусарова ЮН, Королева ОВ, Медведев АЕ. Роль церулоплазмينا при развитии неопластических процессов. Биомед. химия. 2005; 51(3): 263–275..

159. Ващенко ВИ, Ващенко ТН. Церулоплазмин от метаболита до лекарственного средства. Психофармакология и биологическая наркологи́я. 2006; 6(3): 1254–1269.

160. Вельков ВВ. Прокальцитонин и С-реактивный белок в современной лабораторной диагностике. Лабор. диагностика. 2010; (4): 39–76.

161. Вельков ВВ. С-реактивный белок – «золотой маркер», многозначительный и незаменимый. Новое в клинической лабораторной диагностике атерогенеза: С-реактивный белок, холестерин, аполипопротеины. Пушино: 2005. 110 с..

162. Веснина ЛЭ, Гаркович АЛ, Грицай НН, и др. Тканевые регуляторные пептиды (теоретические основы и перспективы практического применения). Под. ред. Кайдашева И.П., Мищенко В.П., Рыбальченко В.К. К.: Здоров'я; 2003. 392 с.

163. Веснина ЛЭ. Эффект ремодуляции поверхностных рецепторов лимфоцитов пептидным комплексом почек. Архив клин. и эксперим. мед. 2000; 9(3): 353–355.

164. Весніна ЛЕ, Кайдашев ІП. Роль кальцій залежних механізмів у реалізації імунотропних ефектів пептидного комплексу нирок. Фізіологічний журнал. 2000; 46(6): 28–35.

165. Власов АА, Ковалев ГА, Белочкина ИВ, Тыныныка ЛН., Сандомирский БП. Влияние экстрактов криоконсервированных фрагментов кожи поросят на состояние про- и антиоксидантной системы при криодеструкции кожи. Проблемы криобиологии и криомедицины. 2016; 26(2): 170.

166. Власов ОО, Ковальов ГО, Белочкіна ІВ, Єфімова ІА, Сандомирський БП. Вплив водного колоїдного розчину фулерену С<sub>60</sub> на гематологічні і біохімічні показники крові щурів. Фізіологічний журнал. 2018; 64(3): 70–78.



167.Власов ОО, Ковальов ГО, Мирошниченко МС. Влияние водного коллоидного раствора фуллерена  $C_{60}$  на эпителий после криодеструкции кожи. Проблеми кріобіології і кріомедицини. 2018; 28(2): 170.

168.Власов ОО, Ковальов ГО, Тининика ЛМ, Прилуцький ЮІ, Белочкіна ІВ, Сандомирський БП, винахідники; Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, патентовласник. Спосіб лікування ран. Патент України № у 2016 04860. 2016.

169.Власов ОО, Ковальов ГО, Чиж МО, Гальченко СЄ. Динаміка вмісту продуктів перекисного окислення ліпідів та антиоксидантів в крові щурів з кріодеструкцією шкіри та уведенням екстракту кріоконсервованих фрагментів шкіри поросят або водного колоїдного розчину фулерену  $C_{60}$ . Вісник проблем біології і медицини. 2020; 1(155): 102–106.

170.Власов ОО, Ковальов ГО. Інтенсивність вільно-радикальних процесів при локальній холодовій травмі після введення екстракту кріоконсервованих фрагментів шкіри поросят або водного колоїдного розчину фулерену  $C_{60}$ . Проблеми кріобіології і кріомедицини. 2019; 29(2): 167.

171.Власов ОО, Панов СІ, Ковальов ГО, Белочкіна ІВ, Ніпот ОЄ, Шпакова НМ, Єфімова ІО, Сандомирський БП. Вплив водного колоїдного розчину фулерену  $C_{60}$  на стан мембран та біохімічні показники *in vivo*. Проблеми кріобіології і кріомедицини. 2015; 25(2): 195.

172.Власов ОО. Експериментальна модель низькотемпературного впливу на шкіру. В: Матеріали XVI Міжнародної наукової конференції студентів, молодих вчених та спеціалістів «Актуальні питання сучасної медицини»; 28-29 березня, Харків. 2019. М-во освіти і науки України, Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна. Харків, Україна, 2019. С. 57.

173.Власов ОО. Показники крові щурів при введенні водного колоїдного розчину фулерену  $C_{60}$  в різних концентраціях. В: Матеріали XVI Міжнародної наукової конференції студентів, молодих вчених та спеціалістів

«Актуальні питання сучасної медицини»; 26-27 березня, Харків. 2020. М-во освіти і науки України, Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна. Харків, Україна, 2020. С. 61.

174. Габриэлян НИ, Липатова ВИ. Опыт использования показателя средних молекул в крови для диагностики нефрологических заболеваний у детей. Лаб. Дело. 1984; (3): 138–140.

175. Гальченко СЄ, Белочкіна ІВ, Сандомирський БП. Стимуляція репараційних процесів в печині при токсическом гепатиті. Експерим. и клинич. медицина. 2005; (4): 26–30.

176. Гальченко СЄ, Белочкіна ІВ, Тининика ЛМ, та ін. Порівняльне вивчення біологічної дії екстрактів кріоконсервованих фрагментів ксеноорганів. Пробл. мед. науки та освіти. 2006; (1): 67–69.

177. Гальченко СЄ, Белочкіна ІВ, Мамонтова АВ, та ін. Вплив препаратів із ксеногенної підшлункової залози на рівень глікемії і вільнорадикальні процеси у щурів з експериментальним цукровим діабетом. Мед. хімія. 2004; (4): 63–67.

178. Гальченко СЄ, Белочкіна ІВ, Сандомирський БП. Водно-сольові екстракти ксенотканин як альтернатива ксенотрансплантації. Трансплантологія. 2004; 7(3): 258–260.

179. Гальченко СЄ, Сандомирський БП. Екстракти кріоконсервованих фрагментів органів свиней та поросят як компонент відновної медицини. Доповіді національної академії наук України. 2017; (7): 91–97.

180. Гальченко СЄ, Шкодовська НЮ, Сандомирський БП, Грищенко ВІ, винахідники; Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, патентовласник. Спосіб отримання екстрактів ксеногенних органів. Патент України № 2003054649. 2004.

181. Гальченко СЄ. Екстракти кріоконсервованих фрагментів ксеноорганів: одержання та біологічна дія. Пробл. кріобіології. 2005; 15(3): 403–406.

182. Голиков ПП, Голиков АП. Роль оксида азота в патології. Архив

патологии. 2005; (4): 24–32.

183. Гордиенко ЕА, Пушкарь НС. Физические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий. Киев: Наук. Думка; 1994. 143 с.

184. Гордієнко ОІ. Вплив температури на проникність мембран еритроцитів до 1,2-пропандіолу та диметилсульфоксиду. Пробл. криобиологии. 2003; (1): 38–45.

185. Горелова МВ. Направление изменения толщины эпидермиса кожи волосистой части головы мужчин с учетом пролиферации кератиноцитов. Ученые записки Орловского государственного университета. 2010; 36(2): 150–155.

186. Григорьева ТГ. Холодовая травма. Отморожения. Межд. мед. журнал. 2001; (2): 42–48.

187. Грищенко ВИ, Гольцев АН. Трансплантация продуктов эмбриофетоплацентарного комплекса. От понимания механизмов действия к повышению эффективности применения. Пробл. криобиологии. 2002; (1): 54–84.

188. Грищенко ВИ, Сандомирский БП, Колонтай ЮЮ. Практическая криомедицина. К. : Здоровье; 1987. 248 с.

189. Громашевская ЛЛ. Средние молекулы как один из показателей метаболической интоксикации в организме. Лабораторная диагностика. 1997; (1): 11–16.

190. Грохольский АП, Данилевский ЮН, Противень НФ. Криодиатермокоагуляция при лечении больных с опухолевидными заболеваниями слизистой оболочки полости рта и кожи лица. Пробл. криобиологии. 1992; (3): 50–52.

191. Губерук ВО. Перекисне окиснення ліпідів та антиоксидантна система захисту організму (Огляд літератури). Науковий вісник ЛНУВМБТ імені С.З. Гжицького. 2008; 10(3),(38), ч. 1: 51–55.

192. Зай СЮ, Заводовский ДА, Богущкая ЕИ, Ноздренко ДН, Прилуцкий

ЮИ. Перспективы использования C<sub>60</sub>-фуллере́на как способа профилактики и коррекции ишемично-реперфузионных нарушений в скелетной мышечной ткани. *Фізіологічний журнал*. 2016; 62(3): 66–77.

193. Звягина ТВ. Метаболиты оксида азота в крови и моче здоровых людей: их связь с цитокинами и гормонами. *Вестник неотложной и восстановительной медицины*. 2002; 3(2): 302–304.

194. Иванов ВА., Витковский ЮА, Михайличенко МИ, и др. Содержание цитокинов в крови больных при местной холодовой травме. *Медицинская иммунология*. 2008; 1: 89–92.

195. Ищенко ИО, Тыныныка ЛН, Ковалев ГА, и др. Влияние криоконсервированной сыворотки кордовой крови на биохимические маркеры деструкции тканей. *Експериментальна і клінічна медицина*. 2016; 1(70): 19–25.

196. Казимирко ВК, Мальцев ВИ, Бутылин ВЮ, Свободнорадикальное окисление и антиоксидантная терапия. К.: Морион; 2004. 160 С.

197. Кайдашев ИП, Гейко ОА, Беркало ЛВ, и др. Специфическое фармакологическое действие пептидного экстракта поджелудочной железы при аутоимунном инсулите у мышей линии NOD. *Иммунология*. 2003; 24(6): 327–330.

198. Кайдашев ИП. Тканевая специфичность пептидных экстрактов, выделенных из различных органов, и иммунорегуляторное действие пептидного экстракта почек. *Биополимеры и клетка*. 1995; 11(5): 61–74.

199. Калініченко ОВ, Мишуніна ТМ, Тронько МД. Активність синтаз оксиду азоту та його концентрація в тканині карцином щитоподібної залози людини. *Фізіол. журн*. 2016; 62(3): 9–19.

200. Карякин НН, Мартусевич АК. Технологии лечения ожогов и ран в водной среде: исторические, патофизиологические и клинические аспекты. *Трудный пациент*. 2014; 12(6): 38–46.

201. Клименко НА, Лупырь МВ. Костномозговое кроветворение и лейкоцитарная реакция периферической крови при хроническом воспалении

на фоне локального удаления тканевых базофилов. Буковинський медичний вісник. 2008; 12(3): 81–86.

202.Ковалев ГА, Ищенко ИО, Наумова ОВ, Сандомирский БП. Морфологическая характеристика ран вызванных криодеструкцией. Научные ведомости БелГУ. Серия Медицина. Фармация. 2015; 22(219), (324): 107–114.

203.Ковалев ГА, Ищенко ИО, Тыныныка ЛН, и др. Влияние криоконсервированной сыворотки кордовой крови на системные проявления воспаления на модели холодových ран. Проблемы криобиологии и криомедицины. 2017; 27(1): 71–80.

204. Ковальов ГО, Гальченко СС, винахідники; Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, патентовласник. Пристрій для моделювання кріодеструкції шкіри. Патент України № u201801458. 2018.

205. Коган АС, Лиходед ВИ, Шмаков СВ. Пролонгированный протеолиз в лечении отморожений. Бюллетень СО РАМН. 2001; (2): 46–50.

206. Коляденко ВГ, Степаненко ВІ, Бардов ПВ. Нові підходи до лікування та запобігання утвореного рубця. Клінічна хірургія. 2001; (2): 24–27.

207.Константинова МВ, Хайцев НВ, Кравцова АА, Балашов ЛД. Основные проблемы заживления ран и использование заменителей кожи. Педиатр. 2015; 6(2): 85–95. doi: 10.17816/PED6285-95304

208. Костюк ВА, Потапович АИ, Ковалева ЖВ. Простой и чувствительный метод определения активности супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина. Вопр. мед. химии. 1990; (2): 88–91.

209.Коченов ВИ. Криохирургическая профилактическая онкология. В: Медицинская криология. Достижение и перспективы. Сборник научных трудов; 2001; Н.Новгород: 2001; (1): 101–135.

210. Коченов ВИ. Прогресс современной медицинской криологии в России. В: Международная научно-практическая конференция «Новое в практической медицинской криологии». Сборник научных трудов; 2004;

Москва; 2004. С. 9–10.

211. Кулешова ЛГ. Оценка состояния поверхности эритроцитов в гипертонической среде электролита. Состояние внешних примембранных слоев. Біофізичний вісник. 2003; 1(12): 89–91.

212. Курцева АА, Смахтин МЮ, Иванов АВ, Беседин АВ. Влияние аминокислот, составляющих пептид глицил-гистидил-лизин, на регенерацию кожных ран и функцию нейтрофилов. Курский научно-практический вестник Человек и его здоровье. 2008; (3): 5–10.

213. Курцева АА. Репаративная и иммуностропная активность пептида gly-his-lys в условиях кожных ран. Курский научно-практический вестник Человек и его здоровье. 2008; (1): 36–40.

214. Куцевляк ВФ, Божко КВ, Сирота ОН. Криовоздействие и гипотермия в терапевтической стоматологии. Проблемы криобиологии. 2001; (3): 74.

215. Лавров ВА. Молекулярные механизмы воспаления у обожженных. Комбустиология. 2002; (3): 22–28.

216. Лазаренко ВА, Артюшкова ЕБ, Мишустин ВН, и др. Комбинированное фармакологическое лечение контактного отморожения в эксперименте. Вестник экспериментальной и клинической хирургии. 2013; 6(1): 45–49.

217. Лазаренко ВА, Симоненков АП, Лазарев ЕВ. Лечение критической ишемии нижних конечностей с использованием серотонина. Ангиология и сосудистая хирургия. 2003; (2): 26–30.

218. Лифшиц ВМ, Сидельникова ВИ. Биохимические анализы в клинике: справочник. Москва: "Триада-Х"; 2002. 208 с.

219. Логачев ВК. Теория и практика местного лечения инфицированных ран. Клініч. хірургія. 2003; (11): 51–52.

220. Малюк ЕА, Целуйко СС, Красавина НП. Морфофункциональная характеристика кожи крыс различных возрастных групп при локальном охлаждении. Якутский медицинский журнал. 2018; 2(62): 15–16.

221. Маяковский ВД, Туманский ВО, Сорокина ИВ, та ін. Патоморфологія: нац. підручник; за ред. В.Д. Маяковського, В.О. Туманського. К. : ВСВ «Медицина»; 2015. 936 с.

222. Медведев БИ, Казачкова ЭА, Астахова ТВ, Попова АС. Диагностические и прогностические возможности использования показателей молекул средней массы и среднемолекулярных пептидов сыворотки крови при воспалительных заболеваниях органов малого таза женщин. Акушерство и гинекология. 1992; (3–7): 38–40.

223. Меньщикова ЕБ, Зенков НК. Антиоксиданты и ингибиторы радикальных окислительных процессов. Успехи Совр. Биологии. 1993; 113: 442–455.

224. Метельская ВА, Гуманова НГ. Скрининг-метод определения уровня метаболитов оксида азота в сыворотке крови. Клини. лаб. діагностика. 2005; (6): 15–18.

225. Мчедлов-Петросян НО, Розчини фуллерену С60: колоїдний аспект. Хімія, фізика та технологія поверхні. 2010; 1(1): 19–37.

226. Никитюк ДБ, Глухов АА, Алексеева НТ. К вопросу о математическом моделировании гистохимических изменений в эпидермисе при заживлении ран. Журнал анатомии и гистопатологии. 2012; 1(1): 48–55.

227. Оксидативный стресс и воспаление: патогенетическое партнерство: монографія. Под ред. О. Г. Хурцилавы, Н. Н. Плужникова, Я. А. Накатиса. – СПб.: Издательство СЗГМУ им. И. И. Мечникова: 2012. 340 с.

228. Олефиренко АА, Луценко ДГ, Слета ИВ, и др. Применение метода фрактального анализа для оценки структурно-функционального состояния печени крыс *in vivo*. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2009; 147(2): 237–242.

229. Основы криобиологии и криомедицины: учебник для студентов – биологов и медиков. Под ред. Г.Ф. Жегунова, А.О. Нардида. Харьков.: ФЛП Бровин А.В.; 2019. 614с.

230. Панасюк ОА. Особенности криодеструкции, кортикостероидной

терапии в комплексном лечении гемангиом губ у детей. *Врачебная практика*. 2002; (5): 84–86.

231. Панчук РР, Чумак ВВ, Скорохід НР, Легка ЛВ, Прилуцька СВ, Хеффетер П, Бергер В, Стойка РС, Прилуцький ЮІ. Синергічна антинеопластична дія комплексів доксорубіцину і фулерену с60 як засобу його доставки до злоякісних клітин людини у досліджах *in vitro*: клітинні та молекулярні механізми. *Біологічні Студії. Studia Biologica*. 2013; 7(1): 5–20.

232. Парамонов БА, Порембский ЯО, Яблонский ВГ. Ожоги. С.-Петербург: СпецЛит; 2000. 482 с.

233. Парамонов БА, Сидельников ВО. Новые раневые покрытия в лечении ожогов и ранений. *Военно-медицинский журнал*. 2002; 32(4): 70–73.

234. Пирадов МА. Сравнительная оценка эффективности методов определения осмоляльности и средних молекул в прогнозе течения инсультов. *Лабораторное дело*. 1999; (5): 10–12.

235. Пирс Э. Гистохимия (теоретическая и прикладная). М.: Иностранная литература; 1962. 962 с.

236. Плечева ДВ, Каюмов РА, Алехин ЕК. Влияние оксиметилурацила на репаративные процессы в коже крыс. *Морфология*. 2002; (2–3): 124–125.

237. Полежаев ЛВ. Очерки о биологически активных веществах. *Успехи соврем. биологии*. 1992; 112(1): 74–87.

238. Прилуцька СВ, Кічмаренко ЮМ, Богуцька КІ, та ін. Фулерен С60 та його похідні як протипухлинні агенти: проблеми і перспективи. *Біотехнологія*. 2012; 5(3): 9–17.

239. Прилуцька СВ, Ротко ДМ, Прилуцький ЮІ, Рибальченко ВК. Токсичність вуглецевих наноструктур у системах *in vitro* та *in vivo*. Сучасні проблеми токсикології. 2012; (3–4): 49–57.

240. Приходько СГ, Мартынюк ВВ, Приходько СГ. Криохирургия злокачественных опухолей полости рта и кожи. *Достижения криомедицины*. СПб.: Наука; 2001. С. 50–52.

241. Прохоров ГГ. *Достижения криомедицины*. СПб.: Наука; 2001. С.



55-62. .

242. Пушкарь НС, Сандомирский БП. Теоретические и практические аспекты криохирургии. Криобиол. и криомед. 1981; (9): 47–58.

243. Рамазанов ВВ, Бондаренко ВА. Влияние криопротекторов на устойчивость эритроцитов к детергентам при модификации агрегатного состояния белка полосы 3. Пробл. криобиологии. 2007; 17(4): 335–346.

244. Романюха АА. Иммунная система: норма и адаптация. Иммунология. 2009; (1): 7–12.

245. Рябенко ВВ. Роль пептидного комплексу тимуса-тималіну та пептидного комплексу нирок в регуляції процесів апоптозу тимоцитів за фізіологічних умов та модуляції активності їх внутрішньоклітинних регуляторних систем: автореф. дис...канд. мед. наук: 14.03.08 / Національний мед. університет ім. О.О.Богомольця. К.; 2004. 20 с.

246. Рябинин ВЕ. Использование методов клеточной и эфферентной терапии при лечении печеночной недостаточности. Вест. трансплант. и искусств. органов. 2002; (1): 42–49.

247. Рябов ГА, Азизов ЮМ. Роль оксида азота как регулятора клеточных процессов. Анестезиол. и реаниматол. 2001; (1): 8–13.

248. Сакун ОВ, Гордієнко ОІ. Теоретична оцінка значення оптимальної з погляду теорії кріопшкодження швидкості охолодження при лінійних режимах заморожування клітинної суспензії. Біофізичний вісник. 2009; 22(1): 63–68.

249. Сакун ОВ, Марущенко ВВ, Коваленко ІФ, та ін. Вплив температури на коефіцієнти проникності мембран дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* для води і криопротекторів. Пробл. криобиологии. 2009; 19(1): 41–48.

250. Сандомирский БП, Васильевский ВЮ. Нарушение микроциркуляции после локальных температурных воздействий. Криобиол. и криомед. 1981; (9): 96–98..

251. Санина ОЛ, Бердинских НК. Биологическая роль церулоплазмينا и возможности его клинического применения (обзор литературы). Вопр. мед. химии. 1986; 32(5): 7–14.

252. Сатыбалдыев ВМ. Ранняя диагностика и прогнозирование степени отморожения конечностей. Вестник хирургии им. Грекова. 2003; 162(1): 46–48.

253. Сердюк ИЭ, Белочкина ИВ, Крышталь АП, Рошаль АД, Неклюдов ИМ, Борц БВ, Воеводин ВН, Ткаченко ВИ, Сандомирский БП. Получение и биологическая активность водных коллоидных растворов смесей фуллеренов C60 и C70. *Biotechnology*. 2011; 4(5): 64–70.

254. Серов ВВ, Пауков ВС. Воспаление. М.: Медицина; 1995. 640 с.

255. Серов ВВ, Шехтер АБ. Соединительная ткань (функциональная морфология и общая патология). М.: Медицина; 1981. 312 с.

256. Скальский СВ, Соколова ТФ, Зырянов СК. Регуляция формирования соединительной ткани при спайкообразовании блокаторами медленных кальциевых каналов. *Фармакокинетика и Фармакодинамика*. 2017; (4): 46–50.

257. Скорняков ВИ, Кожемякин ЛА, Смирнов ВВ. Продукты перекисного окисления липидов в спинномозговой жидкости у больных с черепномозговой травмой. *Лаб. дело*. 1988; (8): 14–16.

258. Смирнов СВ, Киселев ИВ, Роговая ОС, и др. Восстановление кожного покрова путем трансплантации выращенных кератиноцитов. *Бюлл. эксперим. биол. и мед.* 2003; 135(6): 711–715.

259. Смольянинова ЕИ, Жегунов ГФ, Хроменкова ОБ. Осмотическое поведение эмбрионов мыши в гипертонических растворах 1,2-пропандиола и его оксиэтилированных производных. *Пробл. криобиологии*. 2000; (1): 49–51.

260. Смольянинова ЕИ, Хроменкова ОБ, Жерноклев ГВ. Влияние различных этапов криоконсервирования методом сверхбыстрого замораживания на осмотическую устойчивость и морфофункциональную сохранность эмбрионов мши. *Пробл. криобиологии*. 2001; (2): 49–55.

261. Соловьева ОВ. Применение низких температур в ветеринарной медицине. Vetpharma. 2011; (3–4): 102–108.

262. Спектрофотометрическое определение продуктов перекисного окисления липидов. Медицинская лабораторная диагностика (программы и алгоритмы). Под редакцией профессора А.И. Карпищенко. Санкт-Петербург "Интермедика"; 1997. С. 48–52.

263. Ступницький МА. Прогностичне значення молекул середньої маси у пацієнтів з важкою поєднаною торакальною травмою. Вісник проблем біології і медицини. 2014; 1(4): 197–203.

264. Тернова КС, и др. Низкие температуры в медицине: монографія. Общ. ред.: К. С. Терновой, Л. Г. Гассанов. Киев : Наук. Думка; 1988. 280 с.

265. Трифонов СВ, Авхименко ММ, Трифонова СС. Холодовая травма: патогенез, неотложная медицинская помощь, профилактические меры. Мед. помощь. 2007; (1): 28–32. .

266. Флерьянович МС, Походенько-Чудакова ИО, Колб ЕЛ. Морфология гнойной раны у экспериментальных животных с моделью фурункула в поднижнечелюстной области. Вестник ВГМУ. 2015; 14(4): 106–111.

267. Хавинсон ВХ, Малинин ВВ, Чалисова НИ, и др. Тканеспецифическое действие пептидов в культуре тканей крыс разного возраста. Успехи геронтологии. 2002; (9): 278–285.

268. Хавинсон ВХ, Морозов ВГ. Пептиды эпифиза и тимуса в регуляции старения. СПб.: Фолиант; 2001. 160 с.

269. Чадаев АП, Свиридов СВ, Климиашвили АД, и др. Холодовая травма. Рос. мед. журнал. 2005; (35): 20–23.

270. Черешнев ВА, Гусев ЕЮ, Юрченко ЛН. Системное воспаление: миф или реальность? Вестн. Росс. акад. наук. 2004; 74(3): 219–225.

271. Чиж НА, Марченко ЛН, Белочкина ИВ, и др. Ультроструктура печеночной артерии после криоденервации. Укр. морфол. альманах. 2008; 6(3): 84–87.

272. Чиж НА, Сандомирский БП. Криохирurgia, перезагрузка и обновление. Клінічна хірургія. 2011; (6): 53–55.

273. Чорна Ю, Лігоненко ОВ, Гірін ЛВ. Зміни у системі гемостазу під впливом пептидних біорегуляторів при загоєнні рани в експерименті. Клінічна хірургія. 2002; (11–12): 77–78.

274. Шаповалова ЕЮ, Бойко ТА, Барановский ЮГ, Ильченко ФН, Мартынюк АВ. Пролиферативная и апоптотическая активность клеток дермы кожи человека при патологической репаративной регенерации и в раннем пренатальном органогенезе. Оренбургский Медицинский Вестник. 2015; 3(11): 68–72.

275. Шатаева Л, Хавинсон ВХ, Ряднова ИЮ. Пептидная саморегуляция живых систем (факты и гипотезы). М.: Наука; 2003. 222 с.

276. Шафранов ВВ, Борхунова ЕН, Костылев МА, и др. Механизм разрушения биологических тканей при локальной криодеструкции. Вестник Российской академии естественных наук. 2012; (1): 68–76.

277. Шумаков ВИ, Расулов МФ. Сравнительная оценка эффективности применения аллогенных эмбриональных фибробластов и мезенхимальных стволовых клеток костного мозга для терапии глубоких ожоговых ран. Вестн. трансплантол. и искусств. органов. 2002; (4): 7–11.

278. Шурыгина ИА, Шурыгин МГ. Фибробласты и их роль в развитии соединительной ткани. Сибирский медицинский журнал. 2012; (3): 8–12.

279. Эпштейн ВГ, Вишневский ВИ, Сандомирский БП. О воспроизводимости температурного поля, создаваемого криохирургическим аппликатором. Мед.техника. 1978; (1): 14–15.

280. Яблонская АМ, Макарова ОВ, Михайлова ЛИ, и др. Морфофункциональная характеристика реакции иммунной системы крыс Вистар при воздействии сублетальной дозы липополисахарида. Иммунология. 2009; (3): 154–158.

## Додаток А.

## СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗДОБУВАЧА ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

**1. Наукові праці, в яких опубліковані основні наукові результати дисертації***Статті у фахових виданнях України*

1. **Власов ОО**, Ковальов ГО, Белочкіна ІВ, Єфімова ІА, Сандомирський БП. Вплив водного колоїдного розчину фулерену C<sub>60</sub> на гематологічні і біохімічні показники крові щурів. Фізіологічний журнал. 2018; 64(3): 70–78.

2. Kovalov GO, **Vlasov ОО**, Myroshnychenko MS, Sandomirskiy BP. Experimental model of skin cryodestruction. Problems of Cryobiology and Cryomedicine. 2019; 29(1): 88–101. (Scopus)

3. **Власов ОО**, Ковальов ГО, Чиж МО, Гальченко СЄ. Динаміка вмісту продуктів перекисного окислення ліпідів та антиоксидантів в крові щурів з кріодеструкцією шкіри та уведенням екстракту кріоконсервованих фрагментів шкіри поросят або водного колоїдного розчину фулерену C<sub>60</sub>. Вісник проблем біології і медицини. 2020: 1(155): 102–106.

*Статті в наукових періодичних виданнях інших країн*

4. **Vlasov ОО**, Kovalov GO, Myroshnychenko MS. Morphological features of a cold skin wound under the influence of an extract of cryopreserved skin fragments of piglets (experimental study). Wiadomości Lekarskie. 2020; 73(2): 306–312. (Scopus)

5. **Vlasov ОО**, Kovalov GO, Myroshnychenko MS. Morphological assessment of wound healing after cryodestruction of skin using an aqueous colloidal solution of C<sub>60</sub> fullerenes. Wiadomości Lekarskie. 2020; 73(4): 642–647. (Scopus)

## **2. Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації**

### *Тези наукових доповідей конференцій*

6. **Vlasov OO**, Panov SI, Kovalov GA, Belochkina IV, Nipot EE, Shpakova NM, Iefimova IA, Sandomirsky BP. Effect of C<sub>60</sub> fullerene aqueous colloid solution on biochemical parameters of liver and visco-elastic membrane properties of rat's erythrocytes. In: Central European Conference on Regenerative Medicine; March 14-15, Bydgoszcz. 2015. Bydgoszcz, Poland, 2015. p. 72–74.

7. **Власов ОО**, Панов СІ, Ковальов ГО, Белочкіна ІВ, Ніпот ОЄ, Шпакова НМ, Єфімова ІО, Сандомирський БП. Вплив водного колоїдного розчину фулерену C<sub>60</sub> на стан мембран та біохімічні показники *in vivo*. Проблеми кріобіології і кріомедицини. 2015; 25(2): 195.

8. **Vlasov OO**, Kovalov GA, Belochkina IV, Panov SI, Iefimova IA, Sandomirsky BP. Effect of fullerene C<sub>60</sub> on biochemical parameters of liver and kidneys. Cryobiology. 2015; 71(3): 558.

9. **Vlasov OO**, Panov SI, Nipot OYe, Byelochkina IV, Kovalov GO, Shpakova NM, Synchykova OP, Sandomyrsky BP. Effect of C<sub>60</sub> fullerene aqueous colloid solution on visco-elastic membrane properties of erythrocytes. In: V Ukrainian-German Symposium on Physics and Chemistry of Nanostructures and on Nanobiotechnology; September 21-25, Kyiv. 2015. Kyiv, Ukraine, 2015. P. 114.

10. **Vlasov OO**, Byelochkina IV, Kovalev GA, Panov SI, Prylutskyu YuI, Sandomyrsky BP. Effect of aqueous colloid solution of C<sub>60</sub> fullerene on hematological parameters in rats. In: International research and practice conference: nanotechnology and nanomaterials «NANO-2016»; August 24–27, Lviv. 2016. Lviv, Ukraine, 2016. P. 510.

11. **Власов ОО**, Ковальов ГО, Белочкіна ІВ, Сандомирський БП. Влияние экстрактов криоконсервированных фрагментов кожи поросят на состояние про- и антиоксидантной системы при криодеструкции кожи. Проблеми кріобіології і кріомедицини. 2016; 26(2): 170.

12. **Власов ОО**, Ковальов ГО, Мирошниченко МС. Влияние водного коллоидного раствора фуллерена  $C_{60}$  на эпителий после криодеструкции кожи. Проблемы кріобіології і кріомедицини. 2018; 28(2): 170.

13. **Власов ОО**. Експериментальна модель низькотемпературного впливу на шкіру. В: Матеріали XVI Міжнародної наукової конференції студентів, молодих вчених та спеціалістів «Актуальні питання сучасної медицини»; 28-29 березня, Харків. 2019. М-во освіти і науки України, Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна. Харків, Україна, 2019. С. 57.

14. **Власов ОО**, Ковальов ГО. Інтенсивність вільно-радикальних процесів при локальній холодовій травмі після введення екстракту кріоконсервованих фрагментів шкіри поросят або водного колоїдного розчину фулерену  $C_{60}$ . Проблемы кріобіології і кріомедицини. 2019; 29(2): 167.

15. **Власов ОО**. Показники крові щурів при введенні водного колоїдного розчину фулерену  $C_{60}$  в різних концентраціях. В: Матеріали XVI Міжнародної наукової конференції студентів, молодих вчених та спеціалістів «Актуальні питання сучасної медицини»; 26-27 березня, Харків. 2020. М-во освіти і науки України, Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна. Харків, Україна, 2020. С. 61.

16. **Vlasov ОО**, Kovalov GO, Halchenko SYe, Chyzh MO. Effect of cryopreserved fragments of piglet's skin extract or aqueous colloidal solution of fullerene  $C_{60}$  on wound healing after skin cryoablation. In: 1st International scientific and practical conference «Modern science: problems and innovations»; April 5-7, Stockholm. 2020. Stockholm SSPG Publish; Stockholm, Sweden, 2020. P. 84–87.

17. **Vlasov ОО**, Kovalov GO, Chyzh MO, Galchenko SYe. Influence of cryopreserved piglets skin fragments or aqueous colloidal solution of  $C_{60}$  fullerene on destruction and inflammation severity after skin cryodestruction In: The 57th

Annual Meeting of the Society for Cryobiology «CRYO 2020», 21-23 July, Chicago. 2020. Chicago, USA, 2020. p.13–14.

18. **Vlasov OO**, Kovalov GO, Myroshnychenko MS. Effect of extract of cryopreserved piglets skin fragments and aqueous colloidal solution of fullerene C<sub>60</sub> on epidermis morphology in cold skin wound. In: The 57th Annual Meeting of the Society for Cryobiology «CRYO 2020», 21-23 July, Chicago. 2020. Chicago, USA, 2020. p.59–60.

*Патенти України на корисну модель*

19. **Власов ОО**, Ковальов ГО, Тининика ЛМ, Прилуцький ЮІ, Белочкіна ІВ, Сандомирський БП, винахідники; Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, патентовласник. Спосіб лікування ран. Патент України № и 2016 04860. 2016, заявл. 29.04.2016; опубл. 25.10.2016, Бюл. №20.



**Додаток Б.****ВІДОМОСТІ ПРО АПРОБАЦІЮ РЕЗУЛЬТАТІВ ДИСЕРТАЦІЇ**

1. 1st Central European Conference on Regenerative Medicine – «SECRM 2015» 14-15 березня 2015р. (м. Бидгощ, Польща) за темою: «Effect of C<sub>60</sub> Fullerene Aqueous Colloid Solution on Biochemical Parameters of Liver and Visco-elastic Membrane Properties of Rats' Erythrocytes»,
2. 39-а щорічна наукова конференція молодих вчених. «Холод в биологии и медицине – 2015. Актуальные вопросы криобиологии, трансплантологии и биотехнологии» 20-21 травня 2015р. (ІПКіК НАН України, м. Харків) на тему: «Вплив водного колоїдного розчину фулерену C<sub>60</sub> на стан мембран та біохімічні показники *in vivo*».
3. The 52nd Annual Meeting of the Society for Cryobiology «CRYO 2015» 26–29 липня 2015 (м.Острава Чехія) на тему: «Effect of fullerene C<sub>60</sub> on biochemical parameters of liver and kidneys»
4. «Ukrainian-German Symposium on Physics and Chemistry of Nanostructures and on Nanobiotechnology» 21-25 вересня 2015р. (м.Київ) за темою «Effect of C<sub>60</sub> Fullerene Aqueous Colloid Solution on visco-elastic properties of erythrocytes»
5. 40-а щорічна наукова конференція молодих вчених. «Холод в биологии и медицине – 2016» 23-24 травня 2016р. (ІПКіК НАН України, м. Харків) на тему: «Effect of extracts of cryopreserved piglet skin fragments on state of pro- and antioxidant system at skin».
6. Nanotechnology and nanomaterials «NANO-2016» 24–27 серпня 2016 (м.Львів) на тему: «Effect of aqueous colloidal solution of C<sub>60</sub> fullerene on hematological parameters in rat»
7. 42-га щорічна наукова конференція молодих вчених. Холод в биологии и медицине -2018» (ІПКіК НАН України, м. Харків) - за темою: «Влияние водного коллоидного раствора фуллерена C<sub>60</sub> на эпителий после криодеструкции кожи» /

8. XVI Міжнародна наукова конференція студентів, молодих вчених та спеціалістів. «Актуальні питання сучасної медицини» (ХНУ імені В. Н. Каразіна, м. Харків) 28-29 березня 2019 - за темою: «Експериментальна модель низькотемпературного впливу на шкіру/»

9. 43-тя щорічна наукова конференція молодих вчених «Холод в біології и медицине -2019» (ІПКіК НАН України, м. Харків) - за темою «Інтенсивність вільно-радикальних процесів при локальній холодовій травмі після введення екстракту кріоконсервованих фрагментів шкіри поросят або водного колоїдного розчину фулерену  $C_{60}$ »

10. XVII Міжнародна наукова конференція студентів молодих вчених та фахівців «Актуальні питання сучасної медицини» ХНУ імені В. Н. Каразіна 26-27 березня 2020. Харків. Україна (ТЕЗИ ДОПОВІДЕЙ) - за темою.– «Показники крові шурів при введенні водного колоїдного розчину фулерену  $C_{60}$  в різних концентраціях»

11. The 1st International scientific and practical conference. «Modern science: problems and innovations.» (SSPG Publish. Stockholm, Sweden). 2020- за темою: «Effect of cryopreserved fragments of piglet's skin extract or aqueous colloidal solution of fullerene  $C_{60}$  on wound healing after skin cryoablation»

12. The 57th Annual Meeting of the Society for Cryobiology «CRYO 2020», 21-23 July 2020, Chicago, USA - за темою: «Influence of cryopreserved piglets skin fragments or aqueous colloidal solution of  $C_{60}$  fullerene on destruction and inflammation severity after skin cryodestruction»

13. The 57th Annual Meeting of the Society for Cryobiology «CRYO 2020», 21-23 July 2020, Chicago, USA,– за темою: « Effect of extract of cryopreserved piglets skin fragments and aqueous colloidal solution of fullerene  $C_{60}$  on epidermis morphology in cold skin wound»

14, The 56 Meeting of the Society for low temperature biology 2020 «SLTB-2020», 7- 9 October 2020, Louvain,Belgium,– за темою: «Proliferation and apoptosis in wound granulation and connective tissues after skin cryoablation using piglets cryopreserved skin fragments extract