

УДК 611.018.5.088:618.48:616-001.186-003.9

О.К. Гулевський, Н.М. Моїсєєва\*, О.Л. Горіна, Ю.С. Ахатова

## Порівняльна оцінка ранозагоювальної дії низькомолекулярної фракції кордової крові (до 5 кДа) та препарату «Актовегін» при кріошкодженнях шкіри

UDC 611.018.5.088:618.48:616-001.186-003.9

O.K. Gulevsky, N.M. Moisieieva\*, O.L. Gorina, Yu.S. Akhatova

## Comparative Evaluation of Wound Healing Effect of Cord Blood Low Molecular Weight Fraction (Below 5 kDa) and Actovegin Drug in Skin Cryolesions

**Реферат:** Представлено результати порівняльного дослідження впливу низькомолекулярної (до 5 кДа) фракції з кордової крові (ФКК) великої рогатої худоби та препарату порівняння «Актовегін» на процеси регенерації тканин після кріодеструкції шкіри щурів. Показано, що локальний контактний кріовплив призводить не лише до деструкції всіх шарів шкіри, а й вторинного ішемічного пошкодження більш глибоких і навкружних тканин. Результати використання ін'єкційного розчину ФКК у терапії змодельованого кріошкодження довели його виражену ранозагоювальну дію, яка проявлялася в прискоренні репараційних процесів, поліпшенні трофіки пошкодженої ділянки за рахунок гіперваскуляризації та запобіганні склеротичних процесів. Введення щуром ФКК і препарату порівняння «Актовегін» прискорювало нормалізацію клінічних показників крові (кількість еритроцитів, лейкоцитів та активність лужної фосфатази) в більш коротші терміни порівняно з контролем. Отриманий ефект можна порівняти з дією препарату «Актовегін».

**Ключові слова:** кріодеструкція, кордова кров, «Актовегін», щури, рана поверхня.

**Abstract:** This paper presents the results of comparative studies of the impact of the low molecular weight (below 5 kDa) cattle cord blood fraction (CBF) and the comparator drug Actovegin on tissue regeneration after skin cryoablation in rats. Here, a local contact cryoexposure was shown to result not only in destruction of all skin layers, but secondary ischemic damage to deeper and adjacent tissues as well. The use of an injection solution of CBF as a therapy for simulated cryolesion proved its pronounced wound healing effect, manifested in accelerated reparation, improved trophicity in an injured area due to hypervascularization and prevention of sclerotic processes. The introduction of CBF and Actovegin to rats accelerated the normalization of clinical blood parameters (RBC and WBC counts, alkaline phosphatase activity) in shorter terms as compared with the control. The obtained effect may be compared with Actovegin action.

**Key words:** cryoablation, cord blood, Actovegin, rats, wound surface.

На сьогодні кріотерапія – один з широко застосованих у медицині методів. Зокрема, в дерматологічній практиці кріотехнології використовують для видалення пухлин, лікування гнійних захворювань м'яких тканин, актинічних кератозів і гемангіом [10, 11, 20]. Проте в останні роки з'являється все більше повідомлень про те, що кріодеструкція не дає очікуваного результату або супроводжується погіршенням стану навкружних здорових тканин [21, 26, 27]. Показано, що при проведенні кріодеструкції складно контролювати глибину і площу ушкодження, а тривалі набряки призводять до неконтрольованого розростання сполучної тканини, порушення метаболічних процесів і пригнічення

To date, the cryotherapy is one of the most common methods in medicine. Cryotechniques in dermatological practice are specifically used to remove tumors, to treat purulent soft tissue diseases, actinic keratoses and hemangiomas [4, 19, 20]. However, several publications have recently appeared, where cryoablation is reported not to ensure the expected outcomes or worsen the surrounding healthy tissues [6, 18, 21]. The difficulty to control the depth and area of the lesion during cryoablation has been shown, moreover the prolonged edemas may cause an uncontrolled growth of connective tissue, metabolic disorders and inhibition of proliferation in the lesion area [1]. For example, M.O. Okunев *et al.* [19] demonstrated the local cryoablation of

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

Department of Cold Adaptation, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

\*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:

вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61016;  
тел.: (+38 057) 373-41-43, факс: (+38 057) 373-59-52  
електронна пошта: ukrainanataliy@gmail.com

\*To whom correspondence should be addressed:

23, Pereyaslavska str., Kharkiv, Ukraine 61016;  
tel.: +380 57 373 4143, fax: +380 57 373 5952  
e-mail: ukrainanataliy@gmail.com

Надійшла 27.03.2018  
Прийнята до друку 20.04.2021

Received March, 27, 2018  
Accepted 20, April, 2021

© 2021 O.K. Gulevsky, *et al.* Published by the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

проліферації в зоні ушкодження [1]. Наприклад, М.О. Окунов та співавт. [10] показали, що після проведення локальної кріодеструкції гемангіоми шкіри, яка утворюється з гіперплазованого ендотелію капілярів, у пацієнтів дитячого віку в ряді випадків спостерігається активний її ріст. При цьому одужання вдавалося досягти лише після хірургічного або комбінованого лікування.

Доведено, що подібні ускладнення кріотерапії пов'язані безпосередньо з травматичністю впливу: нанесення на шкіру кріогенного агенту супроводжується швидким замерзанням і подальшим повільним розморожуванням тканини, що призводить до руйнування клітин і клітинних органел кристалами льоду в результаті процесів кристалізації та рекристалізації [6, 13, 18]. Як наслідок – у місці аплікації кріоагенту відбуваються повне руйнування дрібних судин, спазм, оклюзія і подальший парез судин з розвитком реологічних порушень (стаз, тромбоз та ішемічне ушкодження тканин). Через гіпоксію в тканинах порушуються метаболічні процеси (синтез макроергічних сполук, накопичення продуктів перекисного окиснення ліпідів), що призводить до вторинних деструктивних змін, формування додаткового осередку запалення, некрозу, порушення процесів ангиогенезу і колагенотворення [8, 14].

Раніше нами було показано, що для запобігання подібних змін можливе застосування низькомолекулярної фракції кордової крові [4]. Даний препарат є високоочищеним кріогемолізатом кордової крові з компонентами, молекулярна маса яких не перевищує 5 кДа [3]. Механізм дії фракції є комплексним і базується, в першу чергу, на стимулюванні синтезу АТФ, збільшенні загального аденілатного пулу, енергетичного заряду клітин та вмісту внутрішньоклітинної глюкози за рахунок впливу на транспортери глюкози та її утилізацію шляхом покращення кисневого метаболізму [2, 16, 17, 23]. У проведених нами дослідженнях *in vivo* на моделях виразки шлунка, термічного опіку і механічної травми рогівки було доведено здатність низькомолекулярної фракції кордової крові до вираженої ранозагоювальної дії, запобігання гіперплазії сполучної тканини й формування фіброзних рубців [5, 24]. Вказані ефекти відкривають перспективу в лікуванні ускладнених ран, які виникли після локальної кріотерапії захворювань різної етіології.

Мета роботи – дослідити вплив низькомолекулярної фракції кордової крові великої рогатої худоби на процеси загоєння шкіри після кріодеструкції у експериментальних шурів.

skin hemangiomas, formed from hyperplastic capillary endothelium, to occasionally induce their active growth in pediatric patients. Herewith the recovery was achieved after surgical or combined treatment only.

Similar complications of cryotherapy have been proven as directly related to the exposure injury, *i. e.* the application of cryogenic agent onto the skin is accompanied by rapid freezing, followed by slow tissue warming, leading to the destruction of cells and their organelles by ice crystals as a result of crystallization and recrystallization [2, 14, 22]. Consequently, at the site of cryoagent application the small vessels are completely destroyed, and the spasm, occlusion and further vascular paresis with developing rheological disorders (stasis, thrombosis and ischemic tissue damage) occur. Hypoxia in tissues disrupts the metabolic processes (synthesis of macroergic compounds, accumulation of lipid peroxidation products), resulting in secondary destructive changes, formation of additional inflammatory focus, necrosis, disruption of angiogenesis and collagen formation [15, 25].

Previously, we have shown the use of the cord blood low molecular fraction as able to prevent these changes [12]. The drug is the highly purified cord blood cryohemolysate with the components of molecular weight below 5 kDa [11]. The action mechanism of the fraction is complex and primarily based on stimulating ATP synthesis, increasing the total adenylate pool, cell energy charge and intracellular glucose content via affecting the glucose transporters and its utilization through oxygen metabolism improvement [9, 11, 23, 24]. Our *in vivo* studies on the models of gastric ulcer, thermal burns and mechanical injury to the cornea proved the ability of low molecular fraction from cord blood to a pronounced wound healing effect, prevention of connective tissue hyperplasia and the formation of fibrous scars [5, 8]. The mentioned effects are promising in treatment of complicated wounds, occurred after local cryotherapy of diseases of various etiology.

The aim of this study was to investigate the impact of low molecular fraction derived from cattle cord blood on skin healing processes after cryoablation in experimental rats.

### Materials and methods

Low molecular weight fraction was procured from cattle cord blood (CBF). To separate the cells and their fragments, the mechanically defibrinated whole blood was subjected to cryohemolysis and centrifuged for 15 min at 10,000g. The obtained supernatant was purified in two stages: first through a filter Sartopure GP2 (Sartorius, Germany), retaining molecules with a molecular weight above 100 kDa, and then by tangential membrane ultrafiltration [11]

## Матеріали та методи

Низькомолекулярну фракцію (ФКК) отримували з кордової крові великої рогатої худоби. Для відділення клітин та їх фрагментів дефібриновану механічним способом цільну кров піддавали кріогемолізу і центрифугували 15 хв при 10 000 g. Отриманий супернатант очищували в два етапи: спочатку через фільтр «Sartopure GP2» («Sartorius», Німеччина), який затримує молекули з молекулярною масою понад 100 кДа, після чого застосовували тангенціальну мембранну ультрафільтрацію [3] з мембранним модулем «Vivaflow-200» («Sartorius», Німеччина) з номінальною масою, яка відсікається, – 5 кДа. Фільтрат ліофілізували в сублимаційній установці LZ-45 («Frigeria», Чехословаччина, 1986) з тиском до  $5 \times 10^{-2}$  мм рт. ст. протягом 28–30 годин і зберігали при  $-80^{\circ}\text{C}$ . Препаратом порівняння був «Актовегін»® (40 мг/мл; «Nicomed», Австрія), який є депротейнізованим гемодериватом з крові молочних телят. Перед використанням фракцію розчиняли у фізіологічному розчині в необхідній концентрації та вводили експериментальним щурам масою 230–250 г у дозі 17 мг/кг, розрахованій відповідно до терапевтичної дози препарату «Актовегін» для людини.

Експерименти проводили відповідно до Закону «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№3447-IV від 21.02.2006) із дотриманням вимог комітету з біоетики Інституту, узгоджених із положеннями «Європейської конвенції з захисту хребетних тварин, які використовуються в експериментальних та інших наукових цілях» (Страсбург, 1986).

Роботу виконували на самцях білих нелінійних щурів. Кріотравми моделювали на латеральній поверхні стегна. З метою стандартизації площі кріювпливу застосовували кріоінструмент з охолоджуваним аплікатором діаметром 8 мм ( $-196^{\circ}\text{C}$ ). Тривалість дії на поверхню шкіри тварини складала 60 с. Вибір часу експозиції обумовлений необхідністю домогтися деструкції тканин, достатньої для руйнування більшості патологічних утворень шкіри [22, 28].

Тварини були розділені на 4 групи (у кожній  $n = 16$ ). Групу 1 склали інтактні щури («Норма»). Тваринам інших груп після моделювання кріоушкодження протягом 14 діб (раз на добу) внутрішньом'язово вводили: групі 2 («Контроль») – фізіологічний розчин, групі 3 – «Актовегін», групі 4 – ФКК.

Для оцінки ранозагоювального ефекту ФКК після кріоушкодження досліджували площу ран, гістологічні зрізи і клінічні показники крові щурів у динаміці на 3, 7 і 14-ту доби експерименту.

with a membrane module Vivaflow-200 (Sartorius, Germany) with a nominal cut-off mass of 5 kDa. The filtrate was lyophilized in a sublimation unit LZ-45 (Frigeria, Czech Republic, 1986) with a pressure of up to  $5 \times 10^{-2}$  mm Hg for 28–30 hrs and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . As a comparator drug we used Actovegin® (40 mg/ml; Nicomed, Austria), which is a deproteinized hemo-derivative obtained from calf blood. Before use, the fraction was dissolved in saline at the required concentration and administered to experimental rats weighing 230–250 g at a dose of 17 mg/kg, calculated according to the therapeutic dose of Actovegin for humans.

The experiments were performed in accordance with the Law 'On the Protection of Animals Against Cruelty' (№ 3447-IV of February 21, 2006) in compliance with the requirements of the Bioethics Committee of the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the NAS of Ukraine, consistent with the statements of European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986).

The research was performed in white outbred male rats. Cryolesions were simulated on the lateral surface of femur. In order to standardize the cryoexposure area we used the cryogenic tool with a cooling applicator of 8 mm diameter ( $-196^{\circ}\text{C}$ ). The duration of exposure onto the animal skin surface was 60 seconds. The choice of exposure time was due to the need to achieve the tissue ablation sufficient to destroy most pathological skin formations [7, 28].

Animals were divided into 4 groups ( $n = 16$ , each group). The group 1 consisted of intact rats (the norm). Animals of other groups after cryolesion simulation were intramuscularly injected (once a day) within 14 days with the following substances: saline for group 2 (control), Actovegin drug (group 3) and CBF (group 4).

To assess the wound healing effect of CFB after cryolesions, the wound area, histological sections and clinical parameters of rat blood were examined in dynamics to days 3, 7 and 14 of experiment.

The wounds were imaged at the specified time periods in order to assess the changes in surface area. The images were then processed with Zeiss LSM Image Examiner Version 4.2.0.121 (Carl Zeiss, Germany) software, that enabled calculating the surface area of irregular shape ( $\text{mm}^2$ ).

For histological analysis, the tissues were fixed in a 10% formalin solution, then treated with alcohol and embedded in paraffin. The sections of 5–6  $\mu\text{m}$  thick were prepared and stained with hematoxylin and eosin [13].

The erythrocyte and leukocyte numbers were estimated in complete blood count by the common





У зазначені терміни для оцінки зміни площі поверхонь рани фотографували, отримані знімки обробляли за допомогою програми «Zeiss LSM Image Examiner Version 4.2.0.121» («Carl Zeiss», Німеччина), що дозволяло розрахувати площу поверхні неправильної форми (мм<sup>2</sup>).

Для гістологічного аналізу тканини фіксували в 10%-му розчині формаліну, піддавали спиртовій проводці та заливці парафіном, готували зрізи товщиною 5–6 мкм і забарвлювали гематоксилином та еозином [7].

У рамках клінічного аналізу крові щурів підраховували кількість еритроцитів і лейкоцитів загальноприйнятими методами і визначали активність лужної фосфатази (ЛФ) у сироватці крові [12].

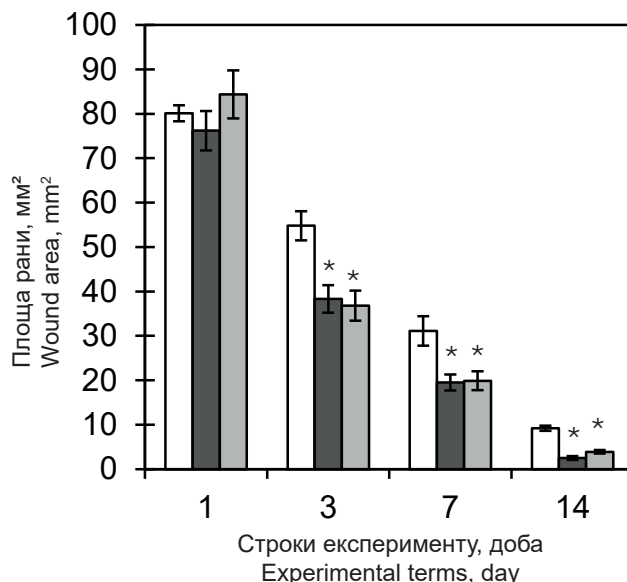
Статистичний аналіз експериментальних даних проводили за допомогою комп'ютерної програми «Statgraphics plus for Windows 2.1» («Manugistics Inc.», США) за непараметричним критерієм Манна-Уїтні при  $p < 0,05$ .

### Результати та обговорення

На першому етапі роботи оцінювали зміну площі ран у тварин контрольної та дослідних груп. Через добу після кріовпливу середня площа ран у щурів всіх груп була схожа і становила 77–84 мм<sup>2</sup> (рис. 1), на 3-тю добу даний показник у групах введення ФКК і препарату порівняння «Актовегін» значуще відрізнявся ( $p < 0,05$ ) від контрольних та становив  $(36,8 \pm 3,4)$  і  $(38,3 \pm 3,1)$  мм<sup>2</sup> відповідно, а в контрольній групі –  $(54,8 \pm 3,3)$  мм<sup>2</sup>. На 7-му добу площа ран в обох дослідних групах також була значуще менше, ніж у контрольній ( $p < 0,05$ ). З рис. 1 видно, що тенденція до зменшення даного показника зберігалася до 14-ї доби.

Під час гістологічного аналізу у досліджуваній зоні було виявлено подібну тенденцію. У тварин контрольної групи на 3-тю добу експерименту після кріовпливу спостерігалися некротичні зміни шкіри: деструкція всіх шарів епідермісу і волокнистих структур дерми, некроз клітин волосяних фолікулів, множинні ділянки з ознаками гемостазу (рис. 2, А). У більш глибоких шарах шкіри відзначено дистрофічні зміни м'язових волокон, які супроводжувалися обширною лейкоцитарною інфільтрацією.

У зоні дефекту контрольних гістологічних препаратів на 7-му добу візуалізувався нерівномірно потовщений епідерміс із ознаками набряку, в якому визначалися гомогенно забарвлені базальні клітини без ядер. У глибоких шарах дерми спостерігалися крововиливи і масивна запальна реакція (рис. 2, В). Шари дерми не розрізня-



**Рис. 1.** Динаміка зміни площі ран у щурів після кріо-аплікації шкіри та введення ФКК і препарату порівняння «Актовегін»: □ – група «Контроль», ■ – група тварин, яким вводили «Актовегін», ▒ – група тварин, яким вводили ФКК. \* – відмінності значущі порівняно з контролем,  $p < 0,05$ .

**Fig. 1.** Dynamics of changes in wound area in rats after skin cryoexposure and administering CBF and comparator drug Actovegin: □ – control group, ■ – group of animals administered with Actovegin, ▒ – group of animals administered with CBF. \* – differences are significant as compared with the control,  $p < 0.05$ .

methods and the activity of alkaline phosphatase (AP) in blood serum was determined [27].

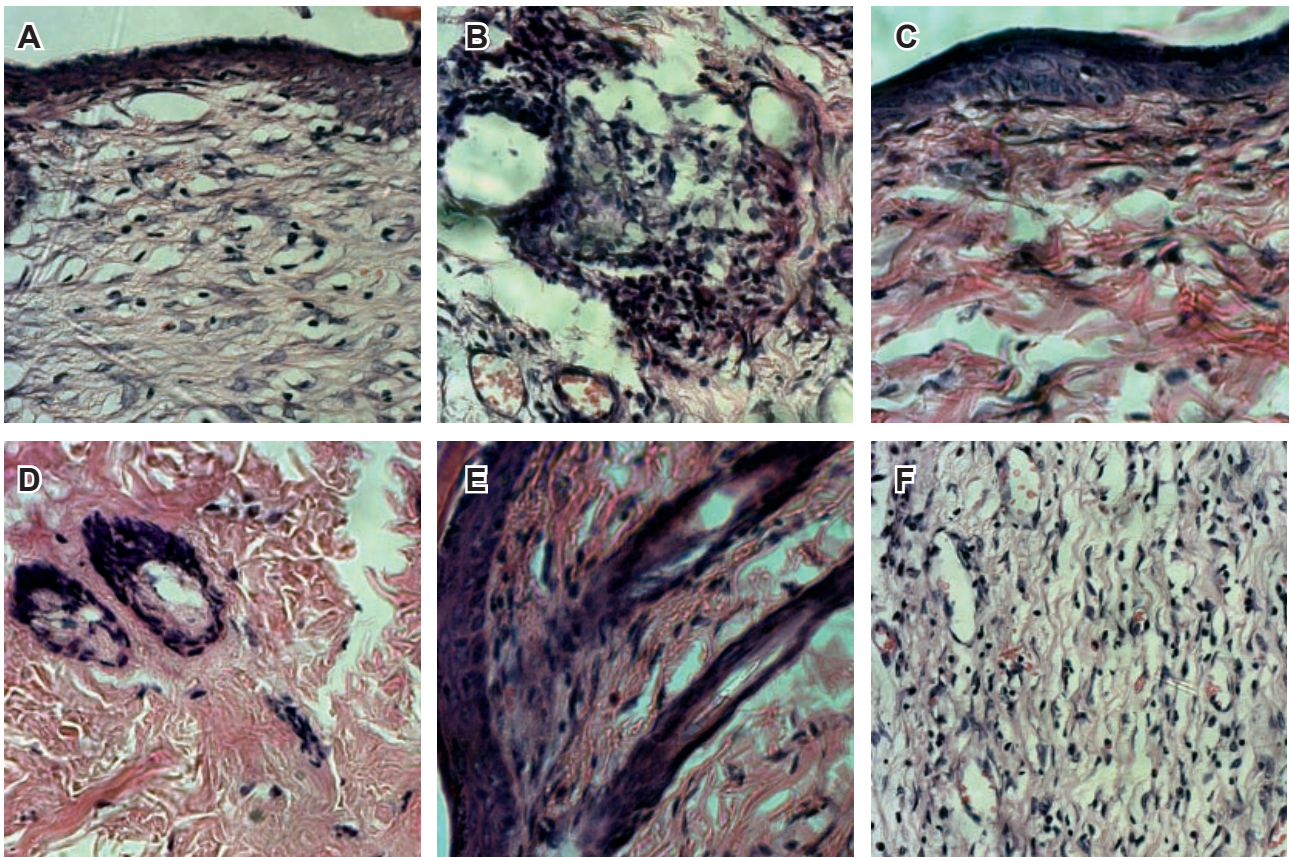
The experimental data were statistically processed using the Statgraphics plus for Windows 2.1 (Manugistics Inc., USA) according to the Mann-Whitney U test at  $p < 0.05$ .

### Results and discussion

The first step of this study was to assess the changes in wound area in animals of control and experimental groups. One day after cryoexposure, the average wound area in rats of all groups was similar and made 77–84 мм<sup>2</sup> (Fig. 1). To day 3 this index in the groups, administered with CBF and comparator drug Actovegin was significantly different ( $p < 0.05$ ) from the control ones and made  $(36.8 \pm 3.4)$  and  $(38.3 \pm 3.1)$  мм<sup>2</sup>, respectively, and it was  $(54.8 \pm 3.3)$  мм<sup>2</sup> in the control group. To day 7, the wound area in both experimental groups was also significantly smaller vs. the control ( $p < 0.05$ ). As Fig. 1 demonstrates, the tendency to this index decrease was kept until day 14.

Histological analysis in the studied area revealed a similar tendency. In animals of the control group to day 3 of experiment the necrotic skin changes such as: destruction of all epidermal layers and fibrous dermal structures, necrosis of hair follicle cells, multiple sites with hemostasis signs were observed





**Рис. 2.** Гістологічні зразки шкіри щурів контрольної групи (А – 3 доби, В – 7 діб, С – 14 діб) і групи введення ФКК (D – 3 доби, E – 7 діб, F – 14 діб) після кріовпливу. Забарвлення гематоксилином і еозином,  $\times 400$ .

**Fig. 2.** Histological skin samples from rats of control group (A – 3 days, B – 7 days, C – 14 days) and CBF group (D – 3 days, E – 7 days, F – 14 days) after cryoexposure. Hematoxylin & eosin stain,  $\times 400$ .

лися, відзначалися порушення впорядкованості колагенових волокон і склерозування волоссяних фолікулів із пікнотичними ядрами в клітинах.

На 14-ту добу в гістологічних препаратах тварин контрольної групи повного відновлення епідермісу не спостерігалось (рис. 2, С). У зоні некротично зміненої ділянки шкіри виявлено проліферацію епітелію, під яким по всій довжині присутні лейкоцитарні інфільтрати високої щільності. У дермі відстежувалися виражена груба структура колагенових волокон та збільшена кількість клітинних елементів (рис. 2, С), переважали склеротичні судини і судини з тромбами. У глибоких шарах дерми між пучками дистрофічно змінених м'язових волокон власного м'язу шкіри виявлено розростання грануляційної тканини. У цій зоні відзначено незначну проліферацію фібробластів і помірну кількість лейкоцитів. Встановлені зміни свідчили про слабкі репаративні процеси на даному часовому проміжку.

У тварин з груп введення препарату «Актовегін» і ФКК динаміка репаративних процесів істотно відрізнялася від контролю. На 3-тю добу

after cryoexposure (Fig. 2A). In deeper skin layers, dystrophic changes in muscle fibers, accompanied by extensive leukocyte infiltration, were found.

To day 7, in the control histological specimens, an unevenly thickened epidermis with the signs of edema was visualized in the defect area, where homogeneously stained basal cells without nuclei were revealed. In deep dermal layers, the hemorrhages and a massive inflammation were observed (Fig. 2B). The dermal layers were not distinguished, disordered arrangements of collagen fibers and hardening of hair follicle with pyknotic nuclei in cells, were noted.

To day 14 in histological preparations from animals of the control group, no complete epidermal regeneration was found (Fig. 2C). The proliferation of epithelium, under which the leukocyte infiltrates of high density were present along the entire length, was revealed in the skin area with necrotic changes. A pronounced rough structure of collagen fibers and an increased number of cell elements were observed in the dermis (Fig. 2C). The sclerotic vessels and those with thrombi were predominant. In deep dermal layers between the bundles of dystrophically altered muscle fibers of the intrinsic skin muscle, the growth of granulation tissue was detected. In this area,





після кріовпливу в зразках також спостерігалися ознаки деструкції: місцями інтенсивна лейкоцитарна інфільтрація, руйнування волосяних фолікулів, тромбоз судин і розшарування колагенових волокон. При цьому основною зміною після введення препарату «Актовегін» або ФКК вже на вказаному терміні спостереження було формування грануляційної тканини в глибоких шарах шкіри, яке супроводжувалося збільшенням кількості периваскулярно розташованих макрофагальних і фібробластних клітинних елементів. Більшу частину грануляційної тканини склали численні капіляри і розташовані між ними фібробласти і макрофаги (рис. 2, D).

Ін'єкції препарату «Актовегін» через 7 діб після кріовпливу сприяли зменшенню вираженості деструкції тканин: ослаблення запальної інфільтрації, активація фібробластів, формування грануляційної тканини з новоутвореними капілярами. Крім того, в грануляційній тканині визначалося більш впорядковане розташування колагенових волокон, що свідчило про активні синтетичні й відновні процеси в сполучній тканині.

У групі тварин після введення ФКК на 7-му добу після кріодеструкції також відзначена гіперваскуляризація, яка є маркером відновних процесів – прискорення розвитку грануляційної тканини (рис. 2, E). Дерма мала волокнисту структуру з характерним впорядкованим розташуванням пучків колагенових волокон (рис. 2, E). Крім того, спостерігалася збільшена кількість макрофагів, розташованих як периваскулярно, так і між пучками м'язових волокон власного м'язу шкіри. В підшкірній клітковині формувалася грануляційна тканина з дифузійною лейкоцитарною інфільтрацією, що є ознакою відновних процесів у власному м'язі шкіри даної групи тварин.

При подальшому введенні тваринам препарату «Актовегін» ознаки деструкції тканин були менш вираженими: зменшувалася запальна клітинна інфільтрація, формувалася грануляційна тканина з новоутвореними функціонуючими капілярами. Так, на 14-ту добу в шкірі щурів даної групи відбувалося відновлення всіх шарів епідермісу. В цей термін спостереження добре розрізнялися шари дерми. Відзначено потовщення й упорядкування колагенових волокон, а також відновлення волосяних фолікулів, які є ознаками прискорення репаративних процесів.

Ін'єкції ФКК протягом 14-ти діб сприяли збільшенню кількості та діаметра судин, а також їх нормальному кровонаповненню. Крім того, реєструвалося відновлення всіх шарів епідер-

a slight proliferation of fibroblasts and a moderate number of leukocytes were noted. The revealed changes testified to a weak reparation at this time period.

In animals of the groups, received Actovegin and CBF, the dynamics of reparative processes was significantly different from the control. To day 3 after cryoexposure, the samples displayed the signs of destruction, *i. e.* intensive leukocyte infiltration in some areas, hair follicle destruction, vascular thrombosis and stratification of collagen fibers. Herewith, the main change after Actovegin or CBF administration even within the mentioned observation period was the formation of granulation tissue in the deep skin layers, accompanied by an increased number of perivascularly located macrophage and fibroblast cell elements. Granulation tissue was mostly composed of numerous capillaries and located between them fibroblasts and macrophages (Fig. 2D).

Injections of Actovegin drug 7 days later cryoexposure promoted to reduce the severity of tissue destruction, specifically the weakening of inflammatory infiltration, activation of fibroblasts, formation of granulation tissue with newly formed capillaries. In addition, a granulation tissue showed an ordered arrangement of collagen fibers, indicating the active synthetic and restorative processes in connective tissue.

To day 7 after cryoablation, the group of animals, received CBF exhibited also the hypervascularity, that was a regeneration marker, namely the acceleration of granulation tissue development (Fig. 2F). The dermis had a fibrous structure with a specific ordered arrangement of collagen fiber bundles (Fig. 2F). In addition, an increased number of macrophages, located both perivascularly and between bundles of muscle fibers of intrinsic skin muscle, was observed. Granulation tissue with diffuse leukocyte infiltration was formed in subcutaneous tissue, which was a sign of regenerative processes in intrinsic skin muscle of this group of animals.

With further Actovegin administration to animals, the signs of tissue destruction were less pronounced, namely the inflammatory cell infiltration decreased, granulation tissue with newly formed functioning capillaries was formed. For example, the whole epidermal layers of the skin of this group rats were regenerated to day 14. Within this observation period, the dermal layers were well distinguished. The thickening and arrangement of collagen fibers, as well as the hair follicles regeneration, suggesting the acceleration of reparative process, were noted.

The CBF injections within 14 days promoted to increase the number and diameter of blood vessels, as well as their normal blood supply. In addition, the regeneration of all epidermal layers, the structure of hair follicles and sebaceous glands were observed.



місу, структури волосяних фолікулів і сальних залоз. У дермі визначалася збільшена кількість клітин фібробластного ряду, які розташовувалися паралельно новоутвореним впорядкованим пучкам колагенових волокон (рис. 2, F). Встановлені зміни свідчили про поліпшення трофіки пошкодженої тканини і стимуляцію відновних процесів.

Таким чином, визначення швидкості та якості загоєння ран після кріоушкоджень дозволило виявити виражену ранозагоювальну дію ФКК, схожу з дією препарату «Актовегін». Площі ран у групах тварин, які отримували ін'єкції ФКК або препарату порівняння «Актовегін», були значуще ( $p < 0,05$ ) менше контрольних значень на всіх термінах спостереження. За результатами гістологічного аналізу шкіри щурів, яким після кріодеструкції вводили препарат «Актовегін» або ФКК, встановлено виражені та схожі за інтенсивністю відновні процеси. В зоні пошкодження шкіри активно формувалася грануляційна тканина і гіперваскуляризація, що, в свою чергу, стимулювало процеси проліферації в дермі і прискорювало відновлення пошкодженої шкіри в більш короткі терміни порівняно з контролем.

Відомо, що внаслідок кріодеструкції шкіри створюються умови для аутоінтоксикації та підвищеного антигенного навантаження за рахунок протеолізу тканинних білків і ферментативного аутолізу тканин [9]. Зокрема встановлено, що кріотравми викликають виражене порушення функцій альвеолярних макрофагів і поліморфноядерних лейкоцитів. Вже з перших хвилин кріопшкодження відбувається гемоліз еритроцитів. І.В. Міхін та співавт. [9] зазначають, що ступінь деструкції цих клітин залежно від площі і глибини ураження може сягати від (8–10)...(30–60)% від всього об'єму еритроцитів. Кріоушкодження ініціюють збільшення вмісту інгібіторів еритропоезу в крові. При цьому втрачається нормальна еритропоетична активність, внаслідок чого в організмі розвивається гіпоксія, яка вважається одним з основних чинників патогенезу обморожень. Тому моніторинг таких клінічних показників, як вміст лейкоцитів і еритроцитів, є досить інформативним і необхідним методом контролю загального стану організму після кріотравми.

У зв'язку з цим у кожному проміжку часу ми досліджували вміст лейкоцитів і еритроцитів у периферичній крові щурів. Кількість лейкоцитів у інтактних щурів становила  $(10,0 \pm 1,1)$  тис. кл/мкл. На 3-тю добу після локального кріоушкодження поверхні шкіри їх кількість різко

An increased number of fibroblast cells, located parallel to the newly formed ordered bundles of collagen fibers, were revealed (Fig. 2E). The established changes displayed an improved trophicity in the damaged tissue and stimulation of regenerative processes.

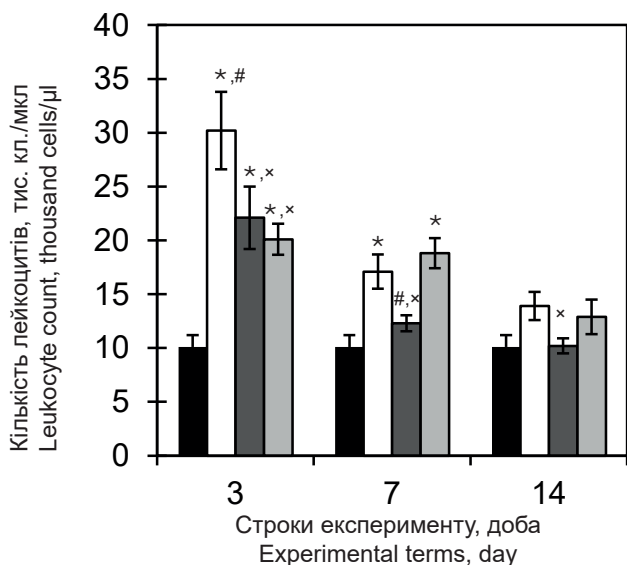
Thus, determining the rate and quality of wound healing after cryolesions enabled revealing a pronounced wound healing effect of CBF, similar to Actovegin one. The wound areas in groups of animals received CBF or comparator drug Actovegin were significantly ( $p < 0.05$ ) smaller than the control values for the whole observation period. Histological skin analysis from the rats, received Actovegin or CBF after cryoablation revealed the prominent and similar by intensity regenerative processes. Granulation tissue and hypervascularization were actively formed in the area of skin injury, that in turn, stimulated the proliferation in the dermis and accelerated the regeneration of damaged skin in a shorter time period as compared with the control.

It is known that the skin cryoablation creates the conditions for autointoxication and increased antigenic load due to the proteolysis of tissue proteins and enzymatic autolysis of tissues [16]. In particular, it was found that cryoinjuries caused severe dysfunction of alveolar macrophages and polymorphonuclear leukocytes. Erythrocyte hemolysis occurs even from the first minutes of cryoinjury. I.B. Mikhin *et al.* [16] mentioned that the destruction rate of these cells, depending on the lesion area and the depth could range from (8–10)...(30–60)% of the total volume of red blood cells. Cryolesions initiate an increase in the content of erythropoiesis inhibitors in blood. In this case, the loss of normal erythropoietic activity results in hypoxia development in the body, being assumed as one of the main factors in frostbite pathogenesis. Therefore, monitoring of such clinical indices as the leukocyte and erythrocyte counts is quite informative and necessary to control general condition of the body after cryoinjury.

Consequently, we examined the leukocyte and erythrocyte counts in peripheral blood of rats at each time interval. The leukocyte count in the intact rats was  $(10.1 \pm 1.1)$  thousand cells /  $\mu\text{l}$ . To day 3 after local cryoinjury of skin surface, the leukocyte level increased sharply up to  $(30.2 \pm 3.6)$  thousand cells /  $\mu\text{l}$ , that was 3 times higher than norm ( $p < 0.05$ ). After administering Actovegin and CBF, the leukocyte count within this time period was significantly lower ( $p < 0.05$ ) than the control, but significantly higher than norm ( $p < 0.05$ ) (Fig. 3).

To day 7 after Actovegin administration, the leukocyte count in blood decreased down to the values in intact animals and remained within the normal limits until the experiment end. The CBF introduction





**Рис. 3.** Кількість лейкоцитів у периферичній крові щурів після кріодеструкції шкіри і введення ФКК і препарату «Актовегін»: ■ – група «Норма», □ – група «Контроль», ■ – група тварин, яким вводили «Актовегін», ■ – група тварин, яким вводили ФКК. Відмінності значущі порівняно з нормою (\*), контролем у відповідній часовій точці (x) та групою введення ФКК (#),  $p < 0,05$ .

**Fig. 3.** Leukocyte count in peripheral rat blood after skin cryoablation and CBF and Actovegin administration: ■ – the norm group, □ – the control group, ■ – group of animals received Actovegin, ■ – group of animals received CBF. Differences are significant as compared with the norm (\*); with the control at the appropriate time point (x); with CBF group (#),  $p < 0.05$ .

збільшувалася до  $(30,2 \pm 3,6)$  тис кл/мкл, що в 3 рази перевищувало показник норми ( $p < 0,05$ ). Після введення препарату «Актовегін» і ФКК кількість лейкоцитів на цьому часовому проміжку була значуще нижче ( $p < 0,05$ ), ніж у контролі, але значуще вище норми ( $p < 0,05$ ) (рис. 3).

На 7-му добу після введення препарату «Актовегін» кількість лейкоцитів у крові знижувалася до значень інтактних тварин і залишалася в межах норми до закінчення терміну експерименту. Введення ФКК сприяло нормалізації даного показника на 14-ту добу після кріодеструкції. Таким чином, ін'єкції ФКК і «Актовегіну» значно знижували інтенсивність запальних процесів у організмі, але дія ФКК була менш вираженою.

Результати експерименту показали, що після кріоушкодження шкіри кількість еритроцитів у крові експериментальних тварин зменшується (рис. 4). Кількість еритроцитів у крові щурів контрольної групи була нижчою від норми ( $p < 0,05$ ), протягом експерименту істотно не змінювалася ( $p < 0,05$ ) і залишалася на рівні  $7,0-7,6$  млн кл/мкл за норми  $(9,0 \pm 0,5)$  млн кл/мкл.

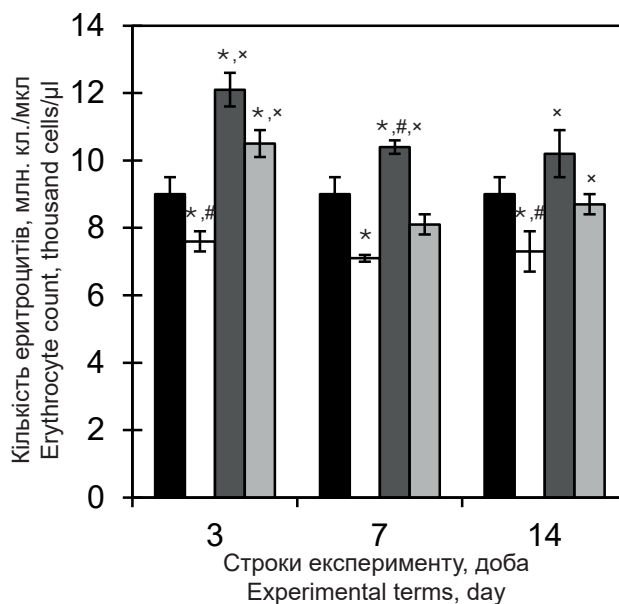
Після введення тваринам препарату порівняння «Актовегін» (група 3) відзначено збільшення кількості еритроцитів у крові. Зокрема, на 3-тю

normalized this index to day 14 after cryoablation. For examples, the CBF and Actovegin injections significantly reduced the intensity of inflammation in a body, but the CBF effect was less prominent.

Our findings showed the erythrocyte count in the blood of experimental animals to decrease after skin cryolesion (Fig. 4). The erythrocyte count in rat blood of control group was below the normal values ( $p < 0.05$ ). It was not significantly changed during experiment ( $p < 0.05$ ) and remained at the level of  $7.0-7.6$  million cells/ $\mu$ l with the norm of  $(9.0 \pm 0.5)$  million cells/ $\mu$ l.

After administering the comparator drug Actovegin to animals (group 3), an increase in erythrocyte count in blood was observed. In particular, to day 3 after local cryoablation, this index increased up to  $(12.1 \pm 0.5)$  million cells / ml in this group, that significantly ( $p < 0.05$ ) exceeded the values for intact and control animals. To day 14 of experiment, this group of animals displayed its decrease down to the normal values.

The CBF introduction also stimulated the hematopoiesis, while the erythrocyte count in blood was different (Fig. 4). In particular, despite a significant ( $p < 0.05$ ) increase in erythrocyte count to day 3



**Рис. 4.** Кількість еритроцитів у периферичній крові щурів після кріодеструкції шкіри та введення ФКК і препарату «Актовегін»: ■ – група «Норма», □ – група «Контроль», ■ – група тварин, яким вводили «Актовегін», ■ – група тварин, яким вводили ФКК. Відмінності значущі порівняно з нормою (\*), контролем у відповідній часовій точці (x) та групою введення ФКК (#),  $p < 0,05$ .

**Fig. 4.** Erythrocyte count in peripheral blood of rats after skin cryoablation and CBF and Actovegin administration: ■ – the norm group, □ – the control group, ■ – group of animals received Actovegin, ■ – group of animals received CBF. Differences are significant as compared with the norm (\*) with the control at the appropriate time point (x); and CBF group (#),  $p < 0.05$ .





добу після локальної кріодеструкції даний показник у цій групі збільшився до  $(12,0 \pm 0,5)$  млн кл/мл, що значуще ( $p < 0,05$ ) перевищувало значення інтактних і контрольних тварин. На 14-ту добу експерименту у щурів досліджуваної групи зареєстровано його зниження до нормальних значень.

Введення ФКК також сприяло стимуляції процесів кровотворення, але при цьому кількість еритроцитів у крові відрізнялася (рис. 4). Зокрема, незважаючи на значуще ( $p < 0,05$ ) збільшення кількості еритроцитів на 3-тю добу після кріодеструкції, досліджуваний показник у щурів із групи введення ФКК нормалізувався вже на 7-му добу. Отже, ФКК та препарат «Актовегін» в короткі терміни після кріодеструкції мали виражений вплив на процеси кровотворення і нівелювали гіпоксію. При цьому введення «Актовегіну» у дослідних тварин стимулювало еритропоез ефективніше, ніж ФКК.

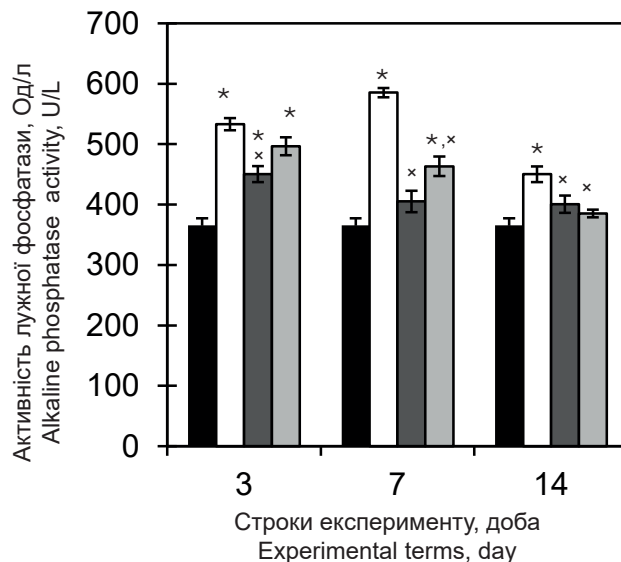
Інша картина спостерігалася при дослідженні активності ЛФ, яка міститься не лише в крові, а й в нейтрофільних гранулоцитах. Лужна фосфатаза є важливим параметром, що відображає розвиток запального процесу [15, 19, 25]. Вона бере участь у дефосфорильованні глюкози, утворенні значної кількості неорганічного фосфату, пул якого впливає на біоенергетику клітини і організму в цілому [19]. Лужна фосфатаза дефосфорильовується і тим самим інактивує рецептор, який опосередкує дію глюкокортикоїдів на фібробласти. Даний ефект впливає на темп відновних процесів у запальному осередку при загоєнні ран [15]. На 3-тю добу експерименту після кріодеструкції у тварин всіх груп встановлено підвищення активності ЛФ ( $p < 0,05$ ) (рис. 5).

Після введення «Актовегіну» активність ЛФ порівняно з контролем знижувалася вже на 3-тю добу, що вказує на меншу інтенсивність запальних процесів. Введення ФКК вірогідно знижувало рівень активності ЛФ на більш пізніх термінах (7-ма доба), ніж «Актовегіну». При цьому на 14-ту добу цей показник у тварин у групах введення ФКК і препарату «Актовегін», на відміну від контролю, повністю нормалізувався (рис. 5).

## Висновки

1. Встановлено, що введення ФКК і препарату «Актовегін» після кріодеструкції шкіри з 3-ї доби і протягом всього періоду експерименту значуще зменшувало площу ран. Значущої різниці між терапевтичною активністю ФКК і препарату «Актовегін» не спостерігалось.

2. У результаті гістологічного аналізу встановлено, що ФКК і препарат «Актовегін» мають



**Рис. 5.** Активність ЛФ у сироватці крові щурів після кріодеструкції шкіри та введення ФКК і препарату «Актовегін»: ■ – група «Норма», □ – група «Контроль», ■ – група тварин, яким вводили «Актовегін», ■ – група тварин, яким вводили ФКК. \* – відмінності значущі порівняно з нормою (\*) та контролем (#),  $p < 0,05$ .

**Fig. 5.** AP activity in rat blood serum after skin cryoablation and CBF and Actovegin administration: ■ – the norm group, □ – the control group, ■ – group of animals received Actovegin, ■ – group of animals received CBF. Differences are significant vs. the norm(\*) and with the control (#),  $p < 0.05$ .

after cryoablation, the studied index in rats with CBF was normalized even to day 7. Therefore, CBF and Actovegin within a short time period after cryoablation had a pronounced impact on hematopoiesis and eliminated the hypoxia. In this case, Actovegin in experimental animals stimulated erythropoiesis more efficiently if compared with CBF.

Another picture was observed when studying the activity of AP, contained not only in blood but in neutrophilic granulocytes as well. Alkaline phosphatase is an important parameter, reflecting the inflammation development [3, 17, 26]. It is involved into glucose dephosphorylation, formation of a significant amount of inorganic phosphate, the pool of which affects the bioenergy of cell and body as a whole [3]. Alkaline phosphatase is dephosphorylated, thus inactivating the receptor that mediates the glucocorticoid effect on fibroblasts. This effect influences the rate of regenerative processes in inflammatory focus during wound healing [26]. To day 3 of experiment, the animals of all groups showed an increased AP activity ( $p < 0.05$ ) after cryoablation (Fig. 5).

After Actovegin administration the AP activity decreased even to day 3 compared with the control, thereby thereby indicating a lower intensity of inflammatory processes. The CBF introduction was likely to reduce the level of AP activity at later terms



схожу за терапевтичною активністю ранозагоювальну дію, яка проявляється в стимуляції процесів проліферації в дермі, більш ранньому формуванні грануляційної тканини (до 7-ї доби спостереження), поліпшенні трофіки пошкодженої ділянки за рахунок гіперваскуляризації, що в сукупності прискорює відновлення шкіри, запобігає склеротичним явищам у тканинах та формуванню фіброзних рубців.

3. Динаміка кількості еритроцитів у крові тварин свідчить про здатність ФКК і препарату «Актовегін» стимулювати еритропоез, що особливо помітно на 3-тю та 7-му доби спостереження. В порівняльному аспекті більш ефективною дією володіє препарат «Актовегін».

4. Застосування ФКК і препарату «Актовегін» однаковою мірою сприяло нормалізації маркерів запалення (кількість лейкоцитів і активність ЛФ) у крові експериментальних щурів у більш коротші терміни порівняно з контролем.

*Автори висловлюють подяку с.н.с. Щенявському І.Й. за технічну допомогу в проведенні експериментів.*

## Література

1. Аманкулова СЖ. Применение криодеструкции для лечения Verruca plantaris. Вестник АГИУВ. 2016; (1): 57–60.
2. Гулевский АК, Ахатова ЮС, Сысоев АА, и др. Стимулирующее действие низкомолекулярной фракции кордовой крови на энергетический обмен в лейкоцитах. Доповіди НАНУ. 2014; (7): 152–7.
3. Гулевський ОК, Моїсєєва НМ, Абакумова ОС, Щенявський ІЙ, Нікольченко АЮ, Горіна ОЛ, винахідники; Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, патентовласник. Спосіб отримання низькомолекулярної фракції із крові великої рогатої худоби. Патент України № 69652. 10.05.2012.
4. Гулевський ОК, Щенявський ІЙ. Антигіпоксанта активність низькомолекулярної фракції з крові великої рогатої худоби, отриманої на різних стадіях онтогенезу. Проблеми кріобіології і кріомедицини. 2017; 27(1): 41–50.
5. Демин ЮА, Гулевский АК, Сейдалиева ЗА, и др. Изучение влияния низкомолекулярной фракции (до 5кДа) кордовой крови в составе геля на регенерацию роговицы после механического повреждения. Світ медицини та біології. 2013; (3): 7–11.
6. Ковалев ГА, Ищенко ИО, Наумова ОВ, и др. Морфологическая характеристика ран, вызванных криодеструкцией. Научные ведомости БелГУ. Медицина. Фармация. 2015; 22(32): 107–14.
7. Коржевский ДЭ, Гиляров АВ. Основы гистологической техники. Санкт-Петербург, СпецЛит, 2015. 807 с.
8. Лазаренко ВА, Артюшкова ЕБ, Мишустин ВН, и др. Комбинированное фармакологическое лечение контактного от-

(day 7) than Actovegin. At the same time, this index in animals with CBF and Actovegin was completely normalized to day 14, in contrast to the control (Fig. 5).

## Conclusions

1. The administered CBF and Actovegin after skin cryoablation were revealed to significantly reduce the wound area from day 3 and during the entire experiment. No significant difference between the therapeutic activity of CBF and Actovegin drug was observed.

2. Histological analysis showed the CBF and Actovegin to have the similar by therapeutic activity wound healing effect, manifested in stimulation of dermal proliferation, earlier formation of granulation tissue (prior to day 7 of observation), trophicity improvement in the injured area due to hypervascularization, which mutually accelerated the skin regeneration, prevented sclerotic phenomena in tissues and fibrous scar formation.

3. The dynamics of erythrocyte count in blood of animals testified to the ability of CBF and Actovegin to stimulate the erythropoiesis, being especially noticeable to days 3 and 7 of observation. In a comparative aspect, Actovegin occurred to be more efficient.

4. The use of CBF and Actovegin drug equally ensured the normalization of inflammation markers (leukocyte count and AP activity) in blood of experimental rats in a shorter time period vs. the control.

*The authors are grateful to I.Y. Shchenyavsky, senior research fellow for technical assistance with experiment performance.*

## References

1. Amankulova SJ. [The use of cryodestruction for the treatment of Verruca plantaris]. Vestnik AGIUV. 2016; (1): 57–60. Russian.
2. Bilgic S, Ozkan H, Ozenc S, et al. Treating frostbite. Can Fam Physician. 2008; 54(3): 361–3.
3. Buchet R, Millán JL, Magne D. Multisystemic functions of alkaline phosphatases. Phosphatase Modulators. 2013; 1053: 27–51.
4. Cranwell WC, Sinclair R. Optimising cryosurgery technique. Aust Fam Physician. 2017; 46(5): 270–4.
5. Dyomin YuA, Gulevsky AK, Seydaliyeva ZA, et al. [Influence of a low-molecular fraction (below 5 kDa) from cord blood as an eye gel component on cornea regeneration after mechanical damage]. Svit Medytsyny i Biolohii. 2013; (3): 7–11. Russian.
6. Fisher SR, Rigby JH, Mettler JA, et al. The effectiveness of photobiomodulation therapy versus cryotherapy for skeletal muscle recovery: a critically appraised topic. J Sport Rehabil. 2019; 28(5): 526–31.
7. Gage AA, Baust JM, Baust JG. Experimental cryosurgery investigations *in vivo*. Cryobiology. 2009; 59(3): 229–43.



- морожения в эксперименте. Вестник экспериментальной и клинической хирургии. 2013; 6(1): 45–9.
9. Михин ИВ, Кухтенко ЮВ. Ожоги и отморожения. Волгоград: Изд-во ВолгГМУ, 2012. 88 с.
  10. Окунев НА, Окунева АИ, Власов АП, и др. Локальная криодеструкция гемангиом у детей. Вестник экспериментальной и клинической хирургии. 2013; 8(2): 195–201.
  11. Павлов АВ, Маскин СС, Иголкина ЛА. Криовоздействие в лечении гнойных заболеваний кожи и подкожной клетчатки. Вестник Волгоградского ГМУ. 2018; (1): 3–9.
  12. Тиц НУ. Энциклопедия клинических лабораторных тестов. Москва: Лабинформ, 1997. 960 с.
  13. Шафранов ВВ, Борхунова ЕН, Костылев МА, и др. Механизм разрушения биологических тканей при локальной криодеструкции. Вестник РАЕН. 2012; 12(1): 68–77.
  14. Шейко ЕА. Гемангиомы у детей раннего возраста. Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2015; (4): 222–8.
  15. Шубич МГ, Нагоев БС. Щелочная фосфатаза в норме и патологии. Москва: Медицина, 1980. 224 с.
  16. Щенявский ИИ. Влияние фракции до 5 кДа, полученной из пуповинной крови телят, на содержание лактата и пирувата в печени крыс после глюкозной нагрузки. Вісник проблем біології і медицини. 2009; (4): 118–20.
  17. Щенявський ІЙ. Вплив фракції до 5 кДа з пуповинно-плацентарної крові великої рогатої худоби на вміст глюкози та лактату і пірувату у тканині опікових ран. Експериментальна та клінічна фізіологія і біохімія. 2010; (1): 50–3.
  18. Bilgic S, Ozkan H, Ozenc S, et al. Treating frostbite. *Can Fam Physician*. 2008; 54(3): 361–3.
  19. Buchet R, Millán JL, Magne D. Multisystemic functions of alkaline phosphatases. *Phosphatase Modulators*. 2013; 1053: 27–51.
  20. Cranwell WC, Sinclair R. Optimising cryosurgery technique. *Aust Fam Physician*. 2017; 46(5): 270–4.
  21. Fisher SR, Rigby JH, Mettler JA, et al. The effectiveness of photobiomodulation therapy versus cryotherapy for skeletal muscle recovery: a critically appraised topic. *J Sport Rehabil*. 2019; 28(5): 526–31.
  22. Gage AA, Baust JM, Baust JG. Experimental cryosurgery investigations in vivo. *Cryobiology*. 2009; 59(3): 229–43.
  23. Gulevsky AK, Akhatova YuS, Sysoev AA, et al. V. Energy metabolism of packed white cells after cryopreservation and rehabilitation in a medium containing a cord blood low-molecular fraction. *Biotechnologia Acta*. 2015; (6): 63–70.
  24. Gulevsky AK, Abakumova YS, Moiseyeva NN, et al. Influence of cord blood fraction (below 5 kDa) on reparative processes during subchronic ulcerative gastropathy. *Ulcers*. 2011; 2011 Sep 05 [Cited 2018 Feb 01]: Article ID 214124 Available from: <https://www.hindawi.com/journals/ulcers/2011/214124/>
  25. Millán JL. Alkaline phosphatases: structure, substrate specificity and functional relatedness to other members of a large superfamily of enzymes. *Purinergic Signalling*. 2006; 2(2): 335–41.
  26. Nadarajah S, Ariyagunaratnam R, Jong ED. Cryotherapy: not as cool as it seems. *J Physiol*. 2018; 596(4): 561–2.
  27. Point M, Guilhem G, Hug F, et al. Cryotherapy induces an increase in muscle stiffness. *Scand J Med Sci Sports*. 2018; 28(1): 260–6.
  28. Zimmerman E, Crawford P. Cutaneous cryosurgery. *American Family Physician*. 2012; 86(12): 1118–24.
  8. Gulevsky AK, Abakumova YS, Moiseyeva NN, et al. Influence of cord blood fraction (below 5 kDa) on reparative processes during subchronic ulcerative gastropathy. *Ulcers*. 2011; 2011 Sep 05 [Cited 2018 Feb 01]: Article ID 214124 Available from: <https://www.hindawi.com/journals/ulcers/2011/214124/>
  9. Gulevsky AK, Akhatova YuS, Sysoev AA, et al. V. Energy metabolism of packed white cells after cryopreservation and rehabilitation in a medium containing a cord blood low-molecular fraction. *Biotechnologia Acta*. 2015; (6): 63–70.
  10. Gulevsky OK, Akhatova YuS, Sysoev AA, et al. [Stimulating effect of a low-molecular fraction from cord blood on the energy metabolism in leukocytes]. *Dopovidi NAN Ukrainy*. 2014; (7): 152–7. Russian.
  11. Gulevsky OK, Moiseeva NM, Abakumova OS, Shcheniavsky II, Nikolchenko AY, Gorina OL, inventors; Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, assignee. A method of obtaining a low-molecular fraction from the blood of cattle. Ukraine patent UA 69652. 2012 May 10.
  12. Gulevsky OK, Schenyavsky II. Antihypoxant activity of low molecular weight fraction bovine blood cryohemolysate at different stages of ontogenesis. *Problems Cryobiol Cryomed*. 2017; 27(1): 41–50.
  13. Korzhnevskij DE, Gilyarov AV. [Fundamentals of histological technique]. St. Petersburg, SpecLit, 2015, 807 p. Russian.
  14. Kovalov GA, Ischenko IO, Naumova OV, et al. [Morphological characteristics of wounds caused by cryodestruction]. *Nauchnye Vedomosti BelGU. Mediczina. Farmacziya*. 2015; (21): 107–14. Russian.
  15. Lazarenko VA, Artiushkova EB, Mishustin VN, et al. [Combined pharmacological correction of experimental frostbite]. *Vestnik Eksperimentalnoj i Klinicheskoj Khirurgii*. 2013; 6(1): 45–9. Russian.
  16. Mikhin IV, Kukhtenko YuV. [Burns and frostbite]. Volgograd: VolgGMU; 2012. 88 p. Russian.
  17. Millán JL. Alkaline phosphatases: structure, substrate specificity and functional relatedness to other members of a large superfamily of enzymes. *Purinergic Signalling*. 2006; (2): 335–41.
  18. Nadarajah S, Ariyagunaratnam R, Jong ED. Cryotherapy: not as cool as it seems. *J Physiol*. 2018; 596(4): 561–2.
  19. Okunev NA, Okuneva AI, Vlasov AP, et al. [Local cryoablation hemangiomas in children]. *Vestnik Eksperimentalnoj i Klinicheskoj Khirurgii*. 2013; 8(2): 195–201. Russian.
  20. Pavlov AV, Masкин SS, Igoalkina LA. [Local cryotherapy in treatment of purulent skin diseases and subcutaneous tissue]. *Journal of Volgograd State Medical University*. 2018; (1): 3–9. Russian.
  21. Point M, Guilhem G, Hug F, et al. Cryotherapy induces an increase in muscle stiffness. *Scand J Med Sci Sports*. 2018; 28(1): 260–6.
  22. Shafranov VV, Borhunova EN, Kostylev MA, et al. [The mechanism of destruction of biological tissue at a local cryodestruction]. *Vestnik RAEN*. 2012; 12(1): 68–77. Russian.
  23. Shchenyavsky II. [Influence of the fraction below 5 kDa, extracted from the calf cord blood, on lactate and pyruvate contents in the rat liver after glucose loading]. *Vestnik Problem Biologii i Mediciny*. 2009; (4): 118–20. Russian.
  24. Shchenyavsky II. [Influence of the fraction under 5 kDa from the cattle cord blood on glucose, lactate and pyruvate contents in burn wound tissues]. *Eksperimentalna ta Klinichna Fizioloziia i Biokhimiia*. 2010; (1): 50–3. Ukrainian.
  25. Sheiko EA. [Hemangiomas in young children]. *Mezhdunarodnyj Zhurnal Prikladnykh i Fundamentalnykh Issledovanij*. 2015; (4): 222–8. Russian.
  26. Shubich MG, Nagoyev BS. [Alkaline phosphatase in health and disease]. Moscow: Mediczina, 1980. 224 p. Russian.
  27. Tits NU. [Encyclopedia of clinical laboratory tests]. Moscow: Labinform, 1997. 960 p. Russian.
  28. Zimmerman E., Crawford P. Cutaneous cryosurgery. *American Family Physician* 2012; 86(12): 1118–24.

