

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І КРІОМЕДИЦИНИ

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

**ВПЛИВ ЕКСТРАКТУ КРІОКОНСЕРВОВАНИХ ФРАГМЕНТІВ ШКІРИ
ПОРОСЯТ І ФУЛЕРЕНУ C₆₀ НА АЛЬТЕРАТИВНІ ТА РЕПАРАТИВНІ
ПРОЦЕСИ В ШКІРІ ПІСЛЯ КРІОДЕСТРУКЦІЇ
(ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ)**

14.01.35 – кріомедицина

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата медичних наук

Харків – 2021

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України.

Науковий керівник: кандидат медичних наук, старший науковий співробітник **Ковальов Геннадій Олександрович**, Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, старший науковий співробітник відділу кріомедицини, м. Харків.

Офіційні опоненти: доктор медичних наук, професор **Олійник Григорій Анатолійович**, Харківська медична академія післядипломної освіти МОЗ України, завідувач кафедри комбустіології, реконструктивної та пластичної хірургії, м. Харків;

доктор медичних наук, професор **Шепітько Володимир Іванович**, ВДНЗ України «Українська медична стоматологічна академія» МОЗ України, завідувач кафедри гістології, цитології та ембріології, м. Полтава.

Захист дисертації відбудеться «20» квітня 2021 р. о 13:30 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 64.242.01 Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України за адресою: 61016, м. Харків, вул. Переяславська, 23.

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України за адресою: 61016, м. Харків, вул. Переяславська, 23.

Автореферат розісланий «18» березня 2021 р.

Вчений секретар спеціалізованої
вченої ради Д 64.242.01



О. В. Фалько

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Обґрунтування вибору теми дослідження. Кріохірургічний метод ґрунтується на використанні низьких температур для деструкції патологічних тканин (Грищенко В.И., Сандомирский Б.П., 1987; Pasquali, 2015; Abramovits W. et al., 2016). 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 (Pasquali, 2015). В кріохірургії для визначення методів контрольованого руйнування тканин на основі застосування низьких температур використовують термін кріоабляція (Erinjeri et al., 2010). Для моніторингу глибини та площі кріоушкодження використовують такі параметри як: швидкість охолодження, цільова температура та експозиція впливу (Pasquali, 2015). Кріоабляція широко застосовується в лікуванні кератозів, бородавок; доброякісних, передракових та злоякісних захворювань шкіри (Abramovits W. et al., 2016; Cranwell et al., 2017; Baust et al., 2019). До переваг кріоабляції відносять стимуляцію специфічного протипухлинного імунітету, низький ризик метастазування та знеболювальний ефект охолодження (Baust et al., 2019; Чиж Н.А. та співавт., 2019). Для гарантованого руйнування пухлин шкіри необхідно підтримувати температуру в зоні кріовпливу нижче за поріг їх кріостійкості: $-20\div-30^{\circ}\text{C}$ – для доброякісних утворень, $-40\div-50^{\circ}\text{C}$ – для злоякісних пухлин (Pasquali et al., 2015; Baust et al., 2019).

Відомо, що рани після кріодеструкції загоюються довше, ніж рани іншої етіології, тому скорочення термінів їх загоювання є актуальним науковим завданням. (Abramovits W. et al., 2016). Одним з напрямків вирішення цього завдання може бути використання терапевтичного потенціалу біологічно активних субстанцій природного походження (Kovalov G.A. et al., 2017; Гальченко С.Є., 2017; Rogozhykh O. et al., 2018), та вуглецевих наноматеріалів (Dellinger et al., 2015; Castro et al., 2017; Kuznietsova et al., 2019, Goltsev A.M. et al., 2020).

Відомо, що екстракти кріоконсервованих фрагментів органів новонароджених поросят тканинспецифічно стимулюють репаративну регенерацію при експериментальних патологічних станах (Vespalova et al., 2015; Гальченко С.Є., 2017). Є дані, що фулерени C_{60} також проявляють протизапальні та антиоксидантні властивості на моделях патологічних процесів *in vivo* (Ryan et al., 2007; Dellinger et al., 2015; Kuznietsova et al., 2019). Відомості щодо токсичності та біологічної доступності фулеренів C_{60} наразі є суперечливими (Baker et al., 2008; Prylutska et al., 2012, Grohn et al., 2020, Kerna et al., 2020). 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 (Piotrovskiy et al., 2007). Є дослідження, де показана відсутність токсичності водних колоїдних розчинів немодифікованих фулеренів C_{60} (Nielsen et al., 2008; Prylutska et al., 2012; Castro E. et al. 2017).

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, грантами.

Робота виконана у відділі експериментальної кріомедицини ІПКіК НАН України в рамках науково-дослідних тем: «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 C₆₀.

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 C₆₀ 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 C₆₀.

4. Дослідити динаміку процесів проліферації та апоптозу в тканинах після кріодеструкції шкіри і введення екстракту кріоконсервованих фрагментів шкіри поросят та водного колоїдного розчину фулерену C₆₀.

5. Дослідити біохімічні показники сироватки крові при введенні екстракту кріоконсервованих фрагментів шкіри поросят та водного колоїдного розчину фулерену C₆₀ 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 C₆₀.

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 C₆₀ 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 C₆₀ 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 С₆₀, що проявляється формуванням придатків шкіри і більшою збалансованістю процесів апоптозу та проліферації.

Вперше встановлено, що застосування ЕКФШП і ВКРФ С₆₀ у тварин після кріодеструкції шкіри знижувало в сироватці крові рівень маркерів деструктивних та запальних процесів.

Вперше встановлено, що інтраперитоніальне введення ВКРФ С₆₀ в дозі 1мг/кг з концентрацією 34,7 мкмоль/л викликало зворотній лейкоцитоз з підвищенням вмісту сегментоядерних нейтрофілів та зростання активності аспартатамінотрансферази (АСТ) і аланінамінотрансферази (АЛТ) в сироватці крові щурів.

Вперше встановлено, що застосування розчину ВКРФ С₆₀ 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 С₆₀ 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 С₆₀ 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. Прилуцького Ю.І., д.мед.н., доц. М.С. Мірошніченка, к.б.н., с.н.с., І.В. Белочкіної.

Апробація результатів дисертації. Матеріали роботи було представлено на: 1 Central European Conference on Regenerative Medicine «CECRM 2015» (Bydgoszcz, Poland, 2015); 39 щорічній науковій конференції молодих вчених «Холод в биологии и медицине 2015» (Харків, 2015); The 52 Annual Meeting of the Society for Cryobiology «CRYO 2015» (Ostrava, Czech Republic, 2015); Ukrainian-German

Symposium on Physics and Chemistry of Nanostructures and on Nanobiotechnology (Київ, 2015); 40 щорічній науковій конференції молодих вчених «Холод в біології и медицине 2016» (Харків, 2016); 4 International research and practice conference «Nanotechnology and nanomaterials NANO-2016» (Львів, 2016); 42 щорічній науковій конференції молодих вчених «Холод в біології и медицине 2018» (Харків, 2018); XVI Міжнародній науковій конференції студентів, молодих вчених та спеціалістів «Актуальні питання сучасної медицини» (Харків, 2019); 43 щорічній науковій конференції молодих вчених «Холод в біології и медицине 2019» (Харків, 2019); XVII Міжнародній науковій конференції студентів молодих вчених та фахівців «Актуальні питання сучасної медицини» (Харків, 2020); The 1 International scientific and practical conference «Modern science: problems and innovations» (Stockholm, Sweden, 2020); The 57 Annual Meeting of the Society for Cryobiology «CRYO 2020» (Chicago, USA, 2020); The 56 Meeting of the Society for low temperature biology 2020 «SLTB-2020» (Louvain, Belgium, 2020).

Публікація матеріалів. Основні положення дисертації викладені в 19 роботах: 5 статтях, опублікованих в фахових наукових виданнях, 3 з яких входять до наукометричної бази даних Scopus; 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.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Огляд літератури. У розділі представлено аналіз експериментальних і теоретичних даних, які стосуються уявлень про застосування низьких температур в медицині, а саме кріохірургії шкіри. Наведено інформацію про сучасний стан проблеми лікування ран, а також досвід застосування регуляторних властивостей як речовин біологічного походження, так і вуглецевих наноструктур, таких як фулерени C₆₀. На підставі результатів аналізу літератури доведено актуальність досліджень щодо удосконалення методичних підходів до стимуляції процесу регенерації тканин після кріодеструкції шкіри.

Матеріали та методи дослідження. Дослідження проведено на базі Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (м. Харків), відповідно до принципів роботи на тваринах, схвалених Комітетом з біоетики ІПКіК НАН України (протокол № 5 від 08.12.2020р.). Усі операції виконували під анестезією препаратом «Telazol» (США) в дозі 50 мг/кг внутрішньом'язово.

Використовували готові ЕКФШП (виготовлений за методикою Гальченко С.Є. та ін. 2004) та ВКРФ C₆₀ (отриманий за методикою Ritter U. et al., 2014). В якості додаткових розчинників для ВКРФ C₆₀ використовували фізіологічний розчин та воду для ін'єкцій (Артеріум, Україна). Спектри поглинання ВКРФ C₆₀ досліджували на спектрофотометрі «Lambda 35» (США).

Робота складалась з трьох блоків досліджень.

Перший блок «Розробка експериментальної моделі процесів деструкції та репарації після кріоабляції шкіри *in vivo*». Було сформовано дві групи по 10 безшерстих щурів: експериментальну – з кріодеструкцією шкіри на латеральній поверхні стегна, та інтактну – без впливу. Низькотемпературний вплив на шкіру (120 с.) здійснювали кріоінструментом – акумулятором холоду (Ковальов Г.О., Гальченко С.Є., 2018). Температуру визначали в точці контакту робочої поверхні аплікатора зі шкірою. Морфологічну картину в зоні кріодеструкції і біохімічні параметри сироватки крові: рівень дієнових кон'югатів (ДК), ТБК-активних продуктів, активність супероксиддисмутази (СОД), каталази (КАТ), концентрацію церулоплазміну (ЦП), С-реактивного білка (СРБ) оцінювали на 7-му добу експерименту.

Другий блок «Вивчення біологічних ефектів введення в черевну порожнину ВКРФ С₆₀ різних концентрацій за впливом на гематологічні і біохімічні показники крові щурів». Щурів розподілили на 4 групи: інтактну (n=7); контрольну – з введенням води для ін'єкцій (n=7); дві експериментальні (n=14 у кожній) – з введенням ВКРФ С₆₀ в дозі 1 мг/кг маси в концентраціях 34,7 і 173 мкмоль/л відповідно. Всі розчини вводили в черевну порожнину, одноразово. На 1 і 5 добу експерименту вивчали гематологічні (абсолютний вміст лейкоцитів та еритроцитів, концентрацію гемоглобіну, гематокрит, абсолютний вміст тромбоцитів, середній об'єм еритроцитів, середній вміст гемоглобіну та середню концентрацію гемоглобіну в еритроциті, стандартне відхилення та коефіцієнт варіації відносної ширини розподілу еритроцитів за об'ємом і лейкоцитарну формулу) та біохімічні (загальний білок, креатинін, сечовину, активність АСТ, АЛТ і лужної фосфатази) показники.

Третій блок «Дослідження впливу ЕКФШП та ВКРФ С₆₀ на процеси деструкції і репарації після кріодеструкції шкіри». Було сформовано чотири групи: інтактну (n=10); контрольну (n=30), де вводили фізіологічний розчин; групу ЕКФШП (n=30) з введенням ЕКФШП (доза пептидів 0,5 мг/кг маси тіла) один раз на добу, протягом всього експерименту і групу ВКРФ С₆₀ (n=30) з введенням ВКРФ С₆₀ в разовій дозі 0,1 мг/кг маси тіла, протягом 5 днів, починаючи з дня кріодеструкції. Всі розчини вводили в черевну порожнину.

На 7, 14, 21 добу спостереження проводили макро- і мікроскопічне дослідження ран, визначення в сироватці крові рівень ДК, ТБК-активних продуктів, активності СОД, КАТ та концентрації ЦП, СРБ, молекул середньої маси, нітратів та нітритів. Зразки крові отримували із черевної аорти у наркотизованих тварин і виводили їх з експерименту шляхом дислокації шийних хребців. Гістологічні препарати, забарвлювали гематоксиліном і еозином, пікрофуксином по ван Гізону, по Маллорі. Для імуногістохімічного дослідження використовували моноклональні антитіла до p53 (клон SP5) і Ki-67 (клон SP6) «Thermo Fisher Scientific» (США).

Біохімічні дослідження проводили на біохімічному аналізаторі «Rayto RT-9200» (КНР) та імуноферментному аналізаторі «Labline-90» (Австрія). Використовували набори: «Bio Systems» (Іспанія), «Реагент» (Україна), «Вектор БЕСТ» (РФ). Гематологічні дослідження виконували на гематологічному аналізаторі «Mindray BC-3600» (КНР).

Статистичну обробку результатів проводили використовуючи критерій Краскела-Уолліса за допомогою пакета програм STATISTICA 6.0 (США).

Результати власних досліджень та їх обговорення

Експериментальна модель процесів деструкції і репарації тканин після кріоабляції шкіри у безшерстих щурів. Параметри охолодження в процесі кріодеструкції шкіри 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 $-59,1 \pm 6,5^{\circ}\text{C}$.

Місцеві зміни в ділянці кріодеструкції виражалися розвитком великого, як по глибині, так і по протяжності ранового дефекту, з наявністю зони первинного некрозу, демаркаційного лейкоцитарного валу, зони вторинного некрозу і тонкого шару грануляційної тканини на 7 добу експерименту. В той же час на системному рівні було виявлено розвиток окисного стресу, що проявлявся підвищенням вмісту первинних і вторинних продуктів ПОЛ та зниженням активності СОД і КАТ в сироватці крові піддослідних тварин. Крім того, в сироватці крові було визначено підвищення вмісту церулоплазміну і С-реактивного білка в 2,7 та 2,8 рази відповідно.

Представлена експериментальна модель процесів деструкції і репарації тканин після кріоабляції 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.

Дослідження біологічних ефектів введення в черевну порожнину фулеренів C_{60} у складі водного колоїдного розчину за впливом на гематологічні та біохімічні показники крові щурів. Були досліджені спектральні характеристики ВКРФ C_{60} з двома найбільш часто вживаними в медичній практиці розчинниками - водою для ін'єкцій і фізіологічним розчином. На спектрах поглинання ВКРФ C_{60} , розведеного водою для ін'єкцій, максимумами смуг поглинання реєстрували при 208, 265 і 347 нм, що узгоджується з відомими даними про спектри поглинання немодифікованих фулеренів C_{60} (Ritter U. et al., 2014). При застосуванні фізіологічного розчину ширина смуг поглинання збільшувалася, їх інтенсивність знижувалася, а максимумами зміщувалися в більш довгохвильову область на 16 нм. Тому в наступних експериментах ВКРФ C_{60} розводили водою для ін'єкцій.

Виявлено, що введення ВКРФ C_{60} в разовій дозі 1 мг/кг маси тіла тварини при концентрації 34,7 мкмоль/л, яка не перевищує порога агрегації колоїдних частинок фулерену C_{60} в ізотонічних розчинах, супроводжується на 1 добу зростанням активності АСТ і АЛТ в сироватці крові в 1,9 та 2 рази відповідно, помірним анізоцитозом - стандартне відхилення відносної ширини розподілу еритроцитів за об'ємом збільшується в 1,2 рази, абсолютним лейкоцитозом – кількість лейкоцитів підвищується в 1,4 рази, за рахунок збільшення вмісту сегментоядерних нейтрофілів (в 1,6 рази). На 5 добу спостереження встановлено помірний анізоцитоз у вигляді збільшення стандартного відхилення відносної ширини розподілу еритроцитів за

об'ємом в 1,3 рази та середнього об'єму еритроцитів в 1,1 рази, значущих змін біохімічних показників не виявлено.

Введення ВКРФ С₆₀ в концентрації 173 мкмоль/л супроводжується на 1 добу спостереження помірним анізоцитозом за рахунок збільшення стандартного відхилення відносної ширини розподілу еритроцитів за об'ємом (в 1,1 рази). Значущих змін біохімічних показників, як і при введенні фулеренів в концентрації 34,7 мкмоль/л, не встановлено. На 5 добу виявлено збільшення стандартного відхилення відносної ширини розподілу та коефіцієнту варіації відносної ширини розподілу еритроцитів за об'ємом в 1,2 рази, значущих змін біохімічних показників не було.

Різні біологічні ефекти після введення різних концентрацій ВКРФ С₆₀ 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 С₆₀ в концентрації 173 мкмоль/л.

Загоєння ран на фоні введення ЕКФШП і ВКРФ С₆₀. При макроскопічному дослідженні показано, що введення ЕКФШП та ВКРФ С₆₀ після кріодеструкції шкіри прискорювало загоєння ран у безшерстих щурів, у порівнянні з контролем (табл. 1).

Таблиця 1

Площа ран (мм², n=10)

Група	Термін спостереження, доба		
	7	14	21
Кріодеструкція + 0,9% NaCl	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 ¹
Кріодеструкція + ВКРФ С ₆₀	146,2±22,1	33,1±4,8 ^{1,2}	21,4±2,7 ¹

Примітка: тут і далі відмінності вірогідні (p<0,05): 1 – в порівнянні з контролем (кріодеструкція + 0,9% NaCl). 2 – з групою «кріодеструкція + ЕКФШП».

За результатами гістологічного дослідження можна стверджувати, що загоєння ран в контрольній групі проходило повільніше, ніж в групах, де після кріодеструкції вводили ЕКФШП і ВКРФ С₆₀. ВКРФ С₆₀ показали більш виражений стимулюючий вплив на репаративні процеси. Проте, в групі з ЕКФШП на 21 добу спостереження було відмічено формування придатків шкіри, що свідчить про органотипову регенерацію тканин.

Після введенням ВКРФ С₆₀ товщина епітеліального шару в крайових відділах ран була достовірно вище, ніж після застосування ЕКФШП на 7 і 14 добу спостереження (табл. 2). Проте, найбільша кількість і вираженість акантотичних розростань епідермісу спостерігалася в групі з введенням ВКРФ С₆₀. Крім того, на відміну від групи ЕКФШП, було зафіксовано помірно виражені диспластичні зміни.

Таблиця 2

Товщина епітеліального пласта шкіри ($\times 10^{-6}$ м, n=10)

Група	Термін спостереження, доба		
	7	14	21
Кріодеструкція + 0,9% NaCl	26,8 \pm 5,7	32,9 \pm 6,2	39,6 \pm 5,9
Кріодеструкція + ЕКФШП	56,1 \pm 11,1 ¹	65,4 \pm 9,3 ¹	85,4 \pm 12,0 ¹
Кріодеструкція + ВКРФ С ₆₀	69,9 \pm 11,6 ^{1,2}	84,3 \pm 13,3 ^{1,2}	98,1 \pm 10,7 ¹

При аналізі товщини шарів ранового дефекту більш виражений стимулюючий вплив ВКРФ С₆₀ на репаративні процеси 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 (табл. 3).

Таблиця 3

Товщина шарів ранового дефекту ($\times 10^{-6}$ м, n=10)

Група	Показник			
	Зона первинного некрозу	Демаркаційний лейкоцитарний вал	Зона вторинного некрозу	Шар грануляційної тканини
	7 доба спостереження			
Кріодеструкція + 0,9% NaCl	1975,9 \pm 459,2	329,5 \pm 162,6	482,7 \pm 92,9	148,3 \pm 100,0
Кріодеструкція + ЕКФШП	1617,2 \pm 231,0 ¹	331,4 \pm 82,7	397,8 \pm 68,9 ¹	275,5 \pm 40,4 ¹
Кріодеструкція + ВКРФ С ₆₀	1497,0 \pm 257,6 ¹	476,6 \pm 106,6 ²	341,3 \pm 55,3 ^{1,2}	335,0 \pm 35,4 ^{1,2}
14 доба спостереження				
Кріодеструкція + 0,9% NaCl	1531,0 \pm 306,1	249,8 \pm 74,7	393,3 \pm 45,0	203,8 \pm 61,6
Кріодеструкція + ЕКФШП	1331,0 \pm 148,9 ¹	277,8 \pm 37,1	292,6 \pm 16,1 ¹	369,0 \pm 19,1 ¹
Кріодеструкція + ВКРФ С ₆₀	1202,9 \pm 192,9 ¹	342,4 \pm 85,9 ^{1,2}	260,1 \pm 42,3 ¹	441,9 \pm 49,2 ^{1,2}
21 доба спостереження				
Кріодеструкція + 0,9% NaCl	579,9 \pm 93,5	94,6 \pm 24,3	203,3 \pm 18,0	541,8 \pm 131,4
Кріодеструкція + ЕКФШП	487,4 \pm 16,6	162,8 \pm 15,5 ¹	171,8 \pm 10,6 ¹	668,0 \pm 18,9
Кріодеструкція + ВКРФ С ₆₀	431,9 \pm 40,7 ¹	207,1 \pm 67,4 ¹	160,6 \pm 20,9 ¹	776,7 \pm 67,1 ^{1,2}

Крім того, в групі ВКРФ С₆₀ було відзначено більший вміст судин, макрофагів, лімфоцитів і клітин фібробластичного диферону в грануляційній тканині в усі

терміни спостереження, що приводило до прискорення темпів загоєння ранового дефекту.

Одночасну наявність ознак дисплазії і підвищеної проліферативної активності клітин епітелію можна розглядати як потенційну передумову розвитку передракових захворювань шкіри. Регенерація тканин після введення тваринам з кріодеструкцією шкіри ЕКФШП є більш органотиповою, отже є більш «якісною».

За даними дослідження з моноклональними антитілами показано, що після введення ЕКФШП, на всі строки спостереження активізуються проліферація та апоптоз клітин в оточуючих рану тканинах (табл. 4). Зафіксовано підвищення значень абсолютної кількості Ki-67- позитивних клітин: в епідермісі – в 1,5; 1,4 і 1,4 рази; в дермі, гіподермі, м'язовій тканині – в 1,4; 1,5 і 1,4 рази; в грануляційній і сполучній тканинах – в 1,4; 1,4 і 1,3 рази на 7; 14 і 21 добу спостереження, відповідно. Абсолютна кількість p53-позитивних клітин була вище значень контролю: в епітеліальному шарі – в 2,2; 1,6 і 1,5 рази; в дермі, гіподермі і м'язовій тканині – 1,9; 1,5 і 1,4 рази; в грануляційній і сполучній тканинах – в 1,6; 1,4 і 1,4 рази; на 7, 14 і 21 добу експерименту, відповідно.

Таблиця 4

Абсолютна кількість p53 та Ki-67 - позитивних клітин в епітелії (n=10)

Група	Клітини	Термін спостереження, доба		
		7	14	21
Кріодеструкція + 0,9% NaCl	p53 позитивні	3,4±0,5	6,5±1,1	8,0±1,2
	Ki-67 позитивні	11,9±1,7	16,0±2,4	20,4±3,4
Кріодеструкція + ЕКФШП	p53 позитивні	7,5±1,3 ^{1,2}	10,6±1,7 ^{1,2}	11,9±1,9 ^{1,2}
	Ki-67 позитивні	17,2±2,6 ^{1,2}	23,0±3,6 ¹	27,9±4,2 ¹
Кріодеструкція + ВКРФ С ₆₀	p53 позитивні	4,7±0,8	5,7±0,9	3,9±0,7 ¹
	Ki-67 позитивні	26,0±4,0 ¹	28,7±4,8 ¹	33,9±6,0 ¹

При введенні ВКРФ С₆₀ підвищувалась абсолютна кількість Ki-67 позитивних клітин у всіх шарах ранового дефекту та на всі строки спостереження, в епітелії – в 2,2; 1,8 і 1,7 рази; в дермі, гіподермі, м'язовій тканині – в 2,1; 2,1 і 2 рази; в грануляційній і сполучній тканинах – в 2; 1,6 і 1,5 рази на 7, 14 і 21 добу спостереження, відповідно. При цьому цей показник на 7 добу був вище, ніж в групі з введенням ЕКФШП в епітелії в 1,5 рази, в шарі грануляційної тканини – в 1,4 рази. В дермі, гіподермі, м'язовій тканині абсолютна кількість Ki-67-позитивних клітин була вище в 1,5; 1,4 і 1,4 рази, порівняно з групою, якій вводили ЕКФШП, на 7, 14 і 21 добу спостереження, відповідно.

Застосування ВКРФ С₆₀ на 21 добу експерименту знижувало в 2 рази абсолютну кількість p53-позитивних клітин в епітеліальному шарі в порівнянні з контролем, водночас, цей показник знижувався в 3 рази в порівнянні з групою з введенням ЕКФШП. В дермі, гіподермі і м'язовій тканині цей показник зростав в 1,5 рази, в порівнянні з контрольною групою лише на 7 добу спостереження. Експресія маркеру p53 в грануляційній або сполучній тканині тварин, що отримували ВКРФ С₆₀, зростала на 7 добу експерименту в 1,3 рази в порівнянні з контролем, та на 21 добу була в 1,2 рази нижче за показник в групі з введенням ЕКФШП.

Виявлений дисбаланс процесів проліферації і апоптозу після введення ВКРФ С₆₀ несе ризик утворення келоїдних рубців а також, враховуючи диспластичні зміни в епітелії – виникнення пухлин епітеліального походження.

Біохімічні показники крові щурів після кріодеструкції шкіри та введенням ЕКФШП і ВКРФ С₆₀. Кріодеструкція шкіри супроводжувалася розвитком окисного стресу: підвищенням вмісту первинних і вторинних продуктів ПОЛ (табл. 5) на тлі пригнічення ферментативної ланки системи антиоксидантного захисту в сироватці крові.

Таблиця 5

Концентрація ТБК-активних продуктів в сироватці крові щурів(нмоль/л, n=10)

Група	Термін спостереження, доба		
	7	14	21
Інтакт	5,13±0,16		
Кріодеструкція + 0,9% NaCl	8,76±0,87 ¹	7,82±0,72 ¹	7,10±0,73 ¹
Кріодеструкція + ЕКФШП	8,01±0,89 ¹	7,38±0,81 ¹	5,50±0,60 ²
Кріодеструкція + ВКРФ С ₆₀	7,94±0,83 ¹	5,76±0,54 ²	5,24±0,61 ²

При цьому, на всі строки експерименту, мало місце підвищення рівня таких маркерів запалення та деструкції тканин, як ЦП, СРБ, молекули середньої маси, нітрати та нітроти.

Застосування ЕКФШП і ВКРФ С₆₀ сприяло відновленню балансу про- і антиоксидантної систем крові тварин з кріодеструкцією шкіри. Встановлено нормалізацію вмісту ДК і ТБК-активних продуктів після введення ВКРФ С₆₀ починаючи з 14 доби спостереження та на 21 добу після застосування ЕКФШП; Спостерігалось достовірне збільшення активності СОД (табл. 6) і КАТ починаючи з 14 доби експерименту в обох групах.

Таблиця 6

Активність СОД в сироватці крові щурів (у.о./мл, n=10)

Група	Термін спостереження, доба		
	7	14	21
Інтактні тварини	4,94±0,43		
Кріодеструкція + 0,9% NaCl	2,11±0,26 ¹	2,31±0,33 ¹	2,86±0,30 ¹
Кріодеструкція + ЕКФШП	2,58±0,31 ¹	3,38±0,42 ^{1,2}	4,27±0,46 ²
Кріодеструкція + ВКРФ С ₆₀	2,58±0,34 ¹	3,66±0,42 ^{1,2}	4,85±0,59 ²

При цьому, на 21 добу середні значення активності СОД та КАТ повертались до норми. Оскільки фулерени С₆₀ є потужними утилізаторами вільних радикалів, зниження рівня первинних та вторинних продуктів ПОЛ при введенні ВКРФ С₆₀ ймовірно пояснюється їх здатністю знижувати рівень активних форм кисню в сироватці крові та тканинах.

Введення експериментальним тваринам ЕКФШП і ВКРФ С₆₀ достовірно знижувало рівень маркерів деструктивно-запальних процесів в сироватці крові. Так, відзначено зниження рівня СРБ відносно контролю вже з 7 доби експерименту, а також його нормалізацію на 21 добу експерименту в обох групах (табл. 7).

Концентрація СРБ в сироватці крові щурів (мг/мл, n=10)

Група	Термін спостереження, доба		
	7	14	21
Інтактні тварини	1,21± 0,11		
Кріодеструкція + 0,9% NaCl	3,62± 0,37 ¹	2,98± 0,30 ¹	2,62± 0,26 ¹
Кріодеструкція + ЕКФШП	2,69± 0,23 ^{1,2}	1,85± 0,16 ^{1,2}	1,31± 0,12 ²
Кріодеструкція + ВКРФ С ₆₀	2,74± 0,24 ^{1,2}	1,97± 0,19 ^{1,2}	1,39± 0,13 ²

Застосування ЕКФШП або ВКРФ С₆₀ сприяло зниженню вмісту ЦП починаючи з 14 доби спостереження, на 21 добу його вміст повертався до значень норми. Зниження вмісту молекул середньої маси в сироватці крові відбувалося на 14 та 21 добу експерименту після введення ВКРФ С₆₀, тоді як значення в групі контролю та після введення ЕКФШП залишалися вище норми на всі строки спостереження. Також, при введенні як ЕКФШП, так і ВКРФ С₆₀ після кріодеструкції шкіри відмічали зниження концентрації нітратів та нітритів з 14 доби експерименту. На 21 добу спостереження вміст нітратів та нітритів в групах з введенням ЕКФШП або ВКРФ С₆₀ повертався до норми.

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 екстракта кріоконсервованих фрагментів шкіри поросят та, в порівняльному аспекті, водного колоїдного розчину фулерену С₆₀. 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 1 мг/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 зворотнє підвищення вмісту лейкоцитів в 1,4 рази з підвищенням вмісту сегментоядерних нейтрофілів та зростання активності аспаратамінотрансферази 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 супроводжувалося 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. Введення екстракту кріоконсервованих фрагментів шкіри поросят і водного колоїдного розчину фулерену C_{60} 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.

ПЕРЕЛІК НАУКОВИХ ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у фахових виданнях України

1. **Власов О.О.**, Ковальов Г.О., Белочкіна І.В., Єфімова І.А., Сандомирський Б.П. Вплив водного колоїдного розчину фулерену С₆₀ на гематологічні і біохімічні показники крові щурів. Фізіологічний журнал. 2018. Т. 64. № 3: С. 70–78. *(Внесок здобувача: інтраперитоніальне введення розчинів фулерену щурам, отримання зразків крові, статистична обробка даних, аналіз та узагальнення отриманих результатів, підготовка матеріалів до друку).*
2. Kovalov G.O., **Vlasov O.O.**, Myroshnychenko M.S., Sandomirskiy B.P. Experimental model of skin cryodestruction. Problems of Cryobiology and Cryomedicine. 2019. Vol. 29. № 1. P. 88–101. *(Видання включено до бази Scopus; Внесок здобувача: моделювання кріоабляції шкіри у щурів, проведення контактної термометрії, взяття зразків крові, отримання тканин для морфологічного дослідження, отримання та аналіз мікрофотографій, статистична обробка даних, аналіз та узагальнення результатів, підготовка матеріалів до друку).*
3. **Власов О.О.**, Ковальов Г.О., Чиж М.О., Гальченко С.Є. 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 С₆₀. Вісник проблем біології і медицини. 2020. Вип. 1. № 155. С. 102–106. *(Внесок здобувача: моделювання кріоабляції шкіри у щурів, інтраперитоніальне введення ВКРФ С₆₀ і ЕКФШП щурам, взяття зразків крові, статистична обробка даних, аналіз та узагальнення результатів, підготовка матеріалів до друку).*

Статті в наукових періодичних виданнях інших країн

4. **Vlasov O.O.**, Kovalov G.O., Myroshnychenko M.S. Morphological features of a cold skin wound under the influence of an extract of cryopreserved skin fragments of piglets (experimental study). Wiadomości Lekarskie. 2020. Vol. 73. № 2. P. 306–311. *(Видання включено до бази Scopus; Внесок здобувача: моделювання кріоабляції шкіри у щурів, інтраперитоніальне введення ЕКФШП, отримання тканин для морфологічного дослідження, отримання*

та аналіз мікрофотографій, статистична обробка даних, аналіз та узагальнення результатів, підготовка матеріалів до друку).

5. **Vlasov O.O.**, Kovalov G.O., Myroshnychenko M.S. Morphological assessment of wound healing after cryodestruction of skin using an aqueous colloidal solution of C₆₀ fullerenes. *Wiadomości Lekarskie*. 2020. Vol. 73. № 4. P. 642–647. *(Видання включено до бази Scopus; Внесок здобувача: моделювання кріоабляції шкіри у щурів, інтраперитоніальне введення ВКРФ C₆₀, отримання тканин для морфологічного дослідження, отримання та аналіз мікрофотографій, статистична обробка даних, аналіз та узагальнення результатів, підготовка матеріалів до друку).*

Тези наукових доповідей конференцій

6. **Vlasov O.O.**, Panov S.I., Kovalov G.A., Belochkina I.V., Nipot E.E., Shpakova N.M., Iefimova I.A., Sandomirsky B.P. Effect of C₆₀ fullerene aqueous colloid solution on biochemical parameters of liver and visco-elastic membrane properties of rat's erythrocytes. I Central European Conference on Regenerative Medicine (Bydgoszcz. 14-15 March 2015). Bydgoszcz, Poland, 2015. P. 72–74.
7. **Власов О.О.**, Панов С.І., Ковальов Г.О., Белочкіна І.В., Ніпот О.Є., Шпакова Н.М., Єфімова І.О., Сандомирський Б.П. Вплив водного колоїдного розчину фулерену C₆₀ на стан мембран та біохімічні показники *in vivo*. Проблеми кріобіології і кріомедицини. 2015. Т. 25. № 2. С. 195.
8. **Vlasov O.O.**, Kovalov G.A., Belochkina I.V., Panov S.I., Iefimova I.A., Sandomirsky B.P. Effect of fullerene C₆₀ on biochemical parameters of liver and kidneys. *Cryobiology*. 2015. Vol. 71. № 3: P. 558.
9. **Vlasov O.O.**, Panov S.I., Nipot O.Ye., Belochkina I.V., Kovalov G.O., Shpakova N.M., Synchykova O.P., Sandomirsky B.P. Effect of C₆₀ fullerene aqueous colloid solution on visco-elastic membrane properties of erythrocytes. V Ukrainian-German Symposium on Physics and Chemistry of Nanostructures and on Nanobiotechnology (Kyiv. 21-25 September 2015). Kyiv, Ukraine, 2015. P. 114.
10. **Vlasov O.O.**, Belochkina I.V., Kovalev G.A., Panov S.I., Prylutskyu Yu.I., Sandomirsky B.P. Effect of aqueous colloid solution of C₆₀ fullerene on hematological parameters in rats. International research and practice conference: nanotechnology and nanomaterials «NANO-2016» (Lviv. 24–27 August 2016). Lviv, Ukraine, 2016. P. 510.
11. **Власов О.О.**, Ковальов Г.О., Белочкіна І.В., Сандомирський Б.П.. Влияние экстрактов криоконсервированных фрагментов кожи поросят на состояние про- и антиоксидантной системы при криодеструкции кожи. Проблеми кріобіології і кріомедицини. 2016. Т. 26. № 2. С. 170.
12. **Власов О.О.**, Ковальов Г.О., Мирошніченко М.С. Влияние водного коллоидного раствора фуллерена C₆₀ на эпителий после криодеструкции кожи. Проблеми кріобіології і кріомедицини. 2018; Т. 28. № 2. С. 170.
13. **Власов О.О.** Експериментальна модель низькотемпературного впливу на шкіру. Матеріали XVI Міжнародної наукової конференції студентів, молодих

- вчених та спеціалістів «Актуальні питання сучасної медицини» (Харків. 28-29 березня 2019). Харків, Україна, 2019. С. 57.
14. **Власов О.О.**, Ковальов Г.О. Інтенсивність вільно-радикальних процесів при локальній холодовій травмі після введення екстракту кріоконсервованих фрагментів шкіри поросят або водного колоїдного розчину фулерену C₆₀. Проблеми кріобіології і кріомедицини. 2019; Т. 29. № 2. С. 167.
 15. **Власов О.О.** Показники крові щурів при введенні водного колоїдного розчину фулерену C₆₀ в різних концентраціях. Матеріали XVI Міжнародної наукової конференції студентів, молодих вчених та спеціалістів «Актуальні питання сучасної медицини» (Харків. 26-27 березня 2020). Харків, Україна, 2020. С. 61.
 16. **Vlasov O.O.**, Kovalov G.O., Halchenko S.Ye., Chyzh M.O. Effect of cryopreserved fragments of piglet's skin extract or aqueous colloidal solution of fullerene C₆₀ on wound healing after skin cryoablation. 1st International scientific and practical conference «Modern science: problems and innovations» (Stockholm. 5-7 April 2020). Stockholm, Sweden, 2020. P. 84–87.
 17. **Vlasov O.O.**, Kovalov G.O., Chyzh M.O., Galchenko S.Ye. Influence of cryopreserved piglets skin fragments or aqueous colloidal solution of C₆₀ fullerene on destruction and inflammation severity after skin cryodestruction The 57th Annual Meeting of the Society for Cryobiology «CRYO 2020» (Chicago. 21-23 July 2020). Chicago, USA, 2020. p.13–14.
 18. **Vlasov O.O.**, Kovalov G.O., Myroshnychenko M.S. Effect of extract of cryopreserved piglets skin fragments and aqueous colloidal solution of fullerene C₆₀ on epidermis morphology in cold skin wound. The 57th Annual Meeting of the Society for Cryobiology «CRYO 2020» (Chicago. 21-23 July 2020). Chicago, USA, 2020. P.59–60.
- Патенти України на корисну модель*
19. Спосіб лікування ран: пат. 111022 Україна: А61В 17/00, А61К 33/44. № u 2016 04860; заявл. 29.04.2016; опубл. 25.10.2016, Бюл. №20.

АНОТАЦІЯ

Власов О.О. Вплив екстракту кріоконсервованих фрагментів шкіри поросят і фулерену C₆₀ на альтеративні та репаративні процеси в шкірі після кріодеструкції (експериментальне дослідження). Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.01.35 «Кріомедицина». – Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків, 2020.

Дисертаційна робота присвячена оптимізації лікування ран після кріоабляції шкіри шляхом застосування екстракту кріоконсервованих фрагментів шкіри поросят (ЕКФШП) та, в порівняльному аспекті, водного колоїдного розчину немодифікованого фулерену C₆₀ (ВКРФ C₆₀).

Введення ЕКФШП та ВКРФ C₆₀ прискорює загоювання ран після кріодеструкції шкіри, що проявляється зменшенням проявів деструкції і запалення, та стимуляцією репаративних процесів на місцевому і системному рівнях.

Застосування ЕКФШП приводить до органотипової регенерації тканин. Введення ВКРФ С₆₀ викликає дисбаланс процесів проліферації і апоптозу в тканинах після кріодеструкції шкіри.

Ключові слова: кріодеструкція шкіри, рани, регенерація, екстракт кріоконсервованих фрагментів шкіри поросят, водний колоїдний розчин фуллерену С₆₀.

АННОТАЦІЯ

Власов А.А. Влияние экстракта криоконсервированных фрагментов кожи поросят и фуллерена С₆₀ на альтеративные и репаративные процессы в коже после кріодеструкции (экспериментальное исследование). – Квалификационная научная работа на правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.01.35 «Криомедицина». – Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, Харьков, 2021.

Диссертация посвящена оптимизации лечения ран после криоабляции кожи путем применения экстракта криоконсервированных фрагментов кожи поросят (ЕКФШП) и, в сравнительном аспекте, водного коллоидного раствора не модифицированного фуллерена С₆₀ (ВКРФ С₆₀).

Введение ЕКФШП и ВКРФ С₆₀ ускоряет заживление ран после кріодеструкции кожи, что проявляется уменьшением выраженности деструкции и воспаления, и стимуляцией репаративных процессов на местном и системном уровнях. Применение ЕКФШП приводит к органотипической регенерации тканей. Введение ВКРФ С₆₀ вызывает дисбаланс процессов апоптоза и пролиферации в тканях после кріодеструкции кожи.

Ключевые слова: кріодеструкция кожи, раны, регенерація, екстракт кріоконсервированных фрагментов кожи поросят, водный коллоидный раствор фуллерена С₆₀.

ANNOTATION

Vlasov O.O. Effect of extract of cryopreserved piglet's skin fragments and fullerene С₆₀ 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 Sciences in specialty of 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 by applying a combination of regulatory compounds of animal origin, being a part piglets' skin cryopreserved fragments' extract (PSCFE) and aqueous colloidal solution of unmodified fullerene С₆₀ (AQSUF С₆₀) in a comparative aspect.

An experimental model of tissue destruction and repair after skin cryoablation in hairless rats has been presented, which is characterized with local and systemic manifestations of destruction and inflammation as well as can be used to investigate the processes that occur after cryosurgical treatment of tumors. In cryotherapy there was a

sharp decrease in temperature at the point of contact of the applicator and skin down to -75.5 ± 7.9 °C with a gradual rise in temperature to -59.1 ± 6.5 °C.

It was found that the biological effects of introducing of an aqueous colloidal solution of fullerene C₆₀ at a dose of 1 mg / kg into the abdominal cavity depended on its concentration. A solution with a concentration of 173 μmol / l has less activity than the one with a concentration of 34.7 μmol / l, that was related to its lower bioavailability due to aggregation and precipitation of fullerene as a deposit at the injection site.

It was found that the introduction of PSCFE and AQSUF C₆₀ accelerated the wound healing after skin cryoablation, that was indicated by a reduction in the destruction and inflammation manifestations, and stimulation of reparative processes at the local and systemic levels. The introduction of PSCFE and AQSUF C₆₀ stimulated proliferative activity in epidermis, that led to an increase in the thickness of its layer in marginal areas of the wound; contributed to faster cleansing of the wound from necrotized tissues, evidenced by a decrease in the thickness of the area of primary and secondary necrosis; enhanced the thickness of the demarcation leukocyte shaft; accelerated the filling of the wound defect with granulation tissue; reduced the severity of hemodynamic abnormalities and infiltration of cells into the adjacent wound defect of the dermis, hypodermis and muscle tissue.

It was demonstrated that the administration of PSCFE and AQSUF C₆₀ to rats after skin cryoablation contributed to a decrease in serum levels of markers of destructive and inflammatory processes, manifested by normalization of diene conjugates, TBA-active products, C-reactive protein and ceruloplasmin, as well as increased activity of superoxide dismutase and catalase.

The use of PSCFE (peptide dose of 0.5 mg / kg μg/ml) led to organotypic tissue regeneration after cryodestruction, and can be recommended for further studying the possibility of its application in clinical practice.

The introduction of AQSUF C₆₀ (fullerene dose of 0.5 mg / kg) caused an imbalance of proliferation and apoptosis in the tissues after skin cryoablation. Stimulation of cell proliferation and decrease in apoptotic activity in epithelium and fibroblastic cells were observed.

Keywords: skin cryodestruction, wounds, regeneration, piglets' skin cryopreserved fragments' extract, aqueous colloidal solution of unmodified fullerene C₆₀.

Відповідальний за випуск – д.б.н. Г.О. Бабійчук

Підписано до друку 02.03.2021
Формат 60 x 84 1/16. Папір офсетний. Гарнітура Times New Roman.
Друк ксерографічний. Ум. друк. арк. 0,9.
Наклад 100 прим. Зам.№
Надруковано з макету замовника у ФОП Бровін О.В.,
61022, м. Харків, вул. Трінклера 2, корп. 1, к.19.