



<https://doi.org/10.15407/cryo35.04.210>

УДК: 547.459.5

Т.М. Гуріна¹, Г.О. Ковальов¹, Г.Л. Полякова^{1,*},
О.В. Наумова², В.Д. Марковський², А.А. Селюта¹

¹ Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України,
м. Харків, Україна

² Харківський національний медичний університет,
м. Харків, Україна

* poliakova79ann@gmail.com

ОЦІНКА ВПЛИВУ ГІАЛУРОНОВОЇ КИСЛОТИ ТА ДМСО НА ПЕРЕБІГ НИЗЬКОТЕМПЕРАТУРНОГО УШКОДЖЕННЯ ТКАНИН: ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА МОДЕЛЬ

У роботі проведено локальну гістологічну оцінку тканинної переносимості розчину, що містить гіалуронову кислоту, та досліджено його вплив на перебіг запального процесу після низькотемпературного ушкодження шкіри. На моделі низькотемпературного ушкодження тканини вивчено безпеку застосування 1%-вого розчину високомолекулярної гіалуронової кислоти з додаванням 5 % диметилсульфоксиду (ДМСО) та його вплив на розвиток запального процесу за результатами клінічного спостереження, планіметричного та гістологічного досліджень. Додатково в порівняльному аспекті вивчено вплив 1%-вих розчинів високомолекулярної (> 2000 кДа) та низькомолекулярної (10—100 кДа) гіалуронової кислоти на запальний процес після низькотемпературного ушкодження тканин. За результатами гістологічного дослідження не виявлено будь-яких морфологічних ознак токсичного або іншого негативного впливу підшкірного введення 1%-вого розчину високомолекулярної гіалуронової кислоти з додаванням 5 % ДМСО на тканини. Порівняння впливу кріозахисних розчинів на перебіг ранового процесу після низькотемпературного ушкодження тканин виявило відмінності як за вираженістю макроскопічних ознак запального процесу, так і за даними планіметричного дослідження. Включення гіалуронової кислоти до складу кріозахисного розчину розглядається як перспективний підхід до зниження концентрації ДМСО з метою створення розчинів, які можуть використовуватися без стадії відмивання.

Ключові слова: гіалуронова кислота, кріозахисний розчин, низькотемпературне ушкодження тканин, шкіра, рани, кріопротектор, кріоконсервування.

Гіалуронова кислота (ГК) — природний полісахарид із вираженими гідрофільними властивостями, що широко використовується у біотехнологіях та практичній медицині завдяки протизапальним, регенеративним та антиоксидантним властивостям [3, 9, 11, 17]. Уперше вона була виділена зі склоподібного тіла ока бика [27], а пізніше встановлено, що вона присутня у позаклітинному матриксі більшості не-

рвових та сполучних тканин [10]. Завдяки наявності карбоксильної групи в кожному фрагменті ГК має природний негативний заряд, який забезпечує здатність поглинати велику кількість води та набрякати до 1000 разів відносно свого об'єму [25, 26].

Кількість досліджень, присвячених використанню ГК у кріобіології, є обмеженою та має неоднозначні висновки [18, 28, 30, 34]. Такі

Цитування: Гуріна ТМ, Ковальов ГО, Полякова ГЛ, Наумова ОВ, Марковський ВД, Селюта АА. Оцінка впливу гіалуронової кислоти та ДМСО на перебіг низькотемпературного ушкодження тканин: експериментальна модель. *Проблеми кріобіології і кріомедицини*. 2025; 35(4): 222—32. <https://doi.org/10.15407/cryo35.04.210>

© Видавець ВД «Академперіодика» НАН України, 2025. Стаття опублікована на умовах відкритого доступу за ліцензією CC BY-NC-ND license (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

розбіжності можуть бути пов'язані зі значною залежністю властивостей ГК від її молекулярної маси, що у кожному випадку зумовлює необхідність додаткових порівняльних дослідів. Молекулярна маса ГК залишається ключовим фактором, який визначає різноманітність фізико-хімічних характеристик та біологічної активності цієї речовини [35].

Відомо, що високомолекулярна ГК (ВмГК) має протизапальні властивості, тоді як низькомолекулярна ГК (НмГК) сприяє імуностимуляції і посилює запальні процеси [8, 21, 31]. У більш ранній роботі [12] автори вже досліджували регенеративні властивості розчинів ВмГК та НмГК на моделі екссезійної рани та показали, що для розчинів НмГК вони є більш вираженими, ніж для розчинів ВмГК.

Здатність молекул ГК зв'язувати значну кількість вільної води відкриває широкі перспективи для її використання в технологіях, пов'язаних із застосуванням низьких температур [4, 19, 24, 29]. Зменшення кількості вільної води в біологічних об'єктах, що кріоконсервуються, сприяє пригніченню процесів кристалоутворення та росту кристалів льоду під час заморожування-відтавання, що, у свою чергу, зменшує механічне ушкодження клітин [20, 22]. Такі властивості роблять ГК перспективною складовою кріозахисного розчину. Кріозахисний розчин значною мірою визначає кінцевий результат збереження життєздатності біологічного об'єкта, що кріоконсервується. Останнім часом особливу увагу приділяють тенденції зменшення відсотка токсичних кріопротекторів на користь їх часткової заміни менш шкідливими речовинами, які додатково мають певні кріозахисні властивості. Нівелювання токсичної дії складових насамперед необхідне для кріозахисних розчинів, що не потребують відмивання. Гіалуронова кислота, як речовина природного походження, є одним із перспективних компонентів для дослідження її як додаткової складової таких розчинів.

Наразі існує значна кількість досліджень, присвячених впливу гелеутворювальних агентів у складі кріозахисних розчинів на ефективність кріоконсервування. Особливу увагу приділяють гелеутворювачам природного походження, таким як ГК, що здатна до склування за помірно низьких температур.

Найчастіше ГК використовується під час заморожування у комбінації з диметилсульфок-

сидом (ДМСО) [29], який є синтетичною органічною сполукою, яка добре проникає через шкіру та клітинні мембрани й здатна транспортувати інші речовини в глибокі шари тканин. Ця властивість може бути корисною в медицині, але водночас вона підвищує ризик токсичного впливу, особливо за високих концентрацій. ДМСО може викликати денатурацію білків, порушувати цілісність клітинних мембран і навіть сприяти апоптозу. Крім того, в організмі він частково перетворюється на диметилсульфід, який може мати додаткові токсичні ефекти й спричиняти неприємний запах.

Сучасні дослідження спрямовані на пошук домішок до кріозахисних розчинів на основі ДМСО, додавання яких має на меті зниження його початкової концентрації та створення такого складу кріозахисного розчину, що буде значно безпечнішим, менш токсичним та не потребуватиме відмивання після процедури відтавання [6, 32]. Необхідність відмивання біологічних об'єктів після експозиції у стандартних розчинах ДМСО залишається суттєвим обмеженням: це збільшує тривалість процедури, вимагає спеціальних умов, а також супроводжується втратою частини біологічного матеріалу та зниженням його функціональної якості. Запропонований розчин із додаванням ГК потенційно дозволяє мінімізувати ці недоліки, поєднуючи ефективність кріозахисту з безпекою подальшого використання біологічного матеріалу.

На етапах культивування та інкубації клітин перед заморожуванням ГК використовують як додаткову складову відповідних розчинів [24, 30] з подальшим заморожуванням у розчині ДМСО. Останнім часом з'являється дедалі більше досліджень, які підтверджують позитивний вплив додавання ГК безпосередньо до складу кріозахисного розчину на основі класичних кріопротекторів [4, 13, 23, 36].

Існує багато робіт, що висвітлюють окреме застосування ДМСО або ГК для загоювання ран різної етіології [2, 16]. Значно менше досліджень присвячено лікуванню безпосередньо холодових травм, особливо з використанням ДМСО. Є поодинокі роботи щодо лікування обмороження шкіри тварин [15]. Але маємо зазначити, що обидві речовини застосовують у поєднанні з іншими субстанціями: ГК — як гелеутворювальний агент, а ДМСО — як провідник для доставки ліків [33].

Попри природне походження та тривалий досвід застосування ГК у медицині та косметології, її використання потребує додаткового вивчення, зокрема щодо впливу на тканини після низькотемпературного ушкодження. Низькотемпературне ушкодження тканин характеризується складною патофізіологією, оскільки ураження зачіпає не лише поверхневі шари шкіри, а й глибші структури — судини, м'язи та нерви. Такий вид травм супроводжується швидким розвитком вираженого набряку, що робить їх зручною експериментальною моделлю для вивчення протизапальної дії розчинів, що містять ГК.

Мета роботи — визначення за даними гістологічного дослідження локальної тканинної переносимості розчину з гіалуронової кислоти та 5 % диметилсульфоксиду та оцінка його впливу на перебіг запального процесу після низькотемпературного ушкодження шкіри.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

В експериментах використовували 5 % ДМСО (США) та 1 % ГК різної молекулярної маси (Bang&Bonsomer, Фінляндія): НмГК (10—100 кДа) і ВмГК (>2000 кДа) у фізіологічному розчині.

Дизайн досліджень схвалено комітетом із біоетики Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (Протокол №5 від 22.11.2022). Експерименти проводили відповідно до Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» і «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986).

Експеримент проводили на безшерстих щурах, які утримувалися за стандартних умов віварію ІПКіК НАН України.

Для знеболювання використовували комплексний препарат «Телазол» (Zoetis, США) (50 мг/кг, внутрішньом'язово).

Тварин виводили з експерименту шляхом декапітації після знеболювання, з подальшим гістологічним контролем стану тканини у зоні холодового ушкодження на 14 та 28-му добу дослідження.

Матеріал фіксували в 10%-вому водяному розчині нейтрального формаліну, який містить буфер, потім проводили целоїдин-парафінову проводку, після чого готували серійні зрізи зав-

товшки $4-5 \times 10^{-6}$ м на мікротомі-кріостаті «МК-100» (ЕКА, Україна). Оглядові препарати, забарвлені гематоксиліном та еозином, використовували для загальної оцінки стану тканин. Забарвлення пікрофусином за методами Ван Гізона та Малорі застосовували для виявлення та оцінки розвитку сполучнотканинних структур. Забарвлення залізним гематоксиліном використовували для визначення альтернативних змін у м'язовій тканині стегна щурів. Гістологічні та гістохімічні методики виконувалися відповідно до посібників з гістологічної техніки та гістохімії [1].

Гістологічні препарати вивчали за допомогою мікроскопа «Olympus BX-41» (Olympus, Велика Британія) та програмного забезпечення «Olympus DP-Soft 3.1» (Olympus). Оцінювання проводили не менше ніж у 10 випадково вибраних полях зору.

Низькотемпературне ушкодження тканин моделювали 30-секундним притисканням кріоаплікатора (діаметр 8,0 мм, температура -196°C) до латеральної поверхні стегна обох лап. Одразу після кріоаплікації, навколо видимої зони ушкодження шкіри та частково під ушкоджену шкіру, з 6—8 точок вводили досліджуваний розчин об'ємом 0,8 мл, відступаючи 1—2 мм від видимого кордону зони ушкодження. Таким чином, ГК формувала «подушку» навколо та під ушкодженою шкірою. Ін'єкції проводили лише у праві лапи щурів, тоді як ліві лапи залишалися контрольними.

Динаміку загоєння ран спостерігали впродовж 28 діб, здійснюючи щотижневу фотофіксацію поточного стану ранової поверхні. Площу ран на 1, 7, 14 та 28-му добу визначали за планіметричним методом з використанням програмного забезпечення з відкритим кодом «ImageJ 1.54» (National Institutes of Health, США).

Дослідження проводили у кілька етапів. Спочатку визначали доцільність включення ГК до складу кріозахисних розчинів, що не потребують відмивання, зокрема безпечність локального введення ВмГК з ДМСО. Після підтвердження безпечності перевірили його протизапальну дію, очікувану на основі біологічних властивостей ГК. Модель низькотемпературного ушкодження тканин обрали через значний набряк, що виникає після дії низьких температур. Для виключення ефекту ДМСО досліджували наслідки окремого введення ВмГК. Для

оцінки впливу молекулярної маси ГК на загоєння ран після низькотемпературного ушкодження шкіри вивчали ефект від окремого введення НмГК.

Для виявлення можливого токсичного впливу кріозахисного розчину (1%-вого розчину ВмГК з додаванням 5 % ДМСО) при підшкірному введенні на першому етапі оцінювали гістологічну будову тканин стегна інтактних щурів та щурів з ін'єкціями розчину.

Дизайн першого етапу дослідження.

Група 1.1 (контроль) — інтактні тварини, $n = 7$.

Група 1.2 — підшкірне введення 1%-вого розчину ВмГК з додаванням 5% ДМСО, $n = 7$.

На другому етапі роботи за даними клінічного спостереження вивчали вплив 1%-вого розчину ВмГК з 5 % ДМСО на розвиток запального процесу у тварин після низькотемпературного ушкодження тканин. Для обґрунтування вибору складу кріозахисного розчину окремо порівнювали вплив розчинів, що містили ВмГК або НмГК, на запальний процес після низькотемпературного ушкодження тканин.

Дизайн другого етапу дослідження.

Група 2.1 (кріоаплікація) — низькотемпературне ушкодження без введення будь-яких розчинів, $n = 21$.

Група 2.2 (кріоаплікація + ВмГК + ДМСО) — низькотемпературне ушкодження та підшкірне введення 1%-вого розчину ВмГК з 5% ДМСО, $n = 7$.

Група 2.3 (кріоаплікація + ВмГК) — низькотемпературне ушкодження та підшкірне введення 1%-вого розчину ВмГК, $n = 7$;

Група 2.4 (кріоаплікація + НмГК) — низькотемпературне ушкодження та підшкірне введення 1%-вого розчину НмГК, $n = 7$.

Всього в роботі було використано 35 тварин.

Статистичну обробку даних проводили за допомогою програми «Statistica 10.0» (StatSoft, США) із використанням непараметричного критерію Манна-Уїтні та критерію Краскела-Уолліса. Дані представляли у вигляді $M + m$, де M — середнє значення, m — стандартне відхилення. Значущими вважали відмінності при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

У зв'язку з тим, що терапевтична дія ГК значною мірою залежить від її молекулярної маси, першочерговим завданням було визначити оп-

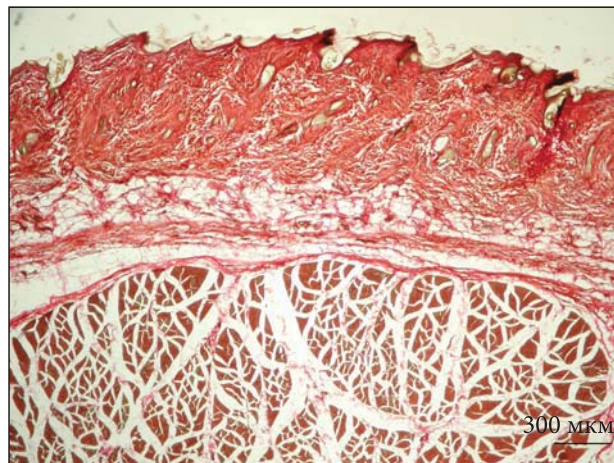


Рис. 1. Нормальна гістологічна будова тканин стегна щура. Група 1.1 (контроль). Забарвлення за Ван Гізоном, $\times 40$

тимальний склад розчину ГК для подальшого використання у кріоконсервуванні. Брали до уваги той факт, що після холодових травм завжди виникає запальний процес із вираженим набряком у зоні ушкодження, а до складу кріозахисного розчину як кріопротектор часто додають ДМСО. Окрім того, саме ВмГК має виражену протизапальну дію [8, 14], а ДМСО відомий своїми протизапальними властивостями [7].

Перший етап дослідження. Вивчали вплив кріозахисного розчину ВмГК та ДМСО на гістологічну структуру тканин стегна експериментальних тварин при підшкірному введенні.

При мікроскопічному дослідженні тканин щурів інтактної групи (група 1.1, контроль) у складі тканин стегна виявлено епідерміс, дерму та м'язову тканину (рис. 1). Епідерміс був представлений багат шаровим плоским зроговілим епітелієм із трьома шарами: базальним, шипуватим і роговим. Базальний шар епідермісу складався з одного ряду розпластаних клітин з овальним інтенсивно базофільним ядром та середнім ступенем дисперсності хроматину; подекуди спостерігалися фігури мітозу. Шипуватий шар містив 1—2 ряди полігональних клітин менших розмірів із помірною здатністю сприймати основні барвники. Роговий шар складався з 1—2 рядів без'ядерних еозинофільних рогових лусочок. Базальна мембрана епідермісу була безперервною, тонкою, гомогенною.

У дермі візуалізувалися сосочковий та сітчастий шари. Сосочки дерми були широкі, сплюснені, представлені пухкою волокнистою сполучною тканиною. При фарбуванні за Ван

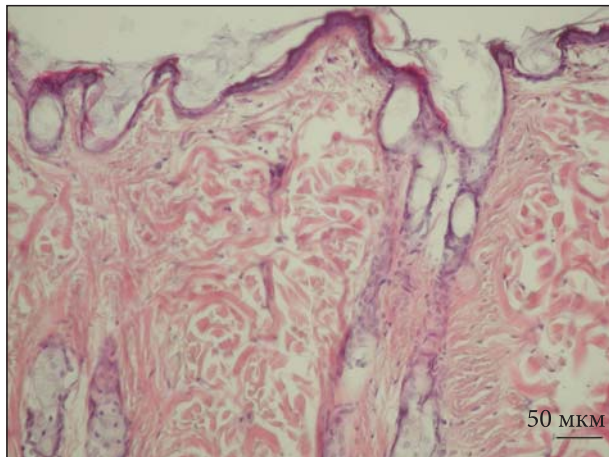


Рис. 2. Нормальна гістологічна будова епідермісу та дерми щура. Група 1.1 (контроль). Забарвлення гематоксилином та еозином, $\times 200$

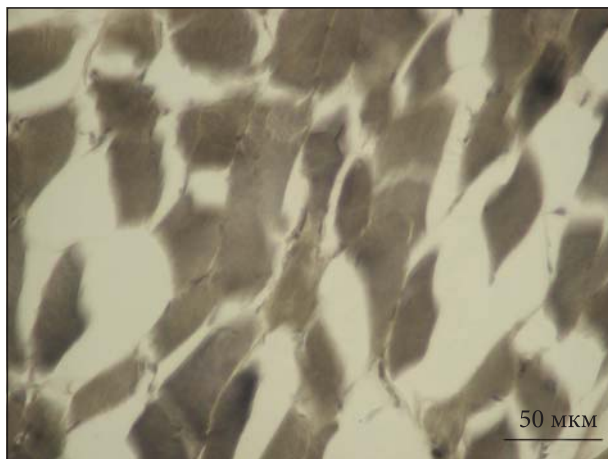


Рис. 3. М'язові волокна м'язів стегна щурів. Група 1.1 (контроль). Забарвлення залізним гематоксилином, $\times 400$

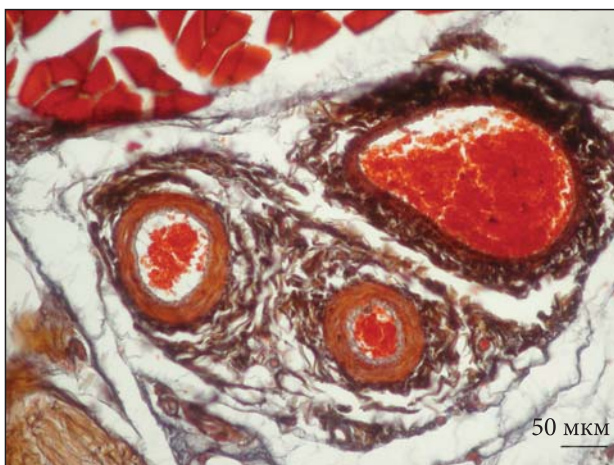


Рис. 4. Судинно-нервовий пучок у міжм'язовому просторі стегна щура. Група 1.1 (контроль). Забарвлення за Малорі, $\times 200$

Гізоном та Малорі визначалися тонкі колагенові та еластичні волокна. Між сполучнотканинними волокнами розташовувалися капіляри та нечисленні клітини (фібробласти, макрофаги, тканинні базофіли, лімфоцити).

Сітчастий шар дерми містив інтенсивно фуксинофільні пучки колагенових волокон із мережею еластичних волокон, орієнтованих паралельно поверхні шкіри та під кутом до неї. В основній речовині подекуди візуалізувалися фібробласти та фіброцити з помірно або слабо базофільним ядром та слабо еозинофільною цитоплазмою.

Придатки шкіри (волосяні фолікули та сальні залози) були нечисленними. Епітеліальні клітини волосної піхви мали велике округле базофільне ядро та помірно ацидофільну цитоплазму. Сальні залози склалися з великих клітин з оптично порожньою або світлою цитоплазмою та великим округлим слабо базофільним ядром. Базальна мембрана епітелію волосяних піхов та сальних залоз була тонкою та безперервною.

Капіляри сосочкового та сітчастого шарів мали добре виражений просвіт із помірною кількістю формених елементів крові. Ендотеліоцити мали сплющену форму, слабо базофільну цитоплазму та трохи витягнуте базофільне ядро, були розташовані на тонкій безперервній судинній мембрані. Навколо капілярів місцями візуалізувалися дрібно осередкові лімфомакрофагальні інфільтрати (рис. 2).

У гіподермі виявлено тонкий шар острівців жирової тканини, між якими проходили тонкі пучки фуксинофільних колагенових волокон із дрібними судинами та нервовими стволиками.

М'язова тканина складалася з волокон із помірно або слабо базофільними паличкоподібними ядрами та еозинофільною цитоплазмою. При забарвленні залізним гематоксилином м'язові волокна мали сірий колір (рис. 3). Між волокнами розташовувалися прошарки пухкої волокнистої сполучної тканини з тонкими фуксинофільними колагеновими волокнами, нечисленними фібробlastами, судинами, нервами (рис. 4). Дрібні артерії та вени гіподерми і м'язового шару помірно кровонаповнені; ендотеліальні клітини артерій утворювали частокол, базальна мембрана тонка, безперервна. Вени дещо звивисті, розширені, повнокровні. Ядра ендотеліоцитів чіткі, помірно базофільні, розташовані близько один до одного.

Таким чином, гістологічна будова тканин стегна інтактних щурів відповідала нормі.

При мікроскопічному дослідженні тканин стегна щурів із групи 1.2 (підшкірне введення ВмГК з ДМСО) на 14 та 28-му доби не виявлено травматичних або запальних змін. Епідерміс зберіг нормальну структуру: базальні епідермоцити розпластані з овальними базофільними ядрами, в частині клітин визначалися фігури мітозу, роговий шар складався з 1—2 рядів без'ядерних лусочок, базальна мембрана тонка та безперервна (рис. 5).

У дермі визначалися сосочковий та сітчастий шари без патологічних змін (рис. 6). Клітинні елементи представлені фібробластами та фіброцитами зі слабо еозинофільною цитоплазмою та слабо базофільним ядром. Капіляри мали помітний просвіт із переважно еритроцитами, ендотеліоцити були сплюснені, базальна мембрана тонка, безперервна. Місцями визначалися дрібні периваскулярні лімфомакрофагальні інфільтрати.

Гіподерма містила прошарки жирової тканини, розділені тонкими фуксинофільними колагеновими волокнами, що продовжувалися з сітчастого шару дерми. Між ними проходили дрібні судини та нервові стволики.

Нижче гіподерми були розташовані групи м'язових волокон без патологічних змін. Вони характеризувалися добре вираженою поперечною смугастістю ацидофільної цитоплазми, містили паличкоподібні помірно або слабо базофільні ядра. При забарвленні залізним гематоксиліном м'язові волокна були сірого кольору (рис. 7). Дрібні артерії гіподерми та м'язового шару були помірно кровонаповнені. Вени мали дещо звивисту форму, просвіт розширений, заповнений переважно еритроцитами. Ендотеліоцити мали чітко помірно базофільне ядро. Базальна мембрана артерій та вен тонка, безперервна. Між нервовими волокнами візуалізувалися тонкі фуксинофільні прошарки колагенових волокон.

Отже, при комплексному вивченні мікропрепаратів тканин стегна тварин групи 1.2 (після підшкірного введення розчину ВмГК з ДМСО) на 14 та 28-му добу гістологічна картина, ступінь вираженості гістохімічних реакцій у епідермісі, дермі, гіподермі та м'язах стегна не відрізнялися від групи 1.1 (контроль). Таким чином, за результатами гістологічного дослід-

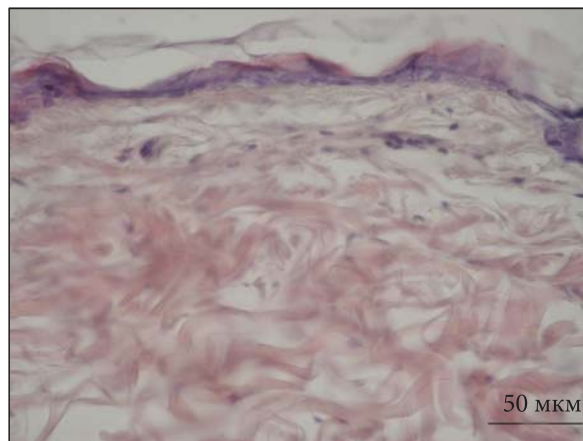


Рис. 5. Безперервний шар епідермісу нормальної будови в зоні ін'єкції. Нечисленні фібробласти у сосочковому шарі дерми. Група 1.2 (підшкірне введення 1%-вого розчину ВмГК з 5 % ДМСО), 14-та доба. Забарвлення гематоксиліном та еозином, $\times 200$

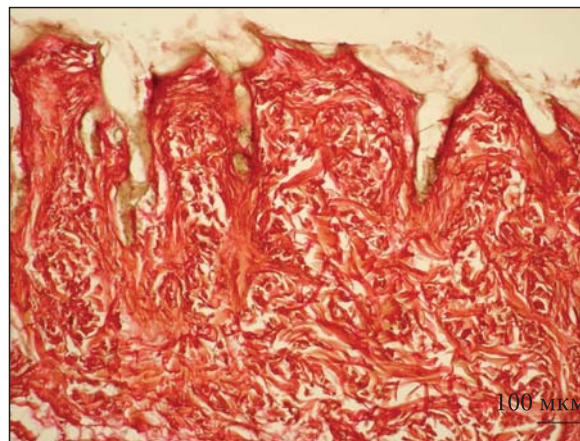


Рис. 6. Фуксинофільні колагенові волокна сосочкового та сітчастого шарів дерми. Група 1.2 (підшкірне введення 1%-вого розчину ВмГК з 5 % ДМСО), 14-та доба. Забарвлення за Ван Гізоном, $\times 200$

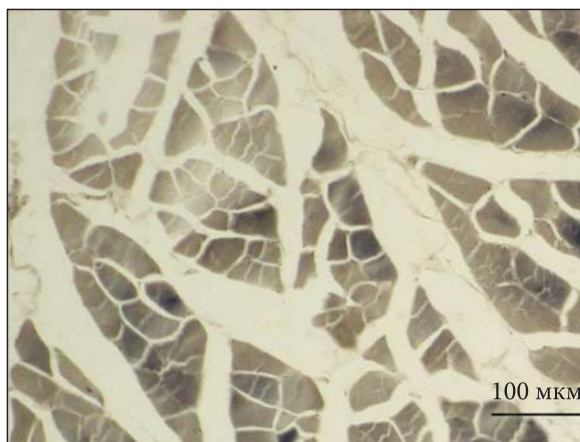


Рис. 7. М'язові волокна м'язів стегна щурів. Група 1.2 (підшкірне введення 1%-вого розчину ВмГК з 5 % ДМСО), 28-та доба. Забарвлення залізним гематоксиліном, $\times 200$

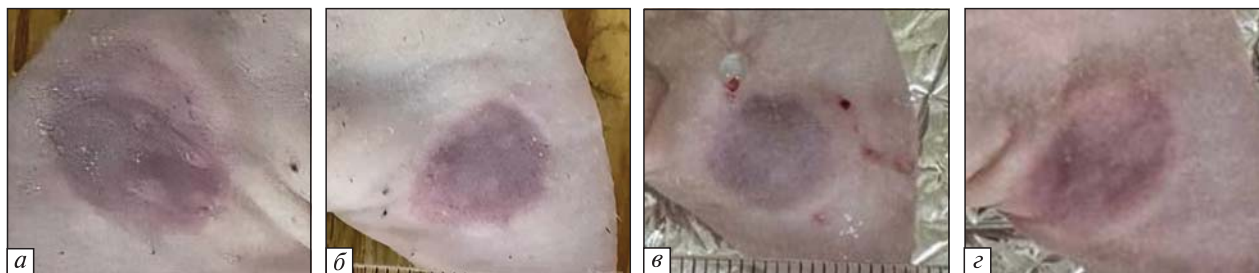


Рис. 8. Макроскопічне фото зони низькотемпературного ушкодження через 24 години після нанесення холодової травми: *а* — без введення будь-яких додаткових розчинів (група 2.1), *б* — введення ВмГК з ДМСО (група 2.2), *в* — введення ВмГК (група 2.3), *г* — введення НмГК (група 2.4)

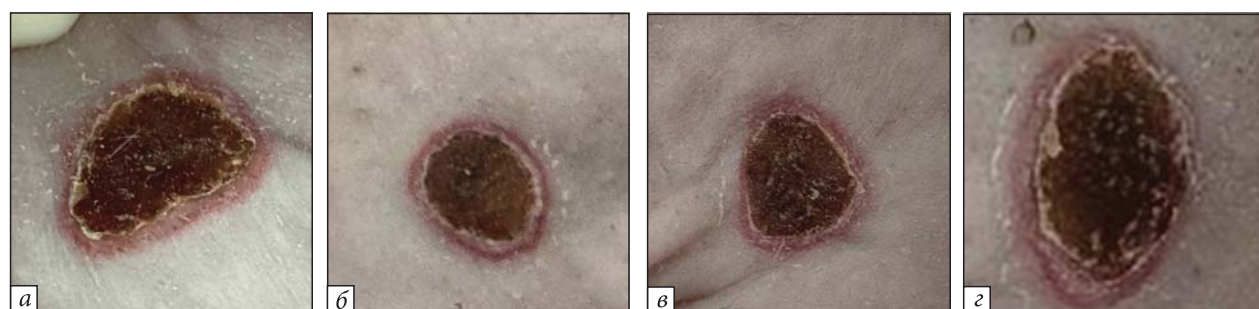


Рис. 9. Макроскопічне фото зони низькотемпературного ушкодження на 7-му добу спостереження: *а* — без введення будь-яких додаткових розчинів, *б* — введення ВмГК із ДМСО (група 2.2), *в* — введення ВмГК (група 2.3), *г* — введення НмГК (група 2.4)

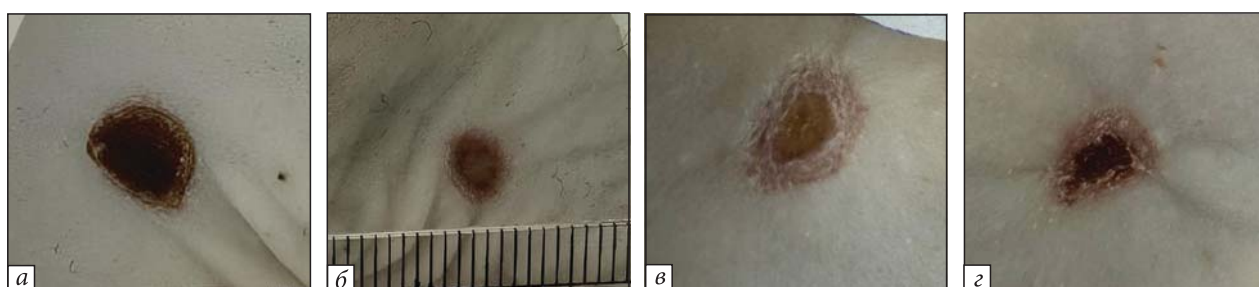


Рис. 10. Макроскопічне фото зони низькотемпературного ушкодження на 14-ту добу спостереження: *а* — без введення будь-яких додаткових розчинів (група 2.1), *б* — введення ВмГК із ДМСО (група 2.2), *в* — введення ВмГК (група 2.3), *г* — введення НмГК (група 2.4)

ження будь-яких морфологічних ознак токсичного або іншого негативного впливу підшкірного введення 1%-вого розчину ВмГК з додаванням 5 % ДМСО на тканини не виявлено.

Результати першого етапу стали підставою для перевірки припущення щодо протизапальної дії ГК у моделі низькотемпературного ушкодження тканин.

Другий етап дослідження. Вивчали вплив криозахисних розчинів, що містили ВмГК з 5 % ДМСО, ВмГК або НмГК, на розвиток запального процесу після низькотемпературного ушкодження тканин.

Насамперед оцінювали вплив 1%-вого розчину ВмГК з 5 % ДМСО на розвиток запально-

го процесу за даними клінічного спостереження. Додатково порівнювали вплив 1%-вих розчинів ВмГК та НмГК на запальний процес після низькотемпературного ушкодження тканин.

При пошкодженні шкіри відбуваються складні взаємодії між різними типами клітин шкіри, периферичними нервовими клітинами, а також імунними та судинними клітинами [5].

Відомо, що фаза запалення починається одразу після травмування тканини. Вона характеризується типовими судинними реакціями в зоні ушкодження: спершу відбувається вазоконстрикція, за нею — вазодилатація, вихід формених елементів крові в уражену зону (на рис. 8 видно крововиливи), випадання фібрину

та інфільтрація навколишніх тканин клітинними елементами запалення з чітким відмежуванням зони ушкодження. Процеси регенерації починаються з формування фібринової матриці та фібронектину. Уже впродовж перших 10 годин після пошкодження починається синтез колагену, який стає основною структурною складовою матриці ран і надає міцності рубцю, що утворюється. Максимальна продукція колагену спостерігається на 5—7 добу, після чого її рівень поступово знижується. До 3-ї доби з'являються фібробласти, які стають домінуючим типом клітин у цій фазі. Виділені макрофагами цитокіни одночасно стимулюють проліферацію судин, що забезпечує фібробластам кисень і поживні речовини, прискорює ріст клітин та підтримує синтез матриці рани.

На рис. 8, а показано зовнішній вигляд зони низькотемпературного ушкодження без введення розчинів (група 2.1 — контроль) через 24 години після нанесення холодової травми.

У цей термін на шкірі спостерігалася зона ушкодження з вираженим набряком та ішемією тканин. Шкіра в центрі ушкодження набувала синьо-фіолетового кольору, втрачала еластичність і ставала щільною. Периферична зона виглядала як блідий вінчик без чіткої межі з центральною ділянкою. Дані візуального спостереження свідчать про значні порушення мікроциркуляції в зоні низькотемпературного впливу на шкіру тварин, що підкреслює важливу роль судинних факторів у пошкодженні тканин низькими температурами.

На рис. 8, б представлено зону низькотемпературного ушкодження з підшкірним введенням 1%-вого ВмГК з 5 % ДМСО (група 2.2) через 24 години після травми. Підшкірні ін'єкції розчину після низькотемпературного впливу супроводжувалися зменшенням макроскопічних ознак набряку та ішемії тканин. За даними планіметричного дослідження, площа ран після введення розчину була меншою, ніж у контрольній групі, в 1,28 раза.

На 7-му добу зона ушкодження у контрольній групі мала вигляд рани з темно-коричневим струпом і піднятими краями (рис. 9, а). Периферична частина виглядала як темно-червоний вінчик із нерівномірним забарвленням, що пояснюється помірною гіперемією, дрібними осередками крововиливів та грануляційною тканиною, яка просвічує крізь новоутворений епітелій. Навколо рани спостерігався помірний

набряк та десквамація епітелію. Отже, за результатами візуальної оцінки можна стверджувати про наявність запального та репаративних процесів у тканинах по периферії рани.

Введення досліджуваного розчину позитивно впливало на загоєння ран: зменшувалася гіперемія, крововиливи та набряк (рис. 9, б). Площа ран була у 1,34 раза меншою, ніж у контрольній групі (група 2.1).

На 14-ту добу у контрольній групі, як і на попередній термін спостереження, рана залишалася покритою струпом із піднятими краями (рис. 10, а), місцеві ознаки запального процесу на периферії були менш виражені (ніж на 7-му добу), проте зберігалася десквамація поверхнього епітелію.

На рис. 11 наведені дані планіметрії, що порівнюють стан ранової поверхні групи 2.2 (ВмГК + ДМСО) із контролем (група 2.1). Площа ран на 1 та 7-му доби становила: для групи 2.1 — $(91 \pm 3,4)$ мм² та $(71 \pm 5,1)$ мм², для групи 2.2 — $(63 \pm 5,8)$ мм² та $(47 \pm 3,2)$ мм² відповідно.

На рис. 12 наведено планіметрію для груп 2.3 (ВмГК) і 2.4 (НмГК). Площа ран на 1-шу та 7-му доби: для групи 2.3 — $(73 \pm 4,3)$ мм² та $(45 \pm 4,6)$ мм², для групи 2.4 — $(82 \pm 4,9)$ мм² та $(55 \pm 3,7)$ мм² відповідно.

Згідно з візуальною оцінкою та даними планіметрії розчини ВмГК та ВмГК із ДМСО пригнічували розвиток запалення на 1-шу та 7-му доби ефективніше, ніж НмГК. Відмінностей між ВмГК та ВмГК із ДМСО не зафіксовано.

Оскільки в роботі використовували безшерстих щурів, то епітелізація ран мала крайовий характер: епітеліальні клітини мігрували з країв рани в тканинний дефект, що можливе лише за умов очищення зони епітелізації від некротичних мас та заповнення грануляційною тканиною. Прискорення епітелізації ран після введення ВмГК із ДМСО свідчить про активацію репаративних процесів у зоні низькотемпературного ушкодження.

Ін'єкції ВмГК з ДМСО зменшували прояв запалення. Так, макроскопічних ознак гіперемії або набряку тканин навколо рани не спостерігалось, крововиливи були мінімальні, десквамація менш виражена, а активність крайової епітелізації більшою, ніж у контрольній групі 2.1. Результати планіметричного дослідження підтвердили наявність значущих відмінностей між показниками в обох досліджуваних групах

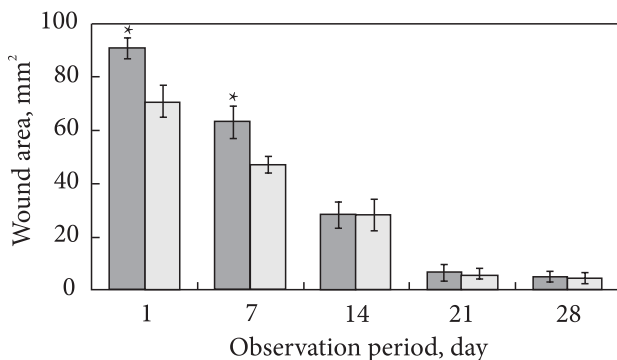


Рис. 11. Динаміка загоєння ран після низькотемпературного ушкодження тканин: ■ — група 2.1 (кріоаплікація); □ — група 2.2 (кріоаплікація + ВмГК + ДМСО); * — відмінності значущі відносно показників групи 2.1, $p < 0,05$

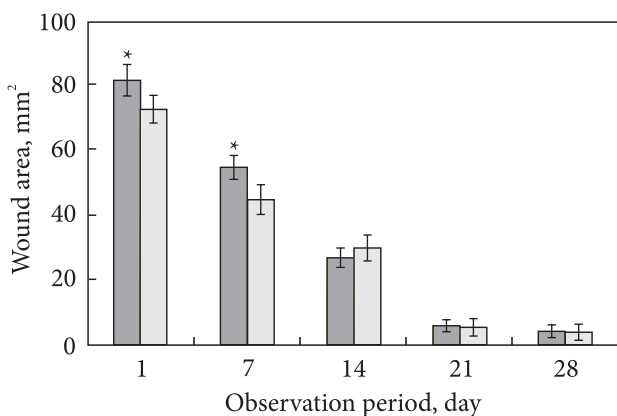


Рис. 12. Динаміка загоєння ран після низькотемпературного ушкодження тканин: ■ — група 2.4 (кріоаплікація + НмГК); □ — група 2.3 (кріоаплікація + ВмГК); * — відмінності значущі відносно показників групи 2.3, $p < 0,05$

на 1-шу та 7-му доби (див. рис. 11). Вплив ВмГК із ДМСО на площу ран на 14-ту, 21-шу та 28-му добу не виявлено, що потребує подальшого вивчення. Це, ймовірно, пов'язано з патогенетичними особливостями ранового процесу після низькотемпературного ушкодження і можуть бути пояснені впливом ВмГК на таку важливу патогенетичну ланку запалення як набряк. Відомо, що саме у першій фазі (запалення) ранового процесу стрімко розвивається набряк тканин у ділянці низькотемпературного ушкодження. Вплив ВмГК, на думку авторів, реалізу-

ється через зв'язування значної кількості рідини запального ексудату, що сприяло зниженню активності запалення у травмованих тканинах. Патогенетична спрямованість такого впливу реалізується шляхом зменшення ефекту судинних факторів пошкоджувальної дії низькотемпературного впливу на біологічні тканини.

З точки зору фармакологічних характеристик складових, кріозахисний розчин ВмГК з ДМСО має протизапальні та антисептичні властивості при місцевому застосуванні, що підтверджено експериментально. Отримані результати підтверджують перспективність використання кріозахисних розчинів з вмістом ВмГК та ДМСО у кріобіології.

Подальші дослідження можуть бути спрямовані на оптимізацію співвідношення ГК і ДМСО з метою створення кріозахисних розчинів, які не потребують відмивання перед застосуванням.

ВИСНОВКИ

1. За даними гістологічного дослідження встановлено, що підшкірне введення кріозахисного розчину, що складався з 1%-вого розчину ВмГК з 5 % ДМСО, не викликає негативного впливу на структуру тканин у інтактних тварин та не порушує перебіг ранового процесу, спричиненого низькотемпературним ушкодженням шкіри.

2. Клінічне спостереження показало, що підшкірні ін'єкції 1%-вого розчину ВмГК з 5 % ДМСО у ділянку холод-індукованого ушкодження сприяли, швидшому відновленню тканин, що проявлялося зменшенням площі рани та покращенням загальних ознак репарації.

3. Порівняння впливу кріозахисних розчинів (1 % ВмГК, 1 % НмГК або 1 % ВмГК з 5 % ДМСО) на перебіг ранового процесу після низькотемпературного ушкодження показало значущі відмінності між групами: на 1-шу та 7-му добу площа ран у тварин, яким вводили розчини з ВмГК і ВмГК з 5 % ДМСО, була меншою порівняно з групою, що отримувала розчин із НмГК. Значущих відмінностей між групами з ВмГК та ВмГК із 5 % ДМСО не виявлено.

ЛІТЕРАТУРА

1. Варенюк ІМ, Держинський МЕ. Методи цито-гістологічної діагностики: навчальний посібник. Київ: Інтерсервіс; 2019. 256 с.
2. Antoszewska M, Sokolewicz EM, Barańska-Rybak W. Wide use of hyaluronic acid in the process of wound healing — a rapid review. Sci Pharm [Internet]. 2024 Apr 25 [cited 2025 Oct 29]; 92(2): 23. Available from: <https://www.mdpi.com/2218-0532/92/2/23>

3. Aryanfar E, Ghoncheh M, Afshar M, et al. Enhancing wound healing with synthetic hyaluronic acid injection in sutured incisions on BALB/c mice. *Folia Med (Plovdiv)* [Internet]. 2025 Feb 24 [cited 2025 Oct 13]; 67(1): e130272. Available from: <https://foliamedica.bg/article/130272/>
4. Asadpour R, Aminirad M, Rahbar M, et al. Effects of hyaluronic acid on sperm parameters, mitochondrial function and apoptosis of spermatozoa in Simmental bulls with good and poor freezing ability. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*. 2024; 108(2): 383—94.
5. Babenko NM, Litvinova OB, Pavlov S, et al. Problems of healing chronic wounds. *Modern medical technology*. 2023; (3): 66—70.
6. Bennett B, Hanotiaux J, Pasala AR, et al. Impact of lower concentrations of dimethyl sulfoxide on cryopreservation of autologous hematopoietic stem cells: a systematic review and meta-analysis of controlled clinical studies. *Cytotherapy*. 2024; 26(5): 482—9.
7. Brunton LL, Knollmann BC, editors. *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. New York: Mc Graw Hill; 2023. 1645 p.
8. Chistyakov DV, Astakhova AA, Azbukina NV, et al. High and low molecular weight hyaluronic acid differentially influences oxylipins synthesis in course of neuroinflammation. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2019 Aug 9 [cited 2025 Oct 6]; 20(16): 3894. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/16/3894>
9. Chylińska N, Maciejczyk M. Hyaluronic acid and skin: its role in aging and wound-healing processes. *Gels* [Internet]. 2025 Apr 9 [cited 2025 Sep 4]; 11(4): 281. Available from: <https://www.mdpi.com/2310-2861/11/4/281>
10. Fraser JR, Laurent TC, Laurent UB. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *J Intern Med*. 1997; 242(1): 27—33.
11. Galvez-Martin P, Soto-Fernandez C, Romero-Rueda J, et al. A novel hyaluronic acid matrix ingredient with regenerative, anti-aging and antioxidant capacity. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2023 Mar 1 [cited 2025 Sep 4]; 24(5): 4774. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/24/5/4774>
12. Gurina TM, Nardid EO, Selyuta AA, et al. Sterilization and low temperature effects on regenerative potential of hyaluronic acid. *Probl Cryobiol Criomed*. 2025; 35(2): 68—75.
13. Gurruchaga H, Saenz Del Burgo L, Orive G, et al. Low molecular-weight hyaluronan as a cryoprotectant for the storage of microencapsulated cells. *Int J Pharm*. 2018; 548(1): 206—16.
14. Hu L, Nomura S, Sato Y, et al. Anti-inflammatory effects of differential molecular weight hyaluronic acids on UVB-induced calprotectin-mediated keratinocyte inflammation. *J Dermatol Sci*. 2022; 107(1): 24—31.
15. Joshi K, Mazumder B, Chattopadhyay P, et al. Exploring the frostbite healing potential of hyaluronic acid based hydrogel of Manuka honey through in-silico antithrombotic and anti-platelet studies of major phytoconstituents and in-vivo evaluation in Wistar rat model. *Drug Dev Ind Pharm*. 2021; 47(8): 1326—34.
16. Kant V, Jangir BL, Kumar V. Gross and histopathological effects of dimethyl sulfoxide on wound healing in rats. *Wound Medicine* [Internet]. 2020 Jun 30 [cited 2025 Oct 29]; 30: 100194. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S2213909520300185>
17. Ke C, Sun L, Qiao D, et al. Antioxidant activity of low molecular weight hyaluronic acid. *Food Chem Toxicol*. 2011; 49(10): 2670—5.
18. Khaeruddin K, Wahjuningsih S, Ciptadi G, et al. Cryopreservation of Gaga' chicken semen from South Sulawesi, Indonesia with the addition of L-carnitine, hyaluronic acid, sucrose and their combination in diluent. *Biodiversitas*. 2022; 23(6): 3297—302.
19. Khetan S, Corey O. Maintenance of stem cell viability and differentiation potential following cryopreservation within 3-dimensional hyaluronic acid hydrogels. *Cryobiology*. 2019; 90: 83—8.
20. Klbik I, Čechová K, Matko I, et al. On crystallization of water confined in liposomes and cryoprotective action of DMSO. *RSC Adv*. 2022; 12(4): 2300—9.
21. Lee BM, Park SJ, Noh I, Kim CH. The effects of the molecular weights of hyaluronic acid on the immune responses. *Biomater Res* [Internet]. 2021 Aug 30 [cited 2025 Oct 6]; 25(1): 27. Available from: <https://spj.science.org/doi/10.1186/s40824-021-00228-4>
22. Lin M, Cao H, Li J. Control strategies of ice nucleation, growth, and recrystallization for cryopreservation. *Acta Biomater*. 2023; 155: 35—56.
23. Liu X, Hu Y, Pan Y, et al. Exploring the application and mechanism of sodium hyaluronate in cryopreservation of red blood cells. *Mater Today Bio* [Internet]. 2021 Nov 10 [cited 2025 Oct. 29]; 12: 100156. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2590006421000648>
24. Lotfi S, Mehri M, Sharafi M, Masoudi R. Hyaluronic acid improves frozen-thawed sperm quality and fertility potential in rooster. *Anim Reprod Sci*. 2017; 184: 204—10.
25. Mero A, Campisi M. Hyaluronic acid bioconjugates for the delivery of bioactive molecules. *Polymers*. 2014; 6(2): 346—69.

26. Miao T, Wang J, Zeng Y, et al. Polysaccharide-based controlled release systems for therapeutics delivery and tissue engineering: from bench to bedside. *Adv Sci (Weinh)* [Internet]. 2018 Jan 8 [cited 2025 Oct 6]; 5(4): 1700513. Available from: <https://advanced.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/advs.201700513>
27. Muramatsu H, Muramatsu T. Analysis of glycoprotein-bound carbohydrates from pluripotent embryonal carcinoma cells by pokeweed agglutinin-agarose. *J Biochem.* 1990; 107(4): 629—34.
28. Partyka A, Łukaszewicz E, Niżański W. Effect of cryopreservation on sperm parameters, lipid peroxidation and antioxidant enzymes activity in fowl semen. *Theriogenology.* 2012; 77(8): 1497—504.
29. Pilbauerova N, Schmidt J, Soukup T, et al. Innovative approach in the cryogenic freezing medium for mesenchymal stem cells. *biomolecules* [Internet]. 2022 Apr 20 [cited 2025 Sep 23]; 12(5): 610. Available from: <https://www.mdpi.com/2218-273X/12/5/610>
30. Qian L, Yu S, Zhou Y. Protective effect of hyaluronic acid on cryopreserved boar sperm. *Int J Biol Macromol.* 2016; 87: 287—9.
31. Rayahin JE, Buhrman JS, Zhang Y, et al. High and low molecular weight hyaluronic acid differentially influence macrophage activation. *ACS Biomater Sci Eng.* 2015; 1(7): 481—93.
32. Rimac V, Bojanić I, Dabelić S, Čepulić BG. The impact of cryoprotectant exposure time on post-thaw viability of autologous and allogeneic hematopoietic stem cells and leukocyte subpopulations. *Acta Pharm.* 2023; 73(4): 655—72.
33. Silva APR, da Silva JC, Campos RMB, de Abreu AM. The use of Hyaluronic Acid for wound healing: integrative literature review. *RSD* [Internet]. 2022 Apr 17 [cited 2025 Oct. 29]; 11(5): e58711528581. Available from: <https://rsdjournal.org/rsd/article/view/28581>
34. Singh A, Li P, Beachley V, McDonnell P, Elisseeff JH. A hyaluronic acid-binding contact lens with enhanced water retention. *Cont Lens Anterior Eye.* 2015; 38(2): 79—84.
35. Snetkov P, Zakharova K, Morozkina S, et al. Hyaluronic acid: the influence of molecular weight on structural, physical, physico-chemical, and degradable properties of biopolymer. *Polymers (Basel)* [Internet]. 2020 Aug 11 [cited 2025 Sep 24]; 12(8): 1800. Available from: <https://www.mdpi.com/2073-4360/12/8/1800>
36. Ujihira M, Iwama A, Aoki M, et al. Cryoprotective effect of low-molecular-weight hyaluronan on human dermal fibroblast monolayers. *Cryo Letters.* 2010; 31(2): 101—11.

Отримано 26.09.2025

Прийнято до друку 20.11.2025

T.M. Gurina¹, G.O. Kovalov¹, H.L. Poliakova^{1*}, O.V. Naumova², V.D. Markovsky², A.A. Seliuta¹

¹ Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

² Kharkiv National Medical University, Kharkiv, Ukraine

*poliakova79ann@gmail.com

ASSESSMENT OF HYALURONIC ACID AND DMSO INFLUENCE ON LOW-TEMPERATURE TISSUE DAMAGE COURSE: AN EXPERIMENTAL MODEL

The research performed a local histological assessment of tissue tolerance of a solution containing hyaluronic acid, as well as its effect on the course of the inflammatory process after low-temperature skin damage was investigated. The safety of using a 1% solution of high molecular weight hyaluronic acid with the addition of 5% dimethyl sulfoxide (DMSO) and its effect on the inflammation development was studied using a model of low-temperature tissue injury based on the results of clinical observation, planimetric and histological studies. Additionally, the effect of 1% solutions of high molecular weight (> 2,000 kDa) and low molecular weight (10—100 kDa) hyaluronic acid on the inflammatory process after low-temperature tissue injury was comparatively explored. According to the results of the histological study, no morphological signs of toxic or other negative effects of subcutaneous administration of a 1% solution of high molecular weight hyaluronic acid with the addition of 5% DMSO on tissues were found. Comparison of the effects of cryoprotective solutions on the course of the wound process after low-temperature tissue damage revealed the differences both by the severity of macroscopic signs of the inflammation and by planimetric study data. The inclusion of hyaluronic acid in the composition of the cryoprotective solution is considered a optimistic approach to reducing the concentration of DMSO in order to create solutions that can be used without a washing-out stage.

Key words: hyaluronic acid, cryoprotective solution, low-temperature tissue damage, skin, wounds, cryoprotectant, cryopreservation.