

УДК 612.44.014.086.3:616.127-002:612.649.011.87.014.3

I.G. Беспалова, Л.А. Рогоза, С.Є. Гальченко*, Б.П. Сандомирський

Вплив екстрактів кріоконсервованих фрагментів селезінки свиней та шкіри поросят на процес загоєння холодкових ран у щурів

UDC 612.44.014.086.3:616.127-002:612.649.011.87.014.3

I.G. Bespalova, L.A. Rogoza, S.Ye. Galchenko*, B.P. Sandomirsky

Extracts of Cryopreserved Fragments of Pig Spleen and Piglet Skin Affect the Healing of Cold Wounds in Rats

Реферат: Оптимізація лікування холодкових ран на даний час залишається актуальною задачею, яка може бути вирішена, зокрема, за рахунок введення до складу комплексної терапії імунобіологічних препаратів. Дослідним щурам вводили по 1 мл екстракту кріоконсервованих фрагментів шкіри новонароджених поросят або селезінки свиней у черевну порожнину раз на добу протягом всього строку експерименту. Доза пептидів становила 50 мкг на 100 г маси тварини. Контрольним щурам вводили 1 мл фізіологічного розчину раз на добу. Встановлено, що введення тваринам із холодовою травмою екстракту кріоконсервованих фрагментів шкіри новонароджених поросят або селезінки свиней прискорює загоєння ран. Починаючи з 7-ї доби після рани у тварин, яким вводили екстракт кріоконсервованих фрагментів шкіри новонароджених поросят або селезінки свиней, статистично значуще менша, ніж у контрольних щурів. Також у дослідних тварин більш швидкими темпами нормалізувався індекс зсуву лейкоцитів крові. Після введення тваринам із холодовою травмою екстрактів знизився рівень вільнорадикального окислення ліпідів і рівень ТБКАП у сироватці крові. Так, вже на 14-у добу експерименту в групах із введенням екстракту кріоконсервованих фрагментів селезінки свиней або шкіри новонароджених поросят рівень ТБКАП нормалізувався, а в контрольній групі це відбулося лише на 21-у добу. У тварин, яким вводили екстракти, навантаженість альбуміну лігандами зменшилася швидше, ніж у контролі.

Ключові слова: холодова травма, загоєння, екстракт, шкіра, селезінка.

Реферат: Оптимизация лечения холодковых ран на сегодняшний день остается актуальной проблемой, которая может быть решена, в частности, за счет введения в состав комплексной терапии иммунобиологических препаратов. Опытным крысам вводили по 1 мл экстракта кріоконсервированных фрагментов кожи новорожденных поросят или селезенки свиней внутривентрально раз в сутки на протяжении всего срока эксперимента. Доза пептидов составляла 50 мкг на 100 г массы животного. Контрольным крысам вводили 1 мл физиологического раствора раз в сутки. Установлено, что введение животным с холодовой травмой экстракта кріоконсервированных фрагментов кожи новорожденных поросят и селезенки свиней ускоряет заживление холодковых ран. Начиная с 7-х суток площадь ран у животных, которым вводили экстракт кріоконсервированных фрагментов кожи новорожденных поросят или селезенки свиней, статистически значимо меньше, чем у контрольных крыс. Также у исследуемых животных более быстрыми темпами нормализовался индекс сдвига лейкоцитов крови. После введения животным с холодовой травмой исследованных экстрактов снизился уровень свободнорадикального окисления липидов и уровень ТБКАП в сыворотке крови. Так, уже на 14-е сутки эксперимента в группах животных с введением экстракта кріоконсервированных фрагментов селезенки свиней или кожи новорожденных поросят уровень ТБКАП нормализовался, а в контрольной группе это произошло только на 21-е сутки. У животных, которым вводили экстракты, нагруженность альбумина лигандами снизилась быстрее, чем в контроле.

Ключевые слова: холодовая травма, заживление, экстракт, кожа, селезенка.

Abstract: The optimizing of cold wound treatment has been currently remained a relevant task, which can be particularly solved through the introduction of the combined therapy with immune biological products. The experimental animals were injected with 1 ml extract of cryopreserved fragments of either newborn piglet skin or pig spleen into abdominal cavity once a day within the course of experiment. The dose of peptides was 50 µg per 100 g of an animal. The control rats were injected with 1 ml of physiological saline once a day. It has been established that introduction to the animals with cold trauma of the extract of cryopreserved fragments of either newborn piglet skin or pig spleen accelerates the healing of cold wounds. Starting from day 7 the area of wounds in the animals, which were injected with the extract of cryopreserved fragments of either newborn piglet skin or pig spleen was statistically and significantly lower than in the control rats. In addition, in the experimental animals the index of blood leukocytes shift was more rapidly normalized. After introduction of the extracts to the animals with cold trauma the rate of free radical oxidation of lipids and the TBARS level in blood serum of the animals with cold injury were reduced. Thus, to day 14 of the experiment in the groups with introduced extract of cryopreserved fragments of either pig spleen or newborn piglet skin the level of TBARS was normalized, and in the control group this happened only to day 21. In the animals introduced with the extracts, the ligand-loading of albumin decreased faster than in the control animals.

Key words: cold trauma, healing, extract, skin, spleen.

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

*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:
вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61015;
тел.: (+38 057) 372-74-35, факс: (+38 057) 373-30-84,
електронна пошта: sgalchenko@yandex.ru

Надійшла 11.11.2014

Принята в печать 20.02.2015

Проблеми кріобіології і кріомедицини. – 2015. – Т. 25, №2. – С. 151–161.
© 2015 Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України

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

*To whom correspondence should be addressed:
23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015;
tel.: +380 57 373 7435, fax: +380 57 373 3084,
e-mail: sgalchenko@yandex.ru

Received November, 11, 2014

Accepted February, 20, 2015

Probl. Cryobiol. Cryomed. 2015. 25(2): 151–161.

© 2015 Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

Відмороження – один із видів термічної травми, одержаної внаслідок впливу негативних температур на тканини. Незважаючи на те, що такі травми виникають тільки у холодну пору року та в мирний час зустрічаються значно рідше, ніж опіки, оптимізація лікування відморожень залишається актуальною медичною проблемою [18]. Це пов'язано зі складністю їх лікування, тривалою втратою працездатності та високими показниками інвалідизації постраждалих [20].

На сьогодні важливо проводити подальші дослідження, які стосуються патогенезу холодових ран [11, 25], оскільки одержання нових знань може сприяти покращенню результатів їх лікування. Відомо, що першочерговими заходами під час лікування опікової хвороби та відморожень є найбільш повне та швидке відновлення пошкодженого шкірного покриву для попередження токсичних впливів, інфекційних ускладнень і зневоднення організму [13]. Це може бути досягнуто, зокрема, введенням до складу комплексної терапії імунобіологічних препаратів [2, 28].

У медичній практиці перспективним є використання препаратів, які містять регуляторні пептиди з унікальною сукупністю фізіологічних властивостей [4, 21, 27]. Показано, що екстракти кріоконсервованих фрагментів органів свиней і поросят стимулюють процеси репаративної регенерації при експериментальних патологічних станах [8].

Також було встановлено, що при додаванні екстракту кріоконсервованих фрагментів шкіри новонароджених поросят (ЕШНП) або селезінки свиней (ЕСС) у середовище культивування фібробластів шкіри щурів збільшується їх метаболічна та проліферативна активність [26]. При цьому ефективність ЕШНП була дещо більшою, ніж ЕСС. У зв'язку з цим доцільно вивчити біологічну дію цих екстрактів на рівні організму, зокрема при травмах шкіри.

Мета роботи – дослідити вплив екстрактів кріоконсервованих фрагментів селезінки свиней та шкіри поросят на швидкість загоєння ран, інтенсивність процесів перекисного окислення ліпідів і ступінь інтоксикації організму при холодовій травмі шкіри.

Матеріали та методи

Експерименти проводили за регламентом, затвердженим Комітетом із біоетики ІПКіК НАН України, який було розроблено відповідно до «Загальних принципів експериментів на тваринах», схвалених V Національним конгресом із біоетики (Київ, 2013) та узгоджених з положеннями «Європейської конвенції із захисту хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986).

Frostbite is a kind of thermal injury resulting from the impact of negative temperatures on the tissues. Although such injuries occur in a cold season, and in peacetime they are much rarer than burns, optimization of their treatment has remained an urgent task [25]. This is due to the complicated treatment, long-term disability and high disability rates of the affected individuals [9].

Today it is important to perform further studies concerning the pathogenesis of cold injuries [2, 28], because the new knowledge can contribute to better treatment outcomes. It is known that the primary measures when treating the burn diseases and frostbites are the most complete and rapid recovery of a damaged skin to prevent toxic effects, infectious complications and body dehydration [18]. This can be particularly achieved by including the immunobiological products to a combined therapy [1, 17].

In clinical practice the application of the products containing regulatory peptides with a unique set of physiological properties is perspective [4, 10, 13]. The extracts of cryopreserved fragments of pig and piglet organs have been shown to stimulate a reparative regeneration in model pathology conditions [14].

It also has been found that introduction of the extracts of cryopreserved fragments of newborn piglet skin (NPSE) or pig spleen (PSE) to the medium for culturing rat skin fibroblasts increases their metabolic and proliferative activity [7]. Herewith the efficiency of NSPE was slightly higher than that of PSE. In this regard, it is advisable to study biological effects of these extracts at a body level, in particular in skin lesions.

The research aim was to investigate the effect of extracts of cryopreserved fragments of pig spleen and piglet skin to accelerate the wound healing, intensity of lipid peroxidation and intoxication rate at skin cold trauma.

Materials and methods

The experiments were carried out according to the regulations approved by the Committee in Bioethics of the IPC&C of the National Academy of Sciences of Ukraine, which was developed under the General Principles of Experiments in Animals, approved by the 5th National Congress in Bioethics (Kyiv, 2013) and agreed with the statements of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986).

Pig spleen and piglet skin were disintegrated into fragments of 2–5 mg and three times washed with physiological saline (pH 7.4). The fragments of organs were dropwise supplemented in 1: 1 ratio with the solution of PEO-1500 cryoprotectant in 20% concentration, later they were frozen at a cooling rate of 1 deg/min. The samples were thawed in 37...40°C water bath



Селезінку свиней та шкіру поросят подрібнювали на фрагменти масою 2–5 мг і тричі відмивали фізіологічним розчином (рН 7,4). До фрагментів органів по краплях додавали в співвідношенні 1:1 розчин кріопротектора ПЕО-1500 із концентрацією 20%, далі їх заморожували зі швидкістю охолодження 1 град/хв. Матеріал відігрівали на водяній бані з температурою 37...40°C та відмивали від кріопротектора фізіологічним розчином. У цьому ж розчині фрагменти інкубували протягом 60 хв. Супернатант прогрівали на водяній бані 15 хв та фільтрували через паперовий фільтр [8]. Концентрацію пептидів у екстрактах визначали спектрофотометричним методом при довжині хвиль 280 та 296 нм.

Робота була виконана на білих нелінійних щурах масою 180–210 г. Шерсть у зоні стегна епілювали. Відмороження утворювали під поверхневим наркозом мідним аплікатором із діаметром 10 мм за температури –196°C та 30-секундній експозиції, яку повторювали двічі [23]. Тварини з холодовою травмою були розділені на групи ($n = 28$ у кожній): 1 (контроль) – введення фізіологічного розчину; 2 – введення ЕШНП; 3 – введення ЕСС. Дослідним тваринам вводили по 1 мл екстракту у черевну порожнину раз на добу протягом всього строку експерименту. Доза пептидів становила 50 мкг на 100 г маси тварини. Контрольним щурам вводили 1 мл фізіологічного розчину раз на добу.

Площу ран визначали по цифрових зображеннях за допомогою програми «AxioVision Rel.4.8» («Carl Zeiss», Німеччина). Рівень перекисного окислення ліпідів (ПОЛ) визначали за початковим рівнем продуктів, які реагують із тіобарбітуровою кислотою (ТБКАП), у сироватці крові спектрофотометричним методом за стандартною методикою при довжині хвилі 532 нм [13].

Для оцінки процесів вільнорадикального окислення в комірку хемілюмінометра ХЛ-1250 («Диалин», Росія), яка містить 1 мл фізіологічного розчину, додавали 100 мкл сироватки крові, 100 мкл розчину двовалентного заліза в кінцевій концентрації 5×10^{-2} моль/л та реєстрували світлосуму протягом 60 с, яку виражали в умовних одиницях. При цьому світлосума хемілюмінесценції (ХЛ) була пропорційна кількості вільних радикалів, тобто інтенсивності процесів вільнорадикального окислення. Для визначення стійкості до перекисного окислення в комірку хемілюмінометра, яка містить 1 мл фізіологічного розчину та 100 мкл сироватки крові, додавали 200 мкл 5%-го розчину перекису водню і протягом 60 с реєстрували світлосуму, яку виражали в умовних одиницях [3].

Лейкоцитарну формулу крові визначали на мазках, забарвлених азур II-еозином за Рома-

and washed of cryoprotectant with a physiological saline. The samples were then incubated in the same solution for 60 min. The supernatant was warmed in a water bath for 15 min and filtered through a filter paper [14]. The concentration of peptides in extracts was spectrophotometrically examined at 280 and 296 nm.

The work was performed in 180–210 g white outbred rats. Hair was epilated in the hip area. The frostbite was simulated under a surface anesthesia with copper applicator of 10 mm diameter at –196°C and 30-second exposure, which was repeated twice [24]. The animals with a cold injury were divided into groups ($n = 28$ each): 1 (control) – introduced with a physiological saline; 2 – introduced with the NPSE; 3 – introduced with the PSE. Experimental animals were injected with 1 ml of the extract into an abdomen once a day within the whole experiment. The dose of peptides made 50 mg per 100 g of an animal. The control rats were injected with 1 ml of saline once a day.

The area of wounds was determined by digital images using the AxioVision Rel. 4.8 (Carl Zeiss, Germany). The rate of lipid peroxidation (LPO) was spectrophotometrically determined by an initial level of the thio-barbituric acid reactive substances (TBARS) in blood serum according to standard methods at 532 nm [18].

Free radical oxidation was assessed in a chemiluminescence HL-1250 well (Dialin, Russia): the well with 1 ml physiological saline was supplemented with 100 μ l serum, 100 μ l solution of ferrous iron in a final concentration of 5×10^{-2} mol/l and during 60 s the light sum was recorded, which was expressed in arbitrary units. Herewith the light sum of chemiluminescence (CL) was proportional to the amount of free radicals, *i. e.* the intensity of free radical oxidation. To examine the resistance to lipid peroxidation 200 ml of 5% solution of hydrogen peroxide were introduced into the chemiluminescence well with 1 ml of physiological saline and 100 μ l of blood serum and for 60 s the light sum was recorded and expressed in arbitrary units [3].

Leukogram was determined in the smears stained with azure II-eosin according to Romanowsky-Giemsa by counting 500 cells with the light microscope (LOMO, Russia). Blood samples were taken from the tail vein of animals. Leukocyte shift index (LSI) is the ratio of eosinophils and neutrophils sum to the sum of monocytes and lymphocytes found by the formula: $LSI = (\text{eosinophils} + \text{basophils} + \text{myelocytes} + \text{rod-like} + \text{segmented}) / (\text{monocytes} + \text{lymphocytes})$ [21]. The blood serum was obtained from the animals decapitated under surface anesthesia. The study was performed to 3-, 7-, 14- and 21-st days of the experiment.

To examine the blood serum albumin load with ligands we used a fluorescent probe K-35, synthesized at Institute for Single Crystals of the National Academy of Sciences of Ukraine (Kharkiv), which was dissolved



новським-Гімзою, підраховуючи по 500 клітин у світловому мікроскопі («ЛЮМО», Росія). Кров для досліджень брали з хвостової вени тварин. Індекс зсуву лейкоцитів крові (ІЗЛК), тобто відношення суми еозинофілів і нейтрофілів до суми моноцитів і лімфоцитів, визначали за формулою: $ІЗЛК = (еозинофіли + базофіли + мієлоцити + паличкоядерні + сегментоядерні) / (моноцити + лімфоцити)$ [16]. Для одержання сироватки крові тварин декапітували під поверхневим наркозом. Дослідження проводили на 3-, 7-, 14- та 21-у добу експерименту.

Для визначення навантаженості альбуміну сироватки крові лігандами використовували флуоресцентний зонд К-35, синтезований в ДНУ «НТК Інститут монокристалів НАН України» (Харків), який розчиняли в етиловому спирті з початковою концентрацією $0,58 \times 10^{-3}$ моль/л [1]. Сироватку крові шурів розводили натрій-фосфатним буфером у 40 разів. Для вимірювань використовували спектрофлуориметр «Varian Cary Eclipse» («Varian», США). Проводили автоматичну корекцію спектрів. Ширина вхідної та вихідної щілин монохроматорів становила 5 нм. Флуоресценцію зонда збуджували світлом із довжиною хвилі 420 нм. Всі спектральні вимірювання здійснювали при 20°C у стандартних кварцових кюветках $1 \times 1 \times 3$ см. Спектри обробляли за програмою «Microcal Origin 6.0».

Статистичну обробку результатів виконували непараметричним методом MANOVA. Розрахунок показників проводили за допомогою програми «Statistics 17.0» («SPSS Inc.», США). Дані представлено як середнє значення \pm похибка середнього.

Результати та обговорення

Відомо, що введення екстрактів кріоконсервованих фрагментів органів свиней і поросят сприяє нормалізації процесу репаративної регенерації та імунного статусу організму [7, 8]. Відповідні клітини імунної системи відіграють важливу роль у регуляції проліферації усіх соматичних клітин [9]. На 1-у добу спостереження за динамікою загоєння експериментальних холодкових ран встановлено, що поверхня рани у тварин усіх дослідних груп не відрізнялася.

На 3-ю добу холодкові рани у тварин групи 1 мали неоднорідну поверхню з виступаючими і западаючими ділянками сірого кольору та темнішими вогнищами в центрі, виявлялися дрібні геморагії, які нерідко зливалися між собою. Поверхня ран у тварин груп 2 та 3 вкривалася більш тонким струпом м'якої консистенції.

На 7-у добу в контрольній групі тварин холодкові рани були покриті плівкою фібрину, під якою формувалися слабка грануляція, плазморея переважно в центрі. У тварин після введення ЕСС та ЕШНП

in ethanol with an initial concentration of 0.58×10^{-3} mol/l [15]. The rat blood serum was 40 times diluted with sodium phosphate buffer. Measurements were performed with Varian Cary Eclipse spectrofluorimeter (Varian, USA). The spectra were automatically corrected. The width of the input and output gaps of monochromators was 5 nm. The probe fluorescence was excited with 420 nm light. All the spectra records were done at 20°C in $1 \times 1 \times 3$ cm cuvettes. The spectra were processed with Microcal Origin 6.0 software.

The results were statistically analyzed by non-parametric MANOVA. The indices were calculated using the Statistics 17.0 software (SPSS Inc., USA). Data were presented as mean \pm SEM.

Results and discussion

It is known that the introduction of the extract of cryopreserved fragments of pig and piglet organs contributes to the normalization of regeneration course and immune status of an organism [8, 14]. The relevant immune cells play an important role in regulation of proliferation of all somatic cells [11]. The first 24 hrs of monitoring the dynamics of healing of the experimental cold wounds were notable by absent differences in the surface of wounds in animals of all experimental groups.

To the day 3 the cold wounds in group 1 had a heterogeneous surface with exerted and disengaging sites of gray color and darker foci in the center, small hemorrhages were present, often merged together. The surface of wounds in the animals of groups 2 and 3 was covered with thinner crust of soft consistency.

To the day 7 the cold wounds in the control group of animals were covered with a film of fibrin, under which a weak granulation was formed, plasmorrhage was seen mainly in the center. In the animals after administration of PSE and NPSE the cold wounds were of a uniform pink colour and were less swollen. Marked wound contracting was found.

To day 14 the differences in healing of the cold wounds between the groups of animals were much more pronounced. In the animals of group 1 the cold wounds had the islets of fibrinous plaque, the remained inseparable crust was present somewhere. The lesion in the animals of groups 2 and 3 had a smooth pink granulating surface. To day 21 in the animals injected with NPSE the wound was healed. In case of introducing PSE the wound in one animal also was healed completely, and in the control ones no wound healing was observed.

To day 3 of the experiment no statistically significant differences in wound area of the animals of control and experimental groups were observed (Table. 1). To day 7 the wound area in the animals of groups 2 and 3 was in 1.2 and 1.5 times less than in the control.



холодова рана мала рівномірний рожевий колір, менший набряк. Відмічено значну контрактацію рани.

На 14-у добу відмінності в загоєнні холодкових ран між групами тварин виражені значно більше. У тварин групи 1 холодкові рани мали острівці фібринозного нальоту, місцями зберігався важко відокремлюваний струп. У тварин групи 2 та 3 пошкодження мало гладку гранулюючу поверхню рожевого кольору. На 21-у добу у тварин, яким вводили ЕШНП, рана загоїлася. При введенні ЕСС у однієї тварини рана також повністю загоїлася, а в контрольних щурів загоєння ран не спостерігалось.

На 3-ю добу експерименту статистично значущих відмінностей щодо площі ран тварин контрольної та дослідних груп не спостерігалось (табл. 1). На 7-у добу площа ран у тварин груп 2 та 3 була відповідно в 1,2 та 1,5 рази меншою, ніж у контрольних, а на 14-у добу в 2,9 та 3,8 рази меншою, ніж у контролі. Отже, з 7-ї доби площа ран у тварин, яким вводили ЕШНП або ЕСС, була статистично значуще менша, ніж у контрольних.

Відомо, що при експериментальній термічній травмі в периферичній крові на 3–14-у доби спостереження розвивається лейкоцитоз, обумовлений збільшенням кількості нейтрофілів [15]. На 3-ю добу після моделювання холодкових ран у щурів відносна кількість нейтрофільних лейкоцитів була практично однаковою при всіх умовах експерименту. Відносна кількість лімфоцитів периферичної крові зменшилась із 77,8% (норма) до 52,9% (контроль) та становила 56,1 і 50,3% при введенні ЕСС та ЕШНП відповідно. Спостерігалось також зменшення в крові кількості еозинофілів та моноцитів. Через тиждень після початку експерименту у щурів групи 1 відносна кількість нейтрофілів збільшилась до 50,7%, а в групах 2 та 3 цей показник був значно меншим. Відносна кількість лімфоцитів у контролі становила 41,3%, при введенні ЕСС – 62,7%, ЕШНП – 60,0%. У тварин групи 1 також спостерігалось збільшення кількості еозинофілів у 1,7 рази порівняно з нормою. Такі зміни лейкоцитарної формули свідчать про позитивний вплив екстрактів: зменшення запалення в зоні травми та вираженість некрозу тканин порівняно з контролем.

На 14-у добу експерименту вміст нейтрофільних лейкоцитів в групі 1 складав 30,0% (перевищення норми в 2,1 рази), а еозинофілів – 7,0%, (перевищення норми в 1,8 рази). У тварин, яким вводили екстракти, відносна кількість еозинофілів, моноцитів та лімфоцитів практично відповідала нормі.

Відомо, що багато захворювань та патологічних станів супроводжуються ендогенною інтоксикацією різного ступеня тяжкості, який є непрямим критерієм загального стану хворих [19]. Не є вик-

Таблиця 1. Площа холодкових ран (см²) у дослідних щурів
Table 1. Area of cold wounds (cm²) in experimental rats

Строк спостереження, доба Observation term, day	Умови експерименту		
	Контроль Control	Введення ЕСС PSE introduction	Введення ЕШНП NPSE introduction
3	4,5 ± 0,4	3,8 ± 0,3	3,7 ± 0,4
7	3,4 ± 0,3	2,8 ± 0,2*	2,3 ± 0,2*
14	2,3 ± 0,3	0,8 ± 0,1*	0,6 ± 0,1*
21	1,5 ± 0,1	0,5 ± 0,1*	Загоєння Healing

Примітка: * – відмінності статистично значущі порівняно з контролем, $p \leq 0,05$.

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

And to day 14 this was in 2.9 and 3.8 times, respectively, less than in the control. Thus, starting from day 7 the wound area in the animals injected with NPSE or PSE, was statistically and significantly lower than in the control rats.

It is known that during experimental thermal lesion in peripheral blood to days 3–14 of observation the leukocytosis develops due to increased number of neutrophils [20]. To day 3 after the making of cold wounds in rats the relative number of neutrophilic leukocytes was almost the same under all the experimental conditions. The relative number of peripheral blood lymphocytes decreased from 77.8% (norm) down to 52.9% (control) and was 56.1 and 50.3% in case of introducing the PSE and NPSE, respectively. There was also a decrease in the number of blood eosinophils and monocytes. A week following the start of experiment the rats of group 1 had a relative number of neutrophils increased up to 50.7% and in the groups 2 and 3 this index was much lower. The relative number of lymphocytes in the control was 41.3% and 62.7% when PSE was administered, in case of using NPSE that was 60.0%. In the animals of group 1 there was also observed an 1.7-fold increase in the number of eosinophils if compared with the norm. These changes in leukogram suggest a positive effect of the extracts, *i. e.* a reduced inflammation in the lesion site and evidence of tissue necrosis if compared to the control.

To day 14 of the experiment the content of neutrophilic leukocytes in group 1 made 30.0% (exceeding the norm by 2.1 times), and for eosinophils it was 7.0% (exceeding the norm by 1.8 times). In the animals injected with the extracts, the relative number of

люченням і термічні травми. Показниками ступеня вираженості ендогенної інтоксикації та стану адаптаційного потенціалу організму вважаються інтегральні лейкоцитарні індекси, в яких використано складові лейкоцитарної формули.

Визначення цих індексів, частина яких змінюється вже в преднозологічний період або на найбільш ранніх стадіях захворювання, дозволяє оцінити в динаміці стан різних ланок імунної системи без використання спеціальних методів дослідження [16]. При клінічному дослідженні підвищення ІЗЛК може свідчити про активність запального процесу і порушення імунологічної реактивності.

На 3-ю добу після нанесення холодової травми контрольним тваринам ІЗЛК перевищував норму в 4,8 раза та в 3,6 і 4,2 раза при введенні ЕСС або ЕШНП (табл. 2). Найбільш виражені відмінності ІЗЛК було встановлено на 7-у добу експерименту. У щурів групи 1 спостерігалось подальше його підвищення з 1,01 до 1,49, а у тварин інших груп відбувалося зменшення порівняно з 3-ю добою. Під час введення тваринам із холодовою травмою ЕСС величина ІЗЛК складала 34%, а при ЕШНП – 46% від контрольних значень. На 14-у добу показник зменшувався в усіх групах тварин. На 21-у добу у тварин груп 2 та 3 ІЗЛК сягав значень норми. Це може свідчити про те, що введення тваринам екстрактів зменшує вираженість запального процесу та нормалізує імунні реакції.

Реакції ПОЛ є вільнорадикальними, вони постійно відбуваються в організмі та активуються при багатьох патологічних процесах. Термічна травма також супроводжується активацією реакції ПОЛ [6]. У нормальному стані стимуляція вільнорадикального окислення ліпідів компенсується адекватним підвищенням активності антиоксидантної системи [17]. При патологічних змінах в

eosinophils, monocytes and lymphocytes was almost the same as in the norm.

It is known that many diseases and pathological states are accompanied with endogenous intoxication of varying severity, which is an indirect criterion of general condition of patients [26]. Thermal injury is not an exception. Integral leukocyte indices, including the components of leukogram, are considered as the parameters of the severity of endogenous intoxication and adaptation potential state of the body.

The determination of these indices, some of which change already in pre-nosological period or at the earliest disease stages, enables the dynamic assessment of the status of various links of immune system without involving of specific research techniques [21]. An increase of LSI in a clinical study may indicate the activity of inflammatory process and disorders of immunological reactivity.

To day 3 after making a cold lesion to the control animals the LSI exceeded the norm by 4.8 times, and it did 3.6 and 4.2 times after introduction of PSE or NPSE, correspondingly (Table 2). The most pronounced differences in LSI were found to day 7 of the experiment. There was its further improvement in group 1 rats from 1.01 to 1.49, and in other animal groups there was a decrease if compared to day 3. In the animals with cold injury introduced with PSE the LSI value was 34%, and for NPSE it made 46% of the control values. To day 14 the index decreased in all the groups of animals. To day 21 the LSI values in the animals of the groups 2 and 3 reached the normal ones. This may indicate that the introduction of the extract to the animals reduced the severity of inflammation and normalized the immune responses.

LPO consists of free radical reactions, they occur permanently in an organism and are activated under many pathological processes. Thermal injury is also accompanied by activation of lipid peroxidation reaction [6]. Normally the stimulation of free radical oxidation of lipids is compensated by adequate increase in activity of antioxidant system [22]. Pathological changes in an organism originated due to several reasons are accompanied with an imbalance between free radical processes intensity and functional activity of antioxidant systems. This results in a rapid exhaustion of antioxidant pool.

To day 3 of the experiment TBARS levels in the animals administered with PSE exceeded the norm by 1.3 times, and in control and in case of NPSE it was 1.7 times higher than the norm (Table 3). TBARS level in the control group to day 7 continued to rise from 7.1 to 8.9, and in the groups with introduced PSE and NPSE it *vice versa* decreased if compared with the control (51 and 64%, respectively). In groups 2 and 3 the TBARS level normalized to day 14 of the experiment, and in group 1 this occurred only to day 21.

Таблиця 2. Величина ІЗЛК у дослідних щурів
Table 2. Value of LSI in experimental rats

Умови експерименту Experimental conditions	Строк спостереження, доба Observation term, day			
	3	7	14	21
Норма Norm	0,21			
Контроль Control	1,01	1,49	0,70	0,29
Введення ЕСС PSE introduction	0,75	0,51	0,34	0,15
Введення ЕШНП NPSE introduction	0,89	0,69	0,41	0,23



організмі внаслідок різних причин розвивається дисбаланс між інтенсивністю вільнорадикальних процесів та функціональною активністю антиоксидантних систем. При цьому відбувається швидке виснаження антиоксидантного потенціалу.

На 3-ю добу експерименту рівень ТБКАП у тварин, яким вводили ЕСС, перевищував норму в 1,3 раза, а в контролі та при введенні ЕШНП – в 1,7 раза (табл. 3). Рівень ТБКАП у контрольній групі на 7-у добу продовжував зростати з 7,1 до 8,9, а в групах з введенням ЕСС та ЕШНП навпаки зменшився порівняно з контролем (51 та 64% відповідно). У групах 2 та 3 рівень ТБКАП нормалізувався вже на 14-у добу експерименту, а в групі 1 – лише на 21-у добу.

Відомо, що ХЛ супроводжує окислювальні екзотермічні реакції, переважно ланцюгові, які розвиваються за радикальним механізмом [5]. Показано, що інтенсивність світіння пропорційна швидкості рекомбінації вільних радикалів. Оскільки їх власне світіння дуже слабе, його вимірювати важко. Деякі дослідники зробили спробу посилити світіння додаванням до плазми крові барвників, перекису водню, іонів двовалентного заліза тощо [14, 22]. Встановлено, що світлосума ХЛ, яка індукована двовалентним залізом, пропорційна кількості вільних радикалів, а індукована перекисом водню – стійкості біологічної системи до вільнорадикального окислення.

На 3-ю добу в усіх експериментальних групах світлосума ХЛ сироватки крові, індукованої Fe^{2+} , була статистично значуще більшою, ніж у нормі (табл. 4). На 7-у добу цей показник дещо зменшувався, але при введенні екстрактів більш інтенсивно. Так, у групі 3 даний показник був у 2,1 раза меншим, а у групі 2 – в 1,2 раза. На 14-у добу спостерігалось подальше зменшення світлосуми і на 21-у добу в групах 2 та 3 показник повертався до норми, а в контрольній групі в 1,2 раза перевищував норму.

Як видно з табл. 5, світлосума індукованої H_2O_2 на 3-ю добу в усіх експериментальних групах вища, ніж у нормі. На 7-у добу цей показник в усіх експериментальних групах дещо зменшився, але при введенні екстрактів виявлено більш значне його зменшення: ЕСС – в 1,7 раза, ЕШНП – в 1,3 раза. На 14-у добу експерименту світлосума ХЛ в усіх групах тварин поступово зменшилася, а на 21-у добу в групах 2 та 3 цей показник повертався до норми.

Дослідження власної флуоресценції біологічних матеріалів не завжди дозволяє одержати бажану інформацію про об'єкт. У такому випадку використовують штучні флуорофори, тобто спеціально синтезовані речовини, які мають специфічний спектр флуоресценції або в вільному стані, або при зв'язу-

Таблиця 3. Рівень ТБКАП (мкмоль/л) у сироватці крові дослідних щурів

Table 3. TBARS level ($\mu\text{mol/l}$) in blood serum of experimental rats

Умови експерименту Experimental conditions	Строк спостереження, доба Observation term, day			
	3	7	14	21
Норма Norm	4,2 ± 0,3			
Контроль Control	7,1 ± 0,5 ¹	8,9 ± 0,7 ¹	6,5 ± 0,4	4,3 ± 0,3
Введення ЕСС PSE introduction	5,6 ± 0,4 ^{1,2}	4,6 ± 0,3 ²	4,1 ± 0,3 ²	4,3 ± 0,4
Введення ЕШНП NPSE introduction	6,2 ± 0,5 ^{1,2}	5,7 ± 0,4 ^{1,2}	4,4 ± 0,3	4,2 ± 0,4

Примітка: відмінності статистично значущі ($p \leq 0,05$) порівняно з: ¹ – нормою; ² – контролем.

Note: the differences are statistically significant ($p \leq 0.05$) if compared with: ¹ – norm; ² – control.

The CL is known to accompany oxidative exothermic reactions, mainly the chain ones, which develop by involving radicals [5]. It was shown that the luminescence intensity was proportional to the rate of recombination of free radicals. As their own luminescence is very weak, it is difficult to be measured. Some researchers have attempted to enhance the luminescence by supplementing the blood plasma with the dyes, hydrogen peroxide, ferrous iron ions *etc.* [19, 23]. It has been established that the light sum of CL, induced by ferrous iron is proportional to the amount of free radicals and the hydrogen peroxide induced one depends on the resistance of biological system to free radical oxidation.

To day 3 in all the experimental groups the CL light sum of blood serum induced by Fe^{2+} was statistically and significantly higher than normal one (Table 4). By day 7, this index decreased slightly, and more intensively if the extracts were introduced. In group 3 the index was 2.1 times lower, and in group 2 this was by 1.2 times. To day 14 there was further reduction of light sum and to day 21 in the groups 2 and 3 it returned back to normal one, and in the control group it was 1.2 times higher than normal one.

Table 5 shows that the light sum of CL induced by H_2O_2 to day 3 in all the experimental groups was higher than normal one. To day 7 the index in all the experimental groups decreased slightly, and the introduction of the extracts resulted in its significant decrease: with PSE in 1.7 times and in 1.3 times with NPSE. To day 14 of the experiment the CL light sum in all the groups of animals gradually decreased, and to day 21 it returned to norm in the groups 2 and 3.



Таблиця 4. Світлосума ХЛ сироватки крові дослідних щурів, індукованої Fe²⁺

Table 4. Fe²⁺-induced CL light sum in blood serum of experimental rats

Умови експерименту Experimental conditions	Строк спостереження, доба Observation term, day			
	3	7	14	21
Норма Norm	79 ± 6			
Контроль Control	375 ± 31 ¹	292 ± 22 ¹	135 ± 10 ¹	98 ± 7
Введення ECC PSE introduction	254 ± 22 ¹	142 ± 11 ^{1,2}	84 ± 7 ²	68 ± 5
Введення ЕШНП NPSE introduction	296 ± 24 ¹	254 ± 23 ¹	89 ± 6 ²	85 ± 7

Примітка: відмінності статистично значущі ($p \leq 0,05$) порівняно з: ¹ – нормою; ² – контролем.

Note: the differences are statistically significant ($p \leq 0.05$) if compared with: ¹ – norm; ² – control.

ванні з тим чи тим об'єктом дослідження [12]. Флуоресценція таких речовин (зондів), як правило, має високий квантовий вихід та достатньо великий термін життя.

Флуоресцентні зонди чутливі до структурно-функціональних змін у біологічних мембранах, мікров'язкості їх ліпідного бішару, зв'язування з білками та іншими речовинами, структурних перебудов у білках, зміни мембранного потенціалу та концентрації внутрішньоклітинного кальцію та ін. Флуоресцентні зонди використовуються для діагностики та прогнозу розвитку захворювань, виявлення факторів ризику та контролю ефективності лікування [24].

На здатності низькомолекулярних лігандів витіснити флуоресцентний зонд К-35 із центрів зв'язування на молекулі сироваткового альбуміну людини ґрунтується розроблений Г.Є. Добрецовим і співавт. метод визначення ступеня інтоксикації організму речовинами, які утворюються в процесі життєдіяльності або надходять із зовнішнього середовища [1]. Також було показано, що барвник К-35 може бути використаний для оцінки ступеня навантаження лігандами різного походження сироваткового альбуміну щурів [10]. Інтенсивність флуоресценції цього зонда тим менша, чим більше альбумін навантажений лігандами.

При визначенні інтенсивності флуоресценції зонда К-35 у сироватці крові щурів було встановлено, що на 3-ю добу в усіх експериментальних групах тварин інтенсивність флуоресценції зонда в 1,5–1,7 раза нижча норми (табл. 6). На 7-у добу вона дещо збільшилася, але в групі з введенням

Таблиця 5. Світлосума ХЛ сироватки крові дослідних щурів, індукованої H₂O₂

Table 5. H₂O₂-induced CL light sum in blood serum of experimental rats

Умови експерименту Experimental conditions	Строк спостереження, доба Observation term, day			
	3	7	14	21
Норма Norm	173 ± 11			
Контроль Control	506 ± 48 ¹	450 ± 41 ¹	245 ± 20 ¹	192 ± 16
Введення ECC PSE introduction	411 ± 32 ¹	271 ± 21 ^{1,2}	199 ± 14	184 ± 15
Введення ЕШНП NPSE introduction	436 ± 39 ¹	341 ± 30 ^{1,2}	205 ± 16	166 ± 12

Примітка: відмінності статистично значущі ($p \leq 0,05$) порівняно з: ¹ – нормою; ² – контролем.

Note: the differences are statistically significant ($p \leq 0.05$) if compared with: ¹ – norm; ² – control.

Studies of intrinsic fluorescence of biological samples do not allow the persistent obtaining of the expected information about the object. To overcome such obstacles one uses artificial fluorophores, *i.e.* purposefully synthesized substances with a specific spectrum of fluorescence either in a free state or if being bound to one or another research object [16]. Fluorescence of these substances (probes) typically has a high quantum yield and satisfactory lifetime.

Fluorescent probes are sensitive to structural and functional changes in biological membranes, microviscosity of their lipid bilayer, binding to proteins and other substances, structural rearrangements in proteins, alterations in membrane potential and calcium concentration inside a cell *etc.* Fluorescent probes are used for the diagnosis and prognosis of a disease development, identifying the risk factors and monitoring the treatment efficiency [27].

The method developed by G.E. Dobretsov *et al.* for determining the level of an organism intoxication by the substances formed during vital activity or entered from the environment [15] is based on ability of low molecular ligands to displace the fluorescent probe K-35 from the binding centers situated on a molecule of human serum albumin. It was shown that the dye K-35 could be used to assess the level of rat serum albumin loading by ligands of different origin [12]. The probe fluorescence intensity is the lower, the more loaded albumin by ligands is.

Assessing the fluorescence intensity of probe K-35 in blood serum of rats allowed to found that to day 3 the fluorescence intensity of the probe in all the experimental groups of animals was in 1.5–1.7 times lower



ЕСС це збільшення незначне. Та вже на 14-у добу в групах з введенням екстрактів цей показник досягає норми, тоді як в контрольній групі нормалізація відбувається лише на 21-у добу експерименту. Отже, у тварин, яким вводили екстракти, навантаженість альбуміну лігандами зменшується швидше, ніж у контрольних тварин.

Таким чином, як видно з наведених даних, починаючи з 7-ї доби площа ран у тварин, яким вводили ЕШНП або ЕСС, статистично значуще менша, ніж у контрольних щурів. Отже, досліджувані екстракти прискорюють загоєння холодкових ран в експерименті. Проте, механізм їх дії, скоріше за все, різний. Можна припустити, що тканинспецифічні пептиди, які входять до складу ЕШНП, нормалізують або стимулюють проліферативну активність клітин шкіри при травмі. А введення тваринам ЕСС позитивно впливає на імунний статус організму, в тому числі і на лімфоцити, відповідна частина яких бере участь у регуляції клітинного росту соматичних тканин [9]. Таке припущення опосередковано підтверджується тим, що у тварин, яким вводили ЕСС, відносна кількість лімфоцитів на 14-у добу практично відповідала нормі, на відміну від контролю. Отримані дані також свідчать, що у тварин із холодовою травмою, яким вводили екстракти, зменшується інтенсивність вільнорадикального окислення ліпідів та рівень ТБКАП у сироватці крові, а отже і вираженість процесу запалення. У цих тварин також зменшується навантаженість альбуміну лігандами.

У подальшому планується дослідити вплив спільного введення ЕШНП та ЕСС на процес загоєння холодкових ран у щурів.

Висновки

Уведення тваринам ЕШНП або ЕСС прискорює загоєння холодкових ран, сприяє більш ранній нормалізації формули крові та зменшенню ендогенної інтоксикації організму. У тварин із холодовою травмою, яким вводили екстракти, інтенсивність вільнорадикального окислення ліпідів і концентрація ТБКАП у сироватці крові зменшуються більш швидкими темпами порівняно з цими показниками у контрольних тварин, яким вводили фізіологічний розчин. У тварин із холодовою раною збільшується навантаженість альбуміну лігандами, а при введенні досліджених екстрактів цей показник нормалізується в більш ранні строки.

Література

1. Альбумин сыворотки крови в клинической медицине / Под ред. Ю.А. Грызунова и Г.Е. Добрецова. Кн. 2. – М.: ГЭОТАР, 1998. – 440 с.

Таблиця 6. Інтенсивність флуоресценції (умовн. од.) зонда К-35 у сироватці крові дослідних щурів

Table 6. Fluorescence intensity (arb.units) of K-35 probe in blood serum of experimental rats

Умови експерименту Experimental conditions	Строк спостереження, доба Observation term, day			
	3	7	14	21
Норма Norm	408 ± 29			
Контроль Control	234 ± 17 ¹	276 ± 21 ¹	302 ± 29 ¹	369 ± 31
Введення ЕСС PSE introduction	245 ± 19 ¹	249 ± 10 ¹	399 ± 17 ^{1,2}	378 ± 36
Введення ЕШНП NPSE introduction	266 ± 23 ¹	295 ± 9 ¹	413 ± 15 ²	396 ± 32

Примітка: відмінності статистично значущі ($p \leq 0,05$) порівняно з: ¹ – нормою; ² – контролем.

Note: the differences are statistically significant ($p \leq 0.05$) if compared with: ¹ – norm; ² – control.

than the norm (Table 6). To day 7 it increased slightly, but in the group with the PSE introduction this rise was insignificant. Already to day 14 in the groups with the introduced extracts the index approached the norm, while in the control group the normalization occurred only to day 21 of the experiment. Thus, in the animals injected with the extracts, the albumin loading with ligands decreased faster than in the control animals.

Thus, as the provided data demonstrate, the area of wounds in the animals injected with NPSE or PSE was statistically and significantly lower than in the control rats starting from day 7. So, the studied extracts accelerate the healing of cold wounds in the experimental conditions. However, mechanism of their action is likely different. We can assume that tissue specific peptides, which are the components of NPSE, stimulate or normalize a proliferative activity of skin cells post trauma. The introduction of PSE to the animals positively affects an immune status of the body, including lymphocytes, the relevant part of which is involved into regulation of cell growth in somatic tissues [11]. This assumption is indirectly confirmed by the fact that in the animals which were administered with PSE, the relative number of lymphocytes to day 14 was almost equal to the norm, in contrast to the control. The findings also show that in the animals with cold injury treated with extracts the intensity of free radical oxidation of lipids and TBARS level in serum reduce, and hereby the severity of the inflammation process does. In these animals albumin loading with ligands is also reduced.

Following investigation would be targeted to the impact of a combined administering of NPSE and PSE on cold wound healing in rats.



2. Арефьева Т.И., Соколов В.О., Пылаева Е.А. и др. Пептидный фрагмент 29–40 аминокислотной последовательности моноцитарного хемотоксического белка-1 (MPC-1) стимулирует миграцию моноцитов *in vivo* и способствует ранозаживлению // Доклады Академии Наук. – 2012. – Т. 446, №1. – С. 106–109.
3. Арутюнян А.В., Дубинина Е.Е., Зыбина Н.Н. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма: Метод. рекомендации. – СПб.: Фолиант, 2000. – С. 46–50.??
4. Аскарлов Т.А., Меметов Ф.Ю., Батырбеков А.А. и др. Влияние Лакто Флор на иммунный статус животных с ожоговой болезнью и гормониндуцированным иммунодефицитом // Проблемы биологии и медицины. – 2003. – №1–3. – С. 14–17.
5. Бабенко Г.А., Гонский Я.И., Антоник И.М. и др. О роли металлов в процессах свободнорадикального окисления в тканях организма по данным спонтанной и индуцированной хемилюминесценции // Хемилюминесценция. – М.: Наука, 1983. – С. 164–179.
6. Бабская Ю.Е., Лавров В.А., Омнина Н.А. Интенсивность свободно-радикального окисления липидов в острый период ожоговой болезни // Хирургия. – 1985. – №11. – С. 95–97.
7. Бызов В.В., Высеканцев И.П., Гальченко С.Е. и др. Влияние эндобронхиального введения экстракта криоконсервированных фрагментов ксеноселезенки на некоторые факторы местного иммунитета в комплексной терапии больных с абсцессами легких // Проблемы криобиологии. – 2001. – №4. – С. 65–70.
8. Гальченко С.Е. Экстракти криоконсервованих фрагментів ксеноорганів: одержання та біологічна дія // Проблеми криобиології. – 2005. – Т. 15, №3. – С. 403–406.
9. Донцов В.И. Регуляция лимфоцитами клеточного роста соматических тканей и новая иммунная теория старения. Обзор // Профилактика старения. – 1998. – Вып. 1. – С. 40–63.
10. Дюбко Т.С., Сидоров В.И., Соколик О.А. и др. Сравнительное изучение взаимодействия флуоресцентных красителей K-35 и K7-1045 с белками сыворотки крови крыс // Вісник ХНУ ім. В.Н. Каразіна. Серія: біологія. – 2009. – Вип. 9, №856. – С. 11–18.
11. Емельянов А.Ю., Липатов К.В., Фархат Ф.А. Отморожения: актуальные вопросы патогенеза, диагностики и лечения // Хирургия. – 2002. – №12. – С. 59–63
12. Иванова С.В., Кирпиченок Л.Н. Использование флуоресцентных методов в медицине // Мед. новости. – 2008. – №12. – С. 56–61.
13. Козинец Г.П., Слесаренко С.В., Радзиховский А.П. и др. Ожоговая интоксикация. Патогенез, клиника, принципы лечения. – М.: МЕДпресс. информ. – 2005. – 22 с.
14. Лопухин Ю.М., Владимиров Ю.А., Молоденков М.Н. и др. Регистрация хемилюминесценции составных частей сыворотки крови в присутствии двухвалентного железа // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 1983. – №2. – С. 61–63.
15. Осиков М.В., Лихачева А.Г., Телешева Л.Ф. Показатели врожденного иммунитета и морфология очага повреждения при экспериментальной термической травме // Мед. науки. Фундаментальные исследования. – 2012. – №8. – С. 381–386.
16. Островский В.К., Машенко А.В., Янголенко Д.В. и др. Показатели крови и лейкоцитарного индекса интоксикации в оценке тяжести и определении прогноза при воспалительных, гнойных и гнойно-деструктивных заболеваниях // Клини. лаб. диагностика. – 2006. – №6. – С. 50–53.
17. Петрович Ю.Н., Гуткин Д.В. Свободнорадикальное окисление и его роль в патогенезе воспаления, ишемии и стресса // Патолог. физиол. – 1986. – №5. – С. 85–92.
18. Слесаренко С.В., Бадюл П.А. К вопросу о необходимости стандартизации медицинской помощи при отморожениях // Хирургія України. – 2007. – №4. – С. 6–10.

Conclusions

Treatment of the animals with either NPSE or PSE accelerated the cold wound healing, promoted an earlier normalization of blood counts and decreasing an endogenous intoxication. In the animals with cold lesion, which were administered with the extracts, the intensity of free radical oxidation of lipids and TBARS concentration in blood serum decreased more rapidly if compared with the indices in the control animals administered with physiological saline. In the animals with cold wound the albumin loading with ligands increased, and when introducing the studied extracts the value was normalized at earlier terms.

References

1. Arefyeva T.I., Sokolov V.O., Pylaeva E.A. et al. Peptide fragment of 29–40 of amino acid sequence of monocytic chemotactic protein-1 (MPC-1) stimulates the migration of monocytes *in vivo* and provides wounds healing. Doklady Akademii Nauk 2012; 446 (1): 106–109.
2. Arford S. Treatment of frostbite: a cold-induced injury. J Wound Ostomy Continence Nurs 2008; 35 (6): 625–630.
3. Arutyunyan A.V., Dubinina E.E., Zybina N.N. Methods of assessing of free radical oxidation and antioxidant system of a body. Metod. Recommendations. St. Petersburg: Foliant; 2000.
4. Askarov T.A., Memetov F.U., Bатырбеков A.A. et al. Influence of Lacto Flor at immune status of animals with burn disease and hormone-induced immune deficiency. Problemy Biologii i Meditsiny 2003; 1–3: 14–17.
5. Babenko G.A., Gonskiy Ya.I., Antonik I.M. et al. About role of metals in the process of free radical oxidation in organism's tissues on data of spontaneous and induced chemiluminescence. In: Chemiluminescence. Moscow: Nauka; 1983. p. 164–178.
6. Babskaya Y.E., Lavrov V.A., Omonina N.A. Intensity of free radical oxidation of lipids in acute period of burn disease. Khirurgiya 1985; 11: 95–97.
7. Bepalova I., Belochkina I., Galchenko S., Sandomirsky B. Organospecific influence of the extract of cryopreserved piglet's skin fragments. Biological effect of cNPSE and cPSE in fibroblast culture. Periodicum Biologorum 2014; 116 (1): 99–103.
8. Byzov V.V., Vysekantsev I.P., Galchenko S.Ye. et al. Effect of endobronchial introduction of extracts of cryopreserved xeno-spleen fragments on some local immunity factors in complex therapy of patients with lungs abscesses. Problems of Cryobiology 2001; 4: 65–70.
9. Chadaev A.P., Sviridov S.V., Klimiashvili A.D. et al. Cold injury. Ros Med Zhurnal 2005; 35: 20–23.
10. Chorna I.O., Ligonenko O.V., Girin L.V. Changes at the system of homeostasis under the influence of peptidic bioregulators in the time of injury treatment. Klin Khirurgiya 2002; (11–12): 77–78.
11. Dontsov V.I. Regulation of cell growth of somatic tissues by lymphocytes and new theory of aging. Review. Profilaktika Stareniya 1998; 1: 40–63.
12. Dyubko T.S., Sidorov V.I., Sokolik O.A. et al. Comparative analysis of fluorescent stain K-35 and K7-1045 interaction with proteins of rat's blood serum. Journal of V.N. Karazin Kharkiv National University. Series: biology. 2009; 9 (856): 11–18.
13. Eming S.A., Whitsitt J.S., He L. Particle-mediated gene transfer of PDGF isoforms promotes wound repair. J Invest Dermatol 1999; 112 (3): 297–302.



19. Сперанский И.И., Самойленко Г.Е., Лобачева М.В. Общий анализ крови – все ли его возможности исчерпаны? Интегральные индексы интоксикации как критерии оценки тяжести течения эндогенной интоксикации, ее осложнений и эффективности проводимого лечения // *Здоровье Украины*. – 2009. – Т. 19, №6. – С. 51–57.
20. Чадаев А.П., Свиридов С.В., Климиашвили А.Д. и др. Холодовая травма // *Рос. мед. журнал*. – 2005. – №35. – С. 20–23.
21. Чорна І.О., Лігоненко О.В., Гірін Л.В. Зміни у системі гемостазу під впливом пептидних біорегуляторів при загоєнні рани в експерименті // *Клін. хірургія*. – 2002. – №11–12. – С. 77–78.
22. Шестаков В.А., Бойчевская Н.О., Шерстнев М.П. Хемилюминесценция плазмы крови в присутствии перекиси водорода // *Вопр. мед. химии*. – 1979. – №2. – С. 132–137.
23. Шкодовская Н.Ю., Гойденко Н.И., Гальченко С.Е., Сандомирский Б.П. Экспериментальные холодовые раны кожи при терапии экстрактами плаценты официальным и кожи новорожденных поросят // *Проблеми мед. науки та освіти*. – 2005. – №4. – С.41–45.
24. Яворская В.А., Белоус А.М., Мохамед А.Н. Исследование уровня молекул средней массы и процессов перекисного окисления липидов в крови больных с разными формами инсульта // *Журнал неврологии и психиатрии*. – 2000. – №1. – С. 48–51.
25. Arford S. Treatment of frostbite: a cold-induced injury // *J. Wound Ostomy Continence Nurs.* – 2008. – Vol. 35, №6. – P. 625–630.
26. Bespalova I., Belochkina I., Galchenko S., Sandomirsky B. Organospecific influence of the extract of cryopreserved piglet's skin fragments. Biological Effect of cNPSE and cPSE in Fibroblast Culture // *Periodicum Biologorum*. – 2014. – Vol. 116, №1. – P.99–103.
27. Eming S.A. Whitsitt J.S. He L. Particle-mediated gene transfer of PDGF isoforms promotes wound repair // *J. Invest. Dermatol.* – 1999. – Vol. 112, №3. – P. 297–302.
28. 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. – Vol. 240, №2. – P. 313–320.
14. Galchenko S.Ye. Extracts of cryopreserved fragments of xenoorgans: obtaining and biological effect. *Problems of Cryobiology* 2005; 15 (3): 403–406.
15. Gryzunov U.A. and Dobretsov G.E., editors. Blood serum albumin in clinical medicine. Book 2. Moscow: GEOTAR; 1998.
16. Ivanova S.V., Kirpichonok L.N. Application of fluorescent methods in medicine. *Med Novosti* 2008; 12: 56-61.
17. 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.
18. Kozinets G.P., Slesarenko S.V., Radzihovsky A.P. et al. Burn intoxication. Pathogenesis, clinical picture, principle of treatment. Moscow: MEDpress-inform. 2005.
19. Lopukhin Yu.M., Vladimirov Yu.A., Molodenkov M.N. et al. Chemiluminescence registration of blood serum components in bivalent iron presence. *Bul Experim Biologii i Meditsiny* 1983; (2): 61–63.
20. Osikov M.V., Likhacheva A.G., Telesheva L.F. Inherent immunity rates and injury focus morphology at experimental thermal injury. *Med Nauki Fundamentalnye Issledovaniya* 2012; 8: 381–386.
21. Ostrovskiy V.K., Maschenko A.V., Yangolenko D.V. et al. Blood and leukocytic intoxication rates when assessing the severity and estimating the prognosis at inflammatory, purulent and pyo-destructive diseases. *Klin Lab Diagnostika* 2006; 6: 50–53.
22. Petrovich Yu.N., Gutkin D.V. Free radical oxidation and its role in inflammation, ischemia and stress pathogenesis. *Patolog Fiziologia* 1986; 5: 85–92.
23. Shestakov V.A., Bojchevskaya N.O., Sherstnyov M.P. Chemiluminescence of blood plasma in presence of hydrogen peroxide. *Vopr Med Khimii* 1979; 2: 132–137.
24. Shkodovskaya N.Yu., Gojdenko N.I., Galchenko S.Ye., Sandomirsky B.P. Experimental skin cold injuries in therapy by placenta extracts, officinal one and newborn piglets' skin. *Problemy Med Nauky ta Osvity* 2005; (4): 41–45.
25. Slesarenko S.V., Badul P.A. To the question for necessity of standardizing of medical aid at frostbite. *Khirurgiya Ukrainy* 2007; 4: 6–10.
26. Speranskiy I.I., Samoilenko G.E., Lobachova M.V. General blood analysis – are all its facilities exhausted? Integral indices of intoxication as criterion of assessing the severity of endogenous intoxication, its complication and efficiency of treatment implemented. *Zdorovie Ukrainy* 2009; 19(6): 51–57.
27. Yavorskaya V.A., Belous A.M., Mohamed A.N. Study of middle mass molecules level and processes of lipid peroxidation in the blood of patients with different forms of stroke. *Zhurnal Nevrologii i Psikhatrii* 2000; 1: 48–51.
28. Yemelyanov A.Yu., Lipatov K.V., Farhat F.A. Frostbites: actual questions of pathogenesis, diagnosis and treatment. *Khirurgiya* 2002; 12: 59–63.