



УДК 616.5-001.18:612.015.21:591.1:611.085.23

## БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ЭКСТРАКТОВ ЖИВОТНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ ПРИ ХОЛОДОВЫХ ТРАВМАХ КОЖИ И В КУЛЬТУРЕ ФИБРОБЛАСТОВ

**И.Г. Беспалова, Е.О. Богатырева,  
А.В. Шиндер, И.В. Белочкина,  
С.Е. Гальченко,  
Б.П. Сандомирский**

*Институт проблем криобиологии и  
криомедицины НАН Украины, Украина,  
61015, г. Харьков, ул. Переяславская, 23*

*E-mail: irabespalova@ukr.net*

Показано, что экстракты криоконсервированных фрагментов селезенки свиней, кожи поросят и подмора пчел ускоряют заживление холодовых ран кожи у крыс. Они проявляют выраженное иммуномодулирующее влияние: в более ранние сроки, по сравнению с контролем, происходит нормализация лейкоцитарной формулы крови, а, следовательно, уменьшается выраженность воспалительного процесса. Введение экстрактов животным с холодовыми ранами ускоряет регенерацию эпителия и образования в дерме производных кожи по сравнению с контрольными животными. При добавлении экстракта кожи или селезенки в среду культивирования фибробластов наблюдается увеличение их метаболической активности.

Ключевые слова: фибробласты, культура, экстракт, кожа, селезенка, подмор пчел.

### Введение

Хирургическое лечение новообразований кожи часто выполняется путем криодеструкции. Лечение гормоно- и химиотерапией приводит к развитию иммунодефицитных состояний, при которых заживление ран затруднено [1]. В такой ситуации желательно не только ускорить и нормализовать процесс их заживления, но и достичь максимального косметического эффекта [2]. Для решения этих задач все чаще обращается внимание на субстанции эндогенного или природного [3, 4], в том числе и животного происхождения [5, 6], которые могут быть использованы для стимуляции и нормализации процессов репаративной регенерации.

Одним из направлений, которые интенсивно развиваются, является изучение биологического действия препаратов клеточной терапии [7, 8]. Значительное внимание уделяется исследованию роли пептидов в регуляции физиологических функций организма, особенно физиологической и репаративной регенерации [9, 10]. Наряду с пептидами, для которых установлена аминокислотная последовательность, активно изучаются тканеспецифические комплексы пептидов из различных органов. Основное биологическое действие таких комплексов – модуляция физиологических функций, нормализация деятельности клеток, тканей, органов и всего организма. Кроме того, они влияют на нейроэндокринную систему, модулируют реакции сосудисто-тромбоцитарного гемостаза, свертывания крови, перекисного окисления липидов, содержание реактантов острой фазы, а также влияют на регенерацию тканей и другие процессы [11].

Известно, что экстракты криоконсервированных фрагментов органов свиней и поросят нормализуют процесс репаративной регенерации и иммунный статус организма [12]. А определенные клетки иммунной системы играют важную роль в регуляции пролиферации всех соматических клеток [13].

Цель работы – исследовать в сравнительном плане влияние экстрактов животного происхождения на процесс заживления холодовых ран в эксперименте.

### Материалы и методы

Эксперименты проведены в соответствии с «Общими этическими принципами экспериментов на животных», которые одобрены III Национальным конгрессом по биоэтике (2007 г., Киев) и согласованы с положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986), а методы, использованные в работе, одобрены Комиссией по биоэтике ИПКиК НАН Украины.

Экстракты получали из криоконсервированных фрагментов кожи поросят (ЭКП) и селезенки свиней (ЭСС) путем их инкубации в физиологическом растворе 60 мин. Полученный экстракт освобождали от термолабильных белков [14]. Экстракт пчелиного подмора (ЭПП) получали экстракцией пчелиного подмора в аппарате Соклета и очищали от липофильных компонентов.



Холодовую травму кожи моделировали на лабораторных крысах массой 190–210 г. Под поверхностным наркозом у крыс удаляли шерсть на бедре. Холодовую травму наносили охлажденным в жидком азоте медным аппликатором диаметром 10 мм, экспозиция составляла 60 с. Крысы с холодовой травмой были разделены на группы: контрольные (введение физиологического раствора) и опытные (введение ЭКП, ЭСС или ЭПП). Экстракты вводили крысам в брюшную полость по 1 мл один раз в сутки. Концентрация пептидов в ЭКП и ЭСС составляла 100 мкг/мл, а в ЭПП – 0.25 мг/мл сухого экстракта.

Площадь ран определяли планиметрическим методом, концентрацию эритроцитов и лейкоцитов как описано в [15], а гемоглобина – с помощью набора реагентов ДИАГЕМ Т (НПФ РЕНАМ, Россия).

Анализ лейкоцитарной формулы проводили на мазках, окрашенных азур II-эозином по Романовскому-Гимза, подсчитывая по 500 клеток в световом микроскопе (ЛОМО, об. Х90, ок. Х10). Кровь для исследований брали из хвостовой вены животных. Лейкоцитарный индекс интоксикации модифицированный (ЛИИМ) рассчитывали по методу [16].

Для электронно-микроскопического исследования кожи использовались ее фрагменты, которые сначала фиксировали в течение 2 ч в 2% растворе глutarового альдегида, отмывали фосфатным буфером и затем фиксировали в 1% растворе четырехоксида осмия. После обезвоживания спиртами возрастающей концентрации кусочки ткани пропитывали смесью эпон-аралдита. Ультратонкие срезы контрастировали насыщенным водным раствором уранилацетата и раствором цитрата свинца по Рейнольдсу [17]. Ультраструктуру клеток кожи исследовали с помощью электронного микроскопа ПЭМ-125К при ускоряющем напряжении 75 кВ, обеспеченного системой съема и анализа изображения САИ-01А (АО «SELMИ», г. Сумы на основе CCD камеры DX-2 и пакета программ фирмы «KAPPA», Германия).

Первичную культуру фибробластов кожи новорожденных крыс получали путем свободного выселения клеток из фрагментов кожи и последующим пересевом фибробластов. Полученные фибробласты инкубировали в питательной среде DMEM/F12 с добавлением эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) и антибиотиков. В опытные образцы вносили ЭКП или ЭСС в различных конечных концентрациях пептидов, а в контрольные – эквивалентный объем физиологического раствора. Метаболическую активность оценивали по интенсивности флуоресценции нетоксического редокс-индикатора Alamar Blue.

Результаты статистически обрабатывали непараметрическим методом MANOVA с помощью программы SPSS 17.0 для Windows.

### Результаты собственных исследований

На 3 сутки эксперимента статистически достоверных различий в площади ран контрольной и опытных групп не наблюдалось (табл. 1). Начиная с 7-го дня площадь ран у животных, которым вводили ЭСС или ЭКП, статистически достоверно меньше, чем у контрольных крыс. Таким образом, исследованные экстракты ускоряют заживление холодовых ран в эксперименте. Однако, механизм их действия, скорее всего, различный. Можно предположить, что тканеспецифические пептиды, входящие в состав ЭКП, нормализуют или стимулируют пролиферативную активность клеток кожи при травме.

Таблица 1

#### Площадь холодовых ран, см<sup>2</sup>, у крыс в зависимости от условий эксперимента

Срок наблюдения, сутки	Условия эксперимента			
	Контроль	Введение ЭСС	Введение ЭКП	Введение ЭПП
3	4.5±0.4	3.8±0.3	3.7±0.4	3.4±0.4
7	3.4±0.3	2.8±0.2*	2.3±0.2*	2.9±0.3
14	2.3±0.3	0.8±0.1*	0.6±0.1*	1.3±0.1*
21	1.5±0.1	0.5±0.1*	Заживление	0.5±0.1*

Примечание. \* – отличия статистически достоверны по сравнению с контролем,  $p < 0.05$ .

Развитие и течение воспаления, а также переход фазы воспаления в фазу регенерации в значительной степени зависит от состояния иммунной системы организма. Ускорение заживления ран при введении ЭСС может быть связано с нормализацией иммунного ответа на травму. Известно, что соответствующая популяция клеток иммунной системы принимает активное участие в регуляции пролиферации соматических клеток, а применение ЭСС нормализует состояние иммунной системы при воспалительных заболеваниях.



При введении нативным крысам экстрактов в течение 21 суток концентрация гемоглобина, эритроцитов и лейкоцитов в крови крыс статистически достоверно ( $p < 0.05$ ) не отличалась от нормы в течение всего срока наблюдения. Следовательно, введение здоровым животным экстрактов не влияет на состояние эритро- и лейкопоэза.

Эти показатели у животных с холодовой травмой и при введении экстрактов на фоне травмы на 3 сутки не отличались от нормы. На 7 сутки эксперимента у контрольных животных наблюдался лейкоцитоз и концентрация лейкоцитов составила 147% от нормы. У животных, которым вводили экстракты в этот и последующие сроки наблюдения статистически достоверного повышения концентрации лейкоцитов по сравнению с нормой не наблюдалось. У контрольных животных на 14 сутки этот показатель также нормализовался.

Исследование лейкоцитарной формулы имеет большое значение для определения выраженности процесса воспаления, оценки состояния организма и эффективности терапии. На 3 сутки после моделирования холодовых ран у крыс относительное количество нейтрофильных лейкоцитов было практически одинаковым при всех условиях эксперимента. Относительное количество лимфоцитов периферической крови уменьшилось с 77.8% в норме до 52.9% в контроле и 56.1, 50.3 и 54.2% – при введении ЭСС, ЭКП или ЭПП соответственно. Наблюдалось также уменьшение в крови эозинофилов и моноцитов. Через неделю после начала эксперимента у контрольных крыс относительное количество нейтрофилов увеличивалась до 50.7%. У животных, которым вводили экстракты, их количество было значительно меньше. Относительное количество лимфоцитов в контроле составило 41.3%, при введении ЭСС – 62.7%, при введении ЭКП или ЭПП – 60.0 и 65.1% соответственно. У животных контрольной группы также наблюдалось увеличение количества эозинофилов в 1.7 раза по сравнению с нормой. Такие изменения лейкоцитарной формулы свидетельствуют о том, что на 7 сутки при введении животным экстрактов наблюдается их положительное влияние, а именно – уменьшение воспаления в зоне травмы и выраженность некроза тканей по сравнению с контролем.

На 14 сутки эксперимента содержание нейтрофильных лейкоцитов составило в контрольной группе крыс 30.0% и превышало норму в 2.1 раза, а эозинофилов – 7.0%, что превышало норму в 1.8 раза (табл. 2). У животных, которым вводили экстракты, относительное количество эозинофилов, моноцитов и лимфоцитов практически соответствовало норме.

Таблица 2

**Лейкоцитарный профиль крови крыс с холодовыми травмами на 14 сутки эксперимента**

Условия эксперимента	Клетки, %					
	Нейтрофилы			Еозинофилы	Моноциты	Лимфоциты
	Юные	Палочко-ядерные	Сегментоядерные			
Норма	–	0.9±0.1	13.5±1.0	3.9±0.3	3.2±0.2	78.5±5.9
Контроль	–	1.6±0.2	28.4±2.1	7.0±0.4	2.9±0.2	60.1±4.7
Введение ЭСС	–	0.7±0.1	24.9±1.9	3.1±0.2	3.9±0.3	67.4±4.2
Введение ЭКП	–	1.1±0.1	27.7±2.2	4.4±0.3	2.9±0.2	63.9±3.9
Введения ЭПП	–	1.8±0.2	27.3±1.8	6.9±4.3	2.8±1.4	61.2±4.1

На 21-е сутки у животных, которым вводили экстракты, лейкоцитарная формула крови возвращалась к норме. В контрольных животных относительное содержание палочко- и сегментоядерных нейтрофилов оставалось выше нормы. Таким образом, в этой группе животных процесс воспаления не полностью завершился.

Эндогенная интоксикация, как правило, наступает при заболеваниях и осложнениях, связанных с усиленным распадом тканей, повышением процессов катаболизма, недостаточностью функции печени и почек. Поэтому в литературе все чаще появляются сообщения об использовании интегральных показателей эндогенной интоксикации, часть которых меняется уже на начальных стадиях заболевания. Это позволяет оценить в динамике состояние различных звеньев иммунной системы, не прибегая к специальным методам исследования.

Одним из показателей процессов тканевой деградации и уровня интоксикации является ЛИИМ, отражающий соотношение уровня клеток, количество которых увеличивается при воспалительных и гнойных процессах, к уровню клеток, количество которых при этих процессах может снижаться. Этот индекс на сегодня является самым распространенным индексом интоксикации в различных областях медицины. Рост данного показателя свидетельствует о повышении уровня эндогенной интоксикации и активации процессов распада.

На 3 сутки после нанесения холодовой травмы ЛИИМ превышал норму в 4.6–5.1 раза (табл. 3). При этом, различия в величине этого индекса между контрольной и опытными груп-



пами были незначительными. Наиболее выраженные различия ЛИИМ были на 7 сутки эксперимента. У крыс контрольной группы наблюдалось дальнейшее его увеличение с 0.66 до 1.02, у животных, которым вводили экстракты – уменьшение ЛИИМ по сравнению с 3 сутками. При введении животным с холодной травмой ЭСС индекс интоксикации составил 41%, а при введении ЭКП – 46% от значений в контроле. На 14 сутки этот индекс уменьшался во всех группах животных. На 21 сутки у животных, которым вводили ЭСС, этот показатель возвращался к норме. Исходя из приведенных данных, можно сделать вывод, что экстракты уменьшают выраженность деструктивных процессов в коже при холодной травме.

Таблица 3  
Величина ЛИИМ у крыс в зависимости от условий эксперимента и срока наблюдения

Условия эксперимента	Срок наблюдения, сутки			
	3	7	14	21
Норма	0.15			
Контроль	0.66	1.02	0.42	0.29
Введение ЭСС	0.58	0.42	0.34	0.15
Введение ЭКП	0.77	0.47	0.40	0.21
Введение ЭПП	0.79	0.55	0.48	0.30

При электронно-микроскопическом исследовании кожи контрольных животных на 14-е сутки отмечается разрыхление и фрагментация базальной мембраны эпидермиса, а также наличие митохондрий с сильно просветленным матриксом и модификацией крист в клетках базального слоя (рис. а). В сетчатом слое дермы у этих животных интенсивной васкуляризации не наблюдается.

При введении ЭСС ультраструктура эпидермиса, сосочкового и сетчатых слоев дермы в периферических частях зоны криповреждения практически соответствует норме (см. рис. б). Эпидермис представлен всеми типичными слоями: базальным, шиповатым, зернистым и роговым. Клетки базального слоя лежат непосредственно на базальной мембране, образуя длинные выросты в направлении сосочкового слоя дермы.

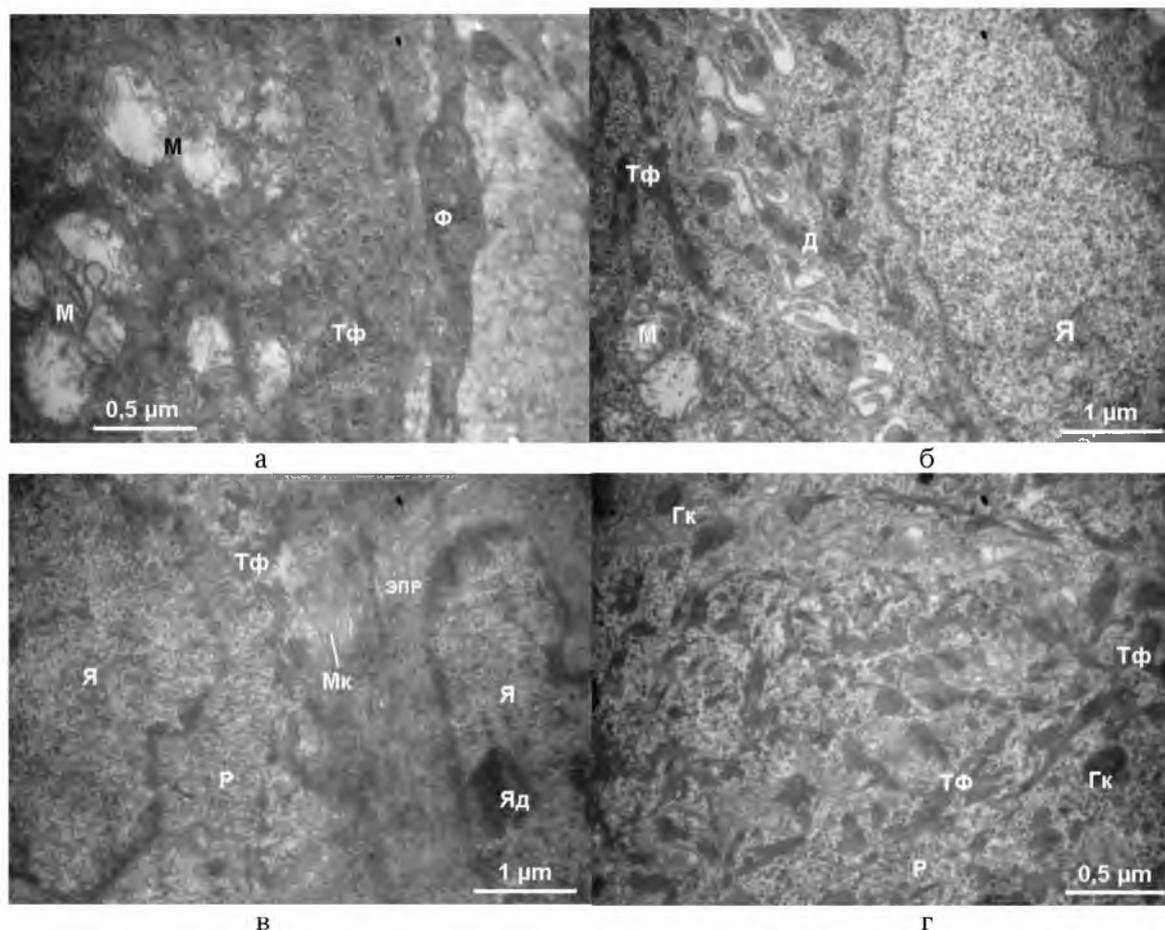


Рис. 1. Ультраструктура клеток на границе шиповатого и зернистого слоев эпидермиса на 14-е сутки эксперимента: а) контроль, б) введение крысам ЭСС; в) введение крысам ЭКП; г) введение крысам ЭПП. Обозначения: М – митохондрии, Тф – тонофибрилы, Ф – фибробласт, БМ – базальная мембрана, Я – ядро эпителиоцита, Мк – зона межклеточного контакта, Д – участок межклеточного контакта, десмосома, Гк – гранулы кератогиалина, Р – скопление свободных рибосом, Яд – ядрышко, ЭПР – эндоплазматический ретикулум



Базальная мембрана непрерывна, она образована аморфным веществом средней электронной плотности. Цитоплазма эпителиоцитов в перинуклеарной части содержит митохондрии с несколькими кристами и электронно-светлым матриксом, а также хорошо развитый эндоплазматический ретикулум и много свободных рибосом. Тонкие пучки тонофиламенты локализованы в периферических частях клеток. Базальные клетки связаны между собой и вышележащими слоями с помощью десмосом, расположенных на межклеточных мостиках.

У крыс, которым вводили ЭКП, шиповатый слой представлен 4–5 рядами крупных полигональных клеток, цитолемма которых образует длинные выросты - межклеточные мостики, которые формируют многочисленные десмосомы (см. рис. в). Ядра этих клеток крупные, округлые, кариоплазма равномерно заполнена в основном эухроматином.

Ядра периферической локализации также довольно крупные, что свидетельствует об активном биосинтезе белка, что характерно для эпидермальных клеток. Цитоплазма богата органоидами: цистернами эндоплазматического ретикулума и свободными рибосомами. Митохондрии округлые, их размеры невелики, они находятся в активном состоянии, о чем косвенно свидетельствует просветление матрикса. В цитоплазме шиповатых клеток пучки тонофиламенты образуют толстые фибриллы, которые прикрепляются к цитолемме, часто в местах образования десмосом.

При введении ЭПП зернистый слой сформирован 3–4 рядами вытянутых вдоль поверхности эпидермиса клеток (см. рис. г). Ядра их овальной формы с преобладанием эухроматина в кариоплазме. Количество цистерн эндоплазматического ретикулума и свободных рибосом меньше, чем в цитоплазме шиповатых клеток. Тонофибриллы немного разрыхлены, гранулы кератогиалина в основном не крупные.

Роговой слой представлен безъядерными плоскими клетками с электронно-плотной цитоплазмой, заполненной фибриллярными белками (кератогиалином). Цитолемма этих клеток образует глубокие инвагинации, обеспечивающие прочность межклеточных взаимодействий.

Таким образом, экстракты нормализуют процесс заживления холодových ран.

В связи с тем, что ЭКП и ЭСС ускоряют и нормализуют заживление холодových ран у крыс, мы изучили влияние этих экстрактов на метаболическую активность фибробластов в культуре, так как культура фибробластов кожи является удобной моделью для определения тканеспецифической биологической активности экстрактов относительно данного вида клеток.

Как видно из таблицы 4, внесение экстрактов в среду культивирования не влияет на метаболическую активность фибробластов на 2 сутки культивирования. На 5 сутки при добавлении ЭКП в конечной концентрации пептидов 1 мкг/мл метаболическая активность клеток увеличивается в 1.2 раза и статистически достоверно ( $p < 0.05$ ) превышает этот показатель для контрольных клеток, которые культивировались без добавления экстрактов. На 7 сутки культивирования метаболическая активность фибробластов, которые культивировались в присутствии ЭКП в конечной концентрации пептидов 1 мкг/мл, превышает контроль в 1.3 раза, а при добавлении ЭСС при той же концентрации пептидов - в 1.2 раза. Внесение ЭСС с концентрацией пептидов 0.1 мкг/мл не влияло на метаболическую активность клеток по сравнению с контролем. Если увеличение метаболической активности фибробластов на 7 сутки при добавлении ЭКП объясняется тканеспецифическим влиянием пептидов кожи на фибробласты, то биологическая активность ЭСС может быть обусловлена пептидами фибробластов, которые присутствуют в соединительной ткани селезенки.

Таблица 4

**Метаболическая активность фибробластов по интенсивности флуоресценции (усл. ед.) восстановленного редокс-индикатора AlamarBlue в зависимости от концентрации пептидов кожи поросят и селезенки свиней**

Внесенный экстракт и концентрация пептидов	Сутки инкубирования		
	2	5	7
Контроль без добавления экстракта	732±33	987±48	1431±73
ЭКП, 0.1 мкг/мл	799±38	1031±47	1695±70*
ЭКП, 1 мкг/мл	845±45	1204±60*	1875±77*
ЭСС, 0.1 мкг/мл	766±44	1095±43	1571±86
ЭСС, 1 мкг/мл	769±42	1137±51	1763±90*

Примечание: \* – отличия статистически достоверны по сравнению с контролем,  $p < 0.05$ .

При инкубации фибробластов в среде с 2% ЭТС наблюдается уменьшение метаболической активности клеток на 5 сутки, а на 7 она составляет лишь 51.2% от контроля (табл. 5). При конечной концентрации пептидов ЭКП 1 и 1.5 мкг/мл сохраняется метаболическая активность



фибробластов практически на уровне, который наблюдается в контрольных пробах с 10% ЭТС. Добавление в среду инкубации ЭСС не влияло на метаболическую активность клеток.

Таблица 5

**Метаболическая активность фибробластов при 2% ЭТС в среде инкубирования (% от контроля с 10% ЭТС) в зависимости от концентрации пептидов кожи поросят и селезенки свиней**

Внесенный экстракт и концентрация пептидов, мкг/мл	Сутки инкубирования		
	2	5	7
Без добавления экстракта	86.5	64.1	51.2
ЭКП	0.1	104.8	79.3
	0.5	89.1	80.3
	1.0	98.8	95.9
	1.5	99.3	94.3
ЭСС	0.1	84.2	50.2
	0.5	84.9	53.4
	1.0	89.4	58.3
	1.5	88.7	59.6

Сыворотка крови эмбрионов содержит большое количество различных белков и пептидов, в том числе и способных как стимулировать пролиферативную активность клеток, так и тормозить рост клеток. Белки и пептиды сыворотки, которые специфически участвуют в стимуляции деления клеток, называются факторами роста. Концентрация таких факторов в сыворотке составляет несколько наногамм и меньше. Значительная часть этих факторов специфическая для конкретного вида клеток и стадии дифференцировки. Влияние ЭТС на пролиферативную и метаболическую активность фибробластов зависит от ее концентрации в среде культивирования. Выявлено также дозозависимое влияние ЭКП на эти показатели при низкой концентрации ЭТС. Следовательно, можно считать, что этот экстракт также содержит факторы роста фибробластов.

### Выводы

Экстракты криоконсервированных фрагментов селезенки свиней и кожи поросят, а также подмора пчел ускоряют заживление холодных ран кожи у крыс. Они проявляют выраженное иммуномодулирующее влияние: в более ранние сроки, по сравнению с контролем, происходит нормализация лейкоцитарной формулы крови и ЛИИМ, а следовательно уменьшается выраженность воспаления и деструктивных процессов в ране. Введение экстрактов животным с холодными ранами ускоряет регенерацию эпителия и образования в дерме производных кожи по сравнению с контрольными животными.

При добавлении ЭКП или ЭСС в среду культивирования фибробластов кожи наблюдается увеличение их метаболической активности.

Полученные результаты могут быть использованы при разработке иммунобиологических препаратов для нормализации процесса заживления ран.

### Список литературы

1. Буянова А.В. Морфологические основы реализации иммунного ответа в коже // Журнал дерматол. и венерол. – 1999. – №2. – С.46–48.
2. Белоусов А.Е. Рубцы как глобальная проблема пластической хирургии // Анналы пластич. и эстетич. хирургии. – 2004. – №4. – С. 41–42.
3. Pharmacological modulation of wound healing in experimental burns / A. Jurjus, B.S. Atiyeh, I.M. Abdallah et al. // Burns. – 2007. – Vol. 33. – Pp. 892–907.
4. Kondo S. The roles of cytokines in photoaging // J. Dermatol. Sci. – 2000. – Vol.23. – Pp.30–36.
5. Khosrotehrani K. Mesenchymal stem cell therapy in skin: why and what for? // Exp. Dermatol. – 2013. – № 22. – Pp. 307–310.
6. Возможности апитерапии при оказании медицинской помощи пострадавшим от ожогов / К.Н. Мовчан, В.Д. Хижа, О.В. Чичков и др.. – СПб: ИИЦ ВМА, 2007. – 256 с.
7. Celltherapyforskinwoundusingfibroblastencapsulatedpoly(ethylene glycol)-poly(L-alanine) thermogel / E.J. Yun, B. Yon, M.K. Joo, B. Jeong // Biomacromol. – 2012. – Vol. 13. – Pp. 1106–1111
8. Гординская Н.А. Влияние иммунопрепаратов на течение инфекции при экспериментальной термической травме // Иммунология. – 2008. – №4. – С. 212–213.
9. Therapeutic potential of fibroblast growth factor-2 for hypertrophic scars: upregulation of MMP-1 and HGF expression / H. Eto, H. Suga, N. Aoi et al. // Laboratory Investigation. – 2012. – Vol. 92. – Pp. 214–223.



10. Moro C, Lafont M. Natriuretic peptides and cGMP signaling control of energy homeostasis. // *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* – 2013. – №3. Vol.304. – Pp. 358–368.
11. Тимошин С.С., Сазонова Е.Н. Влияние регуляторных пептидов на процессы поддержания структурного гомеостаза (итоги 20-летнего экспериментально-клинического исследования) // *Дальневосточный медицинский журнал.* – 2005. – №3. – С. 94–97.
12. Влияние эндобронхиального введения экстракта криоконсервированных фрагментов ксено-селезенки на некоторые факторы местного иммунитета в комплексной терапии больных с абсцессами легких / В.В. Бывов, И.П. Высеканцев, С.Е. Гальченко, Б.П.Сандомирский // *Пробл. криобиологии.* – 2001. – №4. – С. 65–70.
13. Донцов В.И. Регуляция лимфоцитами клеточного роста соматических тканей и новая иммунная теория старения. Обзор // *Профилактика старения.* –1998. –Вып.1. –С.40–63.
14. Пат. 64381 А Україна, МПК7А61К35/12. Спосіб отримання екстрактів ксеногенних органів / С.Є. Гальченко, Н.Ю. Шкодовська, Б.П. Сандомирський, В.І. Грищенко; ІПКіК НАН України. – № 2003054649; Заявл. 22.05.2003; Опубл. 16.02.2004. Бюл. №2.
15. Назаренко Г.И., Кипшум А.А. Клиническая оценка результатов лабораторных исследований. – М.: Медицина, 2000. – 544 с.
16. Показатели крови и лейкоцитарного индекса интоксикации в оценке тяжести и определении прогноза при воспалительных, гнойных и гнойно-деструктивных заболеваниях / В.К. Островский, А.В. Машенко, Д.В. Янголенко, С.В. Макаров // *Клин. лаб. диагностика.* – 2006. – №6. – С. 50–53.
17. Миронов А.А., Комиссарчик Я.Ю., Миронов В.А. Методы электронной микроскопии в биологии и медицине / Отв. ред. Н. Н. Никольский. – СПб: Наука, 1994. –399 с.

## **BIOLOGICAL ACTIVITY OF EXTRACTS OF ANIMAL ORIGIN IN COLD INJURY OF SKIN AND IN CULTURE OF FIBROBLASTS**

**I.G. Besspalova, E.O. Bogatyryova,  
A.V. Shnyder, I.V. Belochkina, ,,  
S.Ye.Galchenko, B.P.Sandomirsky**

*Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine,  
Pereyaslavskaya St, 23,  
Kharkov, 61015, Ukraine*

*E-mail: irabespalova@ukr.net*

It is shown that extracts of cryopreserved pigs' spleen fragments, piglets' skin fragments and dead bees accelerates the healing of rats' skin cold wounds. This extract shows the pronounced immunomodulatory effects in earlier periods, compared with the control, leukocyte formula of blood is normalized, expression of inflammation and, consequently, inflammatory processes in the wound are reduced. The introduction of extracts to animals with cold injuries accelerates the regeneration of epithelium and the formation of skin derivatives in dermis in comparison with control animals. The addition of the extract of cryopreserved newborn piglets' skin fragments or the one of cryopreserved pigs' spleen fragment to the culture medium of fibroblasts increases the metabolic activity of cells.

Key words: fibroblasts, culture, extract, skin, spleen, died bees.