

Міністерство освіти і науки України
Київський національний університет імені Тараса Шевченка

АМІРІ ГОРЗОДДІНІ АРЕФЕХ

УДК 577.1:616-001.4-085.33:615.03.032

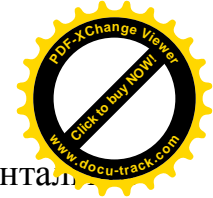
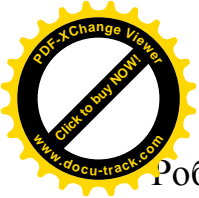
**МЕХАНІЗМ ДЕРМАТОТРОПНОЇ ДІЇ НАНОКРИСТАЛІЧНОГО
ДІОКСИДУ ЦЕРІЮ**

03.00.04 – біохімія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2019



Роботу виконано на кафедрі біохімії та НДЛ «Фармакології і експериментальної патології» Навчально-наукового центру «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка МОН України

Науковий керівник: доктор медичних наук, старший науковий співробітник
Верещака Володимир Валентинович,
Старший науковий співробітник
НДЛ «Фармакології та експериментальної патології»
Навчально-наукового центру «Інститут біології та медицини» Київський національний університет імені Тараса Шевченка

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, професор
Кучмеровська Тамара Муратівна,
Інститут біохімії ім.О.В. Палладіна НАН України,
провідний науковий співробітник відділу біохімії вітамінів та коензимів

доктор медичних наук, професор
Непорада Каріне Степанівна,
Українська медична стоматологічна академія,
завідувач кафедри біоорганічної та біологічної хімії

Захист відбудеться «16» грудня 2019 року о 16:00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.001.24 Київського національного університету імені Тараса Шевченка за адресою: м Київ, проспект Академіка Глушкова, 2, ННЦ «Інститут біології та медицини», ауд.434

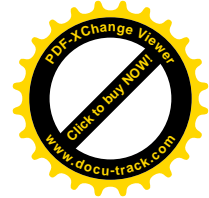
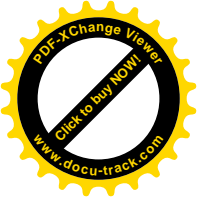
Поштова адреса: 01601, м. Київ, вул. Володимирська, 64/13, Київський національний університет імені Тараса Шевченка ННЦ «Інститут біології та медицини», спеціалізована вчена рада Д 26.001.24

З дисертацією можна ознайомитись у Науковій бібліотеці ім. М. Максимовича Київського національного університету імені Тараса Шевченка за адресою: м.Київ, вул. Володимирська, 58, зал №12

Автореферат розісланий «14» листопада 2019 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради Д 26.001.24

Н.Г. Ракша



ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Щороку в результаті травм, які призводять до цілісності шкіри, слизових оболонок та інших тканин, більше 5 мільйонів людей помирають. Це близько 9% смертей у світі, майже в 1,7 рази більше, ніж кількість смертельних випадків, спричинених ВІЛ / СНІДом, туберкульозом та малярією.

На сьогодні лікування ранового процесу є не лише медичною проблемою, так як із зростанням вартості лікування воно має суттєвий економічний вплив на систему охорони здоров'я всіх країн [Mohanty V. et al., 2017]. У той час як однією з актуальних проблем сучасної фармакології є створення нових ранозагоювальних засобів з протизапальними, антимікробними, репаративними властивостями, не менш актуальною проблемою біохімії є з'ясування механізмів перебігу ранового процесу. Тому сьогодні зусилля вчених різних країн спрямовані на розробку нових дерматотропних препаратів у лікарських формах для лікування ран різного генезу. Більше того, такі дерматотропні препарати не тільки повинні забезпечувати загоєння ран у всіх фазах ранового процесу, але і не бути токсичними для всього організму.

На сьогодні нанокристалічний діоксид церію (CeO_2) включений міжнародними експертами в перелік десяти пріоритетних наноматеріалів для досліджень з метою його використання в промисловості та медицині [Щербаков С., 2016]. За даними літератури, для CeO_2 притаманна окислювально-відновна властивість, так як він здатний змінювати ступінь окислення Ce між Ce^{3+} і Ce^{4+} в залежності від парціального тиску кисню. Доведено, що він проявляє супероксиддисмутазну активність [Tarnuzzer R. et al., 2005; Korsvik C. et al., 2007; Heckert E. et al., 2008; Karakoti A. et al., 2009] та каталазоподібну активність [Pirmohamed B. et al., 2010]. Нанокристалічний діоксид церію здатний захищати клітини від окислювального стресу, викликаного гідропероксидом як екзогенного, так і ендогенного походження [Иванов Д., 2013]. Здатність нанокристалічного діоксиду церію виконувати ензимподібні функції, регенеративні, антиоксидантні та антирадикальні властивості відкривають перспективу для профілактики та лікування різних патологічних процесів, пов'язаних, насамперед, з окислювальним стресом та запаленням [Celardo I. et al., 2011; Das S. et al., 2013; Caputo N. et al., 2017; Moridi H. et al., 2018; Louro R. et al., 2019; Kobylak M. et al., 2019]. Все це послугувало основою для створення нами українського дерматотропного препарату на основі нанокристалічного діоксиду церію та дослідження механізмів його дерматотропної дії на моделі повношарової вирізаної площинної рани у щурів.

Зв'язок роботи з науковими планами, темами. Дисертаційна робота виконана відповідно до плану наукових досліджень Київського національного університету імені Тараса Шевченка і є фрагментом наукової теми Навчально-наукового центру (ННЦ) «Інститут біології та медицини»: “Доклінічні дослідження токсичності меланіну - субстанції для нових лікарських препаратів та ефективності дерматотропних препаратів на основі наночастинок” (№ д/р 0116U004828, 2016-2017pp.).

Тема дисертації затверджена Вченою радою ННЦ «Інститут біології медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка, протокол № 5 від 14 листопада 2016 року.

Мета і задачі дослідження. Метою роботи було дослідити механізми дерматотропної дії фармакологічної композиції на основі нанокристалічного діоксиду церію (НДЦ) на моделі повношарової вирізаної площинної рани у щурів.

Відповідно до мети були поставлені такі задачі:

1. Дослідити тривалість загоєння та визначити площу повношарових вирізаних площинних ран в процесі самозагоєння та після застосування фармакологічної композиції на основі НДЦ.

2. Дослідити антибактеріальні властивості фармакологічної композиції на основі НДЦ з використанням тест-культур *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis* і дріжджів *Candida albicans*.

3. Дослідити фізико-хімічні властивості шкіри у щурів після повного загоєння повношарових вирізаних площинних ран у щурів без та з застосуванням фармакологічної композиції на основі НДЦ.

4. Дослідити вплив фармакологічної композиції на основі НДЦ на рівень С-реактивного білка та концентрацію молекул середньої маси в сироватці крові щурів.

5. Визначити інтенсивність перекисного окислення ліпідів за вмістом дієнових кон'югатів, ТБК-активних продуктів, шифових основ в сироватці крові та оцінити стан антиоксидантної системи за активністю супероксиддисмутази та каталази, а також визначити вміст SH-груп та окисно-модифікованих білків в сироватці крові у щурів в процесі самозагоєння ран та після застосування фармакологічної композиції на основі НДЦ.

6. Визначити вміст факторів росту (VEGF, NGF), металопротеїназ (MMP-2, MMP-9) та гіпоксія-індуцибельного фактору 1α (HIF 1α) в гомогенаті ранового ложа після самозагоєння та після застосування фармакологічної композиції на основі НДЦ.

Об'єкт дослідження: біохімічні механізми ушкоджень та загоєння шкіри після застосування фармакологічної композиції на основі НДЦ на моделі повношарових вирізаних площинних ран.

Предмет дослідження: показники біохімічних процесів і фізико-хімічні властивості шкіри в умовах експериментальної моделі повношарових площинних вирізаних ран та їх корекції за допомогою фармакологічної композиції на основі нанокристалічного діоксиду церію.

Методи дослідження: спектрофотометричні (вміст продуктів перекисного окислення ліпідів, активність ферментів антиоксидантного захисту, вміст молекул середньої маси, вміст окисно-модифікованих білків), турбідиметричний (визначення концентрації С-реактивного білка), флуоресцентний (визначення вмісту шифових основ), планіметричні (площа ран, швидкість загоєння), фізико-хімічні (вміст вологи і колагену в шкірі, вихід желатину з колагену, температура плавлення шкіри), мікробіологічні, імуноферментний метод ELISA (визначення в рановому субстраті вмісту факторів росту, металопротеїназ та гіпоксія-індуцибельного фактору), методи математичної статистики.

Наукова новизна одержаних результатів. Одержані результати розширюють

га доповнюють сучасні уявлення про зміни в рановому ложі та сировотці крошурів за умов експериментальної повношарової вирізаної площинної рани. Розкриті біохімічні механізми дерматотропної дії фармакологічної композиції, яка складається з 0,5% гелю карбополу, в якому розчинений нанокристалічний діоксид церію (0,05%). Вперше показано, що фармакологічна композиція на основі НДЦ зменшує площу уражень в II і III фазі ранового процесу. За дії композиції тривалість повного закриття ранового ложа була на 13,0% ($p < 0,05$) меншою і загоєння відбувалося без утворення грубого рубця, що підтверджено зменшенням вмісту колагену, виплавленої желатини та температури зварювання шкіри після епітеліалізації ранового ложа у порівнянні з щурами, у яких відбувалось самозагоєння ран.

Вперше встановлено, що фармакологічна композиція на основі НДЦ справляє бактерицидний ефект на тест-культури *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* і *Pseudomonas aeruginosa* та фунгістатичний ефект на тест-культуру дріжджів *Candida albicans*, що є важливим для використання композиції у профілактиці вторинного інфікування та лікуванні інфекційних запальних процесів у ділянці ранової поверхні. Доведено, що фармакологічна композиція на основі НДЦ справляє позитивний (пригнічуючий) вплив на показники запального процесу (концентрація С-реактивного білка) та ендогенної інтоксикації (концентрація молекул середньої маси) в сироватці крові щурів, які були суттєво збільшеними у щурів з повношаровими вирізаними площинними ранами. Доведена антиоксидантна та антирадикальна дія гелю карбополу з НДЦ. Вперше досліджено вплив НДЦ на вміст металопротеїназ (MMP-2 і MMP-9), факторів росту (VEGF і NGF) та гіпоксія-індуцибельного фактору HIF1 α .

Практичне значення одержаних результатів. Отримані результати доводять ефективність запропонованої фармакологічної композиції (гель карбополу з нанокристалічним діоксидом церію) у запобіганні інфікування та у лікуванні повношарових вирізаних площинних ран у щурів. Одержані результати слугують підґрунтям для подальших доклінічних і клінічних досліджень з метою реєстрації нового дерматотропного препарату.

Результати роботи можуть бути впроваджені в навчальний процес для студентів біологічних факультетів.

Особистий внесок здобувача. Автор особисто виконав весь обсяг експериментальних досліджень, самостійно підібрав і проаналізував літературу за темою дисертації. Планування напрямків досліджень, розробка методичних підходів, обговорення та аналіз одержаних результатів проведено за участі наукового керівника. Моделювання ранового процесу на щурах, щоденний догляд за тваринами, обробка ран проведені разом із співавторами публікацій. Автор висловлює глибоку вдячність колегам за допомогу в проведенні досліджень, співучасть яких у виконанні роботи відмічена у спільних публікаціях.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертації доповідались та обговорювались на Міжнародній науково-практичній конференції «Актуальні питання медицини і біології» (Полтава, Україна, 2017); XVI Міжнародній науковій конференції студентів та молодих вчених «Шевченківська весна: досягнення біологічної науки» (Київ, Україна, 2018); Буковинському

Міжнародному медичному конгресі (ВІМСО) (Чернівці, Україна, 2018); конференції «Теоретичні і практичні аспекти використання біологічних маркерів в фундаментальній і прикладній медицині та біології» (Прага, Чеська Республіка, 2018).

Публікації. За результатами досліджень опубліковано 9 наукових праць: 5 статей (3 статті у фахових наукових виданнях України, 2 статті у закордонних виданнях, включених до міжнародних наукометричних баз) та 4 тез у матеріалах міжнародних конференцій.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, методів досліджень, 4-х розділів з викладом отриманих результатів, розділу присвяченому аналізу і узагальненню результатів, практичних рекомендацій, висновків, списку використаних літературних джерел, який включає 296 посилань. Матеріали дисертаційної роботи викладені на 135 сторінках та ілюстровані 28 рисунками і 2 таблицями.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали і методи досліджень

Дослідження проведені на 220 білих лабораторних щурах-самцях, масою 200-250 г, які утримувались в акредитованому віварії ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка.

Всі оперативні втручання виконували під загальною анестезією з використанням тіопенталу натрію (BiochemieGmbH, Австрія) у дозі 60 мг/кг маси тварин. Упродовж всього експерименту тварин утримували в індивідуальних клітках. Щури рандомізовано були поділені на 4 групи: I – інтактні щури (щури без рани); II - контрольна група щурів з моделюванням повношарової вирізаної площинної рани без лікування; III - група щурів з моделюванням повношарової вирізаної площинної рани, у яких уражену ділянку обробляли 0,5% розчином карбополу ((універсальний розчинник для надання гелеподібної консистенції ("Carbopol 980")); IV - експериментальна група щурів з моделюванням повношарової вирізаної площинної рани, у яких уражену ділянку обробляли нанокристалічним діоксидом церію в концентрації 0,05%, розчиненому в 0,5% розчині карбополу. Повношарові вирізання площинні рани виконувались на поголеній спинній ділянці шкіри. Для цього шкіру розрізали (1 × 1 см) за допомогою хірургічного скальпеля та пінцету. Лікування починалося відразу після нанесення рани і до повного загоєння. З кожної групи щурів на 3-й, 6-й, 9-й, 14-й день та в день повного закриття рани відбирали тварин для отримання зразків сироватки крові і шкіри.

Ранові поверхні шкіри фотографували цифровою фотокамерою (Nikon-D3100, Японія), зображення відцифровували, калібрували та вимірювали площу ранового пошкодження за допомогою програми ImageJ (NIH, USA). Результати виражали у відсотках від початкової площі [Васильєва Л., 2009].

Для дослідження антибактеріальних властивостей фармакологічної композиції на основі нанокристалічного діоксиду церію використовували метод аплікації речовини на поверхню поживного середовища, в якості якого ми використали Nutrientagar, виробництва (Sigma-Aldrich, Іспанія). Попередньо поверхня

середовища була покрита суспензією тестових мікроорганізмів відповідно рекомендацій Міністерства охорони здоров'я України № 167 від 05.04.2007 р. «Визначення чутливості мікроорганізмів до антибіотиків». Кількість колонієутворюючих одиниць (КУО) визначали на денситометрі «Vitek-2» (BioMerieux, Франція). Кількість КУО мікроорганізмів в суспензії складала до $1,5 \times 10^8$ КУО/мл (що відповідає до 0,5 McFarland) для бактерій і $1-5 \times 10^6$ КУО/мл для дріжджів. Були використані колекції бактерій *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus epidermidis* 509/5, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 і дріжджів *Candida albicans*. Досліджено ефект факрмакологічної композиції на основі НДЦ на культури цих мікроорганізмів.

Визначення загального вмісту азоту проводили за методом К'ельдаля [Okhmat O., et al., 2006].

Вихід з колагену желатини визначали методом гідротермічного зварювання шкіри [Okhmat O., 2006, Vereshchaka V., 2007]. Відсоток вологи в зразках шкіри визначали за різницею маси до і після висушування до постійної маси при 80 °С у сушильній шафі СНОЛ 3,5.3.5.3.5./И1. Температуру зварювання шкіри визначали за допомогою приладу ПТЗ-1 відповідно до методу [Vereshchaka V., 2007].

Вміст молекул середньої маси в сироватці крові визначали методом Габрієлян з модифікаціями [Gabrielyan N.I., et al, 1985]. Концентрацію С-реактивного білка в сироватці крові визначали турбідиметричним методом [Долгов В.В. і співавт., 2007]. Визначення вмісту продуктів окислення білків проводили за методом Дубініної [Дубинина Е. и соавт., 1995].

Вміст дієнових кон'югатів визначали в гептан-ізопропанольному екстракті спектрофотометричним методом, а шиффових основ – флуориметричним методом [Гаврилов В.Б., 1988; Зимон А.Д., 1995]. Вміст ТБК-активних сполук визначали за реакцією з тіобарбітуровою кислотою [Стальная И. Д., 1977].

Активність супероксиддисмутази визначали за Чеварі [Чевари С. и соавт., 1985]. Активність каталази визначали за Королюк [Королюк М.А. и соавт., 1988].

Загальний білок визначали за методом Бредфорд [Bradford M.M., 1976].

Вміст загальних, білок-зв'язаних та небілкових сульфгідрильних (SH)-груп вимірювали за методом Елмана [Ellman G.L., 1959].

Вміст факторів росту (VEGF, NGF), металопротеїназ (MMP-2, MMP-9) та гіпоксія-індуцибельного фактору-1 α в рановому субстраті визначали методом імуноферментного аналізу, який виконували згідно стандартного протоколу з певними модифікаціями [Crowther J.R., 2001].

Статистичний аналіз одержаних даних проводили з використанням пакету програм "Statistica 8.0". Тип розподілення даних визначали за допомогою тесту Шапіро-Вілка. Так як результати підлягали нормальному розподілу, ANOVA тест з поправкою Бонфероні був використаний для визначення достовірності різниці між виборками, яка вважалася статистично значущою при $p \leq 0,05$. В кожній групі обчислювали середнє значення (M) та стандартне відхилення (SD).

Результати досліджень та їх обговорення

Ранозагоюючий ефект фармакологічної композиції на основі НДЦ досліджували за аналізом активності контракції поверхні рани на 3, 6, 9, 14 та 20-ту добу. Як видно з рисунку 1, що у I фазу ранового процесу (фаза запалення) НДЦ не впливав на загоєння повношарових вирізаних площинних ран. Проте у II (фаза регенерації, утворення та дозрівання грануляційної тканини) та III (фаза утворення та реорганізації рубця) фази ранового процесу фармакологічна композиція на основі НДЦ прискорював загоєння повношарових площинних вирізаних ран, що було підтверджено визначенням їх площі.



Рис. 1. Повношарова вирізана площинна рана в динаміці гоєння у щурів контрольної та експериментальної груп:

1 – контрольна група щурів, у яких загоєння відбувалось самостійно без лікування;

2 – експериментальна група щурів, у яких рани щоденно обробляли композицією (нанокристалічний діоксид церію в концентрації 0,05%, розчинений в 0,5% розчині карбополу).

Так, було встановлено, що на 6-й, 9-й та 14-й доби досліді площа ранового процесу зменшувалась відповідно на 20,1% ($p < 0,05$), 37,5% ($p < 0,05$) і 34,0% ($p < 0,05$) у порівнянні з контрольною групою щурів, в якій відбувалось самозагоєння. Характер ранового ложа у тварин контрольної групи упродовж експерименту був значно гіршим, ніж у тварин, у яких рани обробляли НДЦ. В експериментальній групі кірка, що вкривала рану, на 6-й день була тоншою і зникла на 9-й день, а в контрольній групі кірка була товщою і зникла лише на 20-й. Повне закриття рани у тварин контрольної групи відбувалось за $23,0 \pm 0,8$ доби з утворенням грубого рубця. В дослідній групі щурів, у яких рани обробляли НДЦ, тривалість загоєння зменшилася на 13,0% ($p < 0,05$) порівняно з контролем і становила $20,0 \pm 0,5$ доби. При цьому загоєння відбувалось без утворення грубого рубця.

Отже, досліджувана композиція, володіє ранозагоювальною і протизапальною дією.

Так як ранове ложе у щурів експериментальної групи очищалося швидше та беручи до уваги дані літератури про антивірусну дію нанокристалічного діоксиду

церію [Dixit E. et al, 2009, Жолобак Н. і співавт., 2010; Zholobak N. et al, 2010]. Припустили, що НДЦ володіє і антибактеріальною дією. Для перевірки даного припущення ми дослідили біоцидний ефект гелю карбополу з нанокристалічним діоксидом церію. Даний ефект ми перевіряли на тест-культурах бактерій *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* і *Pseudomonas aeruginosa* (рис. 2). Виявлено, що нанокристалічний діоксид церію пригнічував їх ріст. У тест-культурі дріжджів *Candida albicans* нанокристалічний діоксид церію проявляв лише фунгістатичний ефект.

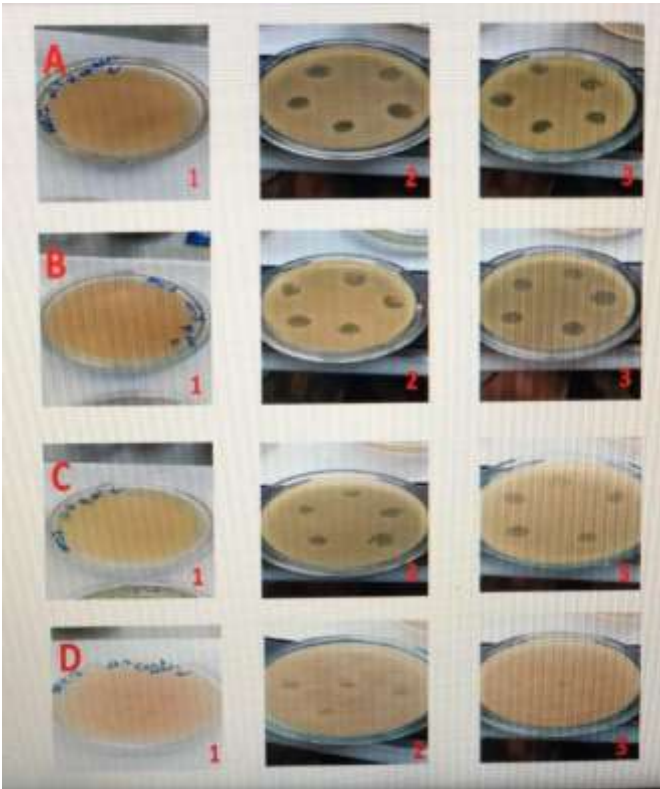


Рис. 2. Бактерицидна дія фармакологічної композиції на основі НДЦ на тест-культури *Staphylococcus epidermidis* (A), *Staphylococcus aureus* (B), *Pseudomonas aeruginosa* (C), *Candida albicans* yeasts (D):

для А, В, С: 1 – контроль, 2 – зони пригнічення росту в місцях нанесення гелю НДЦ

через 24 години культивування (зворотна сторона чашки Петрі). Густина суспензії $1,5 \times 10^8$ КУО/мл, 3 - зони пригнічення росту через 72 години культивування (зворотна сторона чашки Петрі);

для D: 1 – контроль, 2 – зони пригнічення росту через 24 години культивування, 3 - зони пригнічення росту через 72 години культивування (зворотна сторона чашки Петрі). Густина суспензії $1,5 \times 10^6$ КУО/мл.

Таким чином, одним із механізмів можливої дерматотропної дії нанокристалічного діоксиду церію може бути його антибактеріальна дія, що запобігає інфікуванню ран.

В наступній серії досліджень ми вивчали фізико-хімічні властивості шкіри в ділянці ранового ложа після повної епітелізації (табл. 1). Вміст вологи в шкірі інтактних щурів становив 62,6%. У щурів, у яких моделювали повношарові вирізані площинні рани, в гомогенаті ранового ложа в день повного закриття рани вміст вологи зменшувався на 42,7%. Щоденна обробка рани гелем карбополу або гелем карбополу з нанокристалічним діоксидом церію не впливала на вміст вологи в рановому ложі після епітелізації у порівнянні з контролем.

Вміст колагену в гомогенаті ранового ложа щурів, у яких рани загоювались без лікування, вміст колагену збільшувався на 55,6% у порівнянні з тваринами інтактної групи, що підтверджує утворення рубця. Застосування гелю карбополу з нанокристалічним діоксидом церію при лікуванні шкірної рани призвело до

зниження вмісту колагену до рівня інтактних тварин без ран. Очевидно, це м^б бути одним із механізмів гоєння ранової поверхні без утворення рубця.

У контрольній групі тварин вихід желатину шкіри збільшувався на 92,6% ($p < 0,001$) у порівнянні з таким у інтактних щурів.

Таблиця 1

Фізико-хімічні властивості шкіри в ділянці ранового ложа після повної ре-епітелізації повношарових вирізаних площинних ран у тварин із самозагоєнням та у тварин із застосуванням фармакологічної композиції на основі нанокристалічного діоксиду церію

Групи тварин	Вміст вологи, %	Вміст колагену, %	Виפלв- лення желатину, %	Температура зварювання шкіри, °C
Інтактні тварини	62,6±7,1	37,6±3,8	2,7± 0,6	63,5±8,1
Контроль (рани без лікування)	35,9±4,1*	58,5±6,1*	5,2±0,8***	83,9±8,1*
Тварини з ранами, які обробляли карбополом	37,2 ±41**	45,6±5,1*	3,9±0,1*	81,1±6,9*
Тварини з ранами, які обробляли гелем карбополу з нанокристалічним діоксидом церію	42,1±4,1*	38,2±2,9#	3,1±0,1##	67,1± 5,9#

*- $p < 0,05$, ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,001$ у порівнянні з інтактними тваринами;

- $p < 0,05$, ## - $p < 0,01$ порівняно з групою тварин з повношаровими вирізаними площинними ранами без лікування.

Щоденна обробка ран гелем карбополу з нанокристалічним діоксидом церію зменшувала вихід желатини до рівня інтактного контролю.

У щурів контрольної групи в ділянці бувшої ранової поверхні температура зварювання шкіри збільшувалася на 32,1%. Після щоденної обробки ран гелем карбополу з нанокристалічним діоксидом церію температура зварювання шкіри в ділянці бувшої ранової поверхні знижувалася до рівня інтактного контролю.

Одержані результати узгоджуються з даними інших авторів, які встановили зменшення вмісту вологи, збільшення вмісту колагену у шкірних покривах та температури зварювання шкіри при рановому процесі різного генезу [Табурець О., 2017] та при хронічних дерматозах [Mavrova I., 2009].

Таким чином, фармакологічна композиція на основі нанокристалічного діоксиду церію суттєво покращувала фізико-хімічні властивості шкіри.

Досліджуючи процес загоєння повношарових вирізаных площинних ран, зробили припущення про протизапальну дію гелю карбополу з нанокристалічним діоксидом церію. Проте, для підтвердження необхідно було визначити показники, що характеризують протікання запального процесу у щурів під час моделювання повношарової вирізаногої площинної рани.

С-реактивний білок називають білком гострої фази запалення, концентрація якого в крові зростає під час інфікування або запалення. У щурів контрольної групи на 3-ю, 6-у, 9-у, 14-у і 20-у добу після моделювання повношарової вирізаногої площинної рани показано суттєве збільшення концентрації С-реактивного білку у сироватці крові (рис. 3). А саме: концентрації С-реактивного білку у сироватці крові на 3-ю добу зростала в 8,3 рази, на 6-у добу – в 9,5 рази, на 9-у добу – в 4,1 рази, на 14-у добу – в 3,5 та на 20-у добу – в 1,9 рази. В III групі тварин, у яких рани щоденно обробляли гелем карбополу з нанокристалічним діоксидом церію, концентрація С-реактивного білку у сироватці крові статистично достовірно не відрізнялася від контролю. На 6-у добу у щурів III групи концентрація С-реактивного білку у сироватці крові була в 1,7 рази нижчою у порівнянні з контролем.

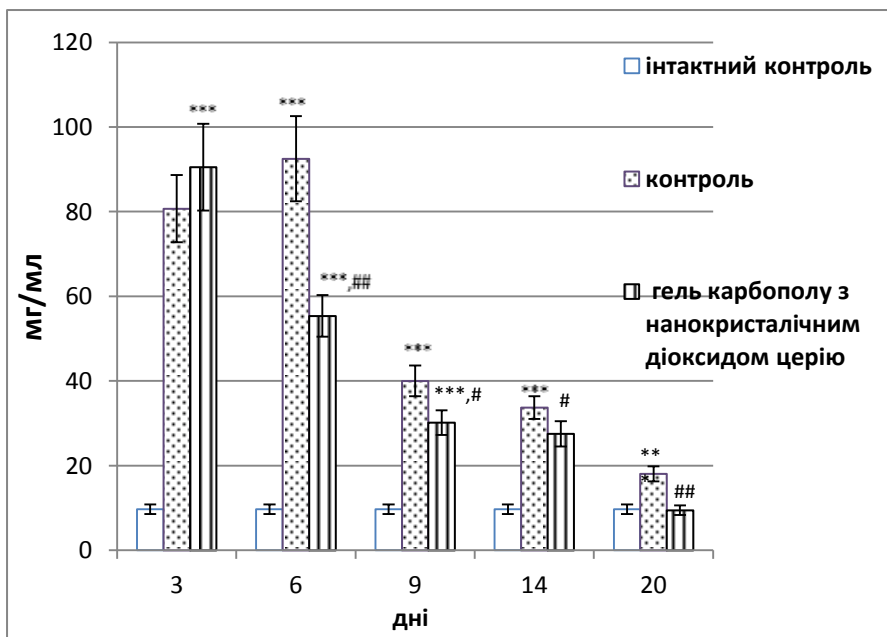


Рис. 3. Концентрація С-реактивного білка у сироватці крові щурів за умов моделювання повношарових вирізаных площинних ран у щурів: *** - $p < 0,001$ у порівнянні з інтактними тваринами; # - $p < 0,05$, ## - $p < 0,01$ порівняно з групою тварин з повношаровими вирізанними площинними ранами без лікування.

На 9-у і 14-у добу концентрація С-реактивного білку у сироватці крові була відповідно в 1,3 рази і в 1,2 рази нижчою у порівнянні з контролем. На 20-у добу, добу повного закриття рани, після моделювання повношарової вирізаногої площинної рани даний показник відновлювався до рівня інтактного контролю. Хоча у щурів контрольної групи він залишався збільшеним в 1,9 рази, а рана поверхня закривалась на 3 дні пізніше.

Визначення рівня молекул середньої маси в сироватці крові широко застосовується в клінічній практиці як показник ендогенної інтоксикації. Тому дана серія досліджень була присвячена оцінці впливу нанокристалічного діоксиду церію на рівень молекул середньої маси в сироватці крові у щурів після моделювання повношарової вирізаногої площинної рани (рис. 4). Було показано, що рівень молекул

середньої маси в сироватці крові у інтактних щурів був надзвичайно низьким і складав $0,12 \pm 0,01$ ум.од./мг білка. Рівень маркера ендогенної інтоксикації в сироватці крові у щурів контрольної групи, у яких рани нічим не обробляли, зростав на 3-ю добу в 8,0 разів, на 6-у добу – в 8,8 разів, на 9-у добу – у 5,9 рази, на 14-у добу – у 4,8 рази і на 20-у добу, добу повного епітелізації рани, – у 2,9 рази. У щурів, у яких рани обробляли гелем карбополу з нанокристалічним діоксидом церію, рівень молекул середньої маси в сироватці крові суттєво зменшувався кожної доби експерименту. Так, у порівнянні з контролем, він на 3-ю, 6-у, 9-у та 14-у добу був відповідно меншим у 1,3 рази, 1,9 рази, 1,4 рази і в 4,1 рази. Слід зазначити, що на 14-у добу рівень молекул середньої маси в сироватці крові в даній групі щурів статистично достовірно не відрізнявся від інтактного контролю.

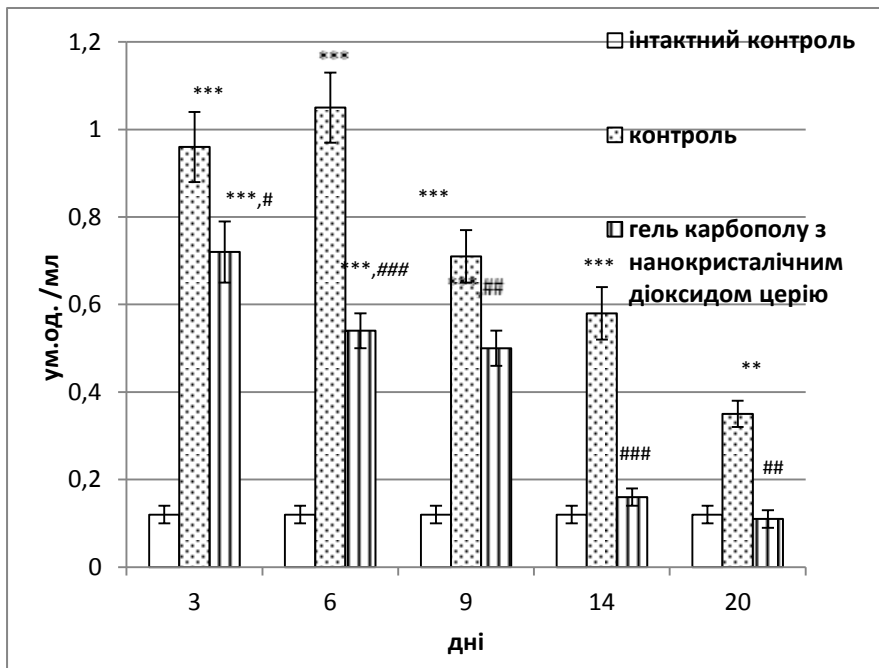
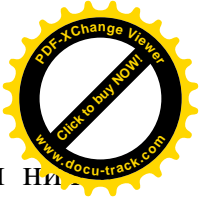
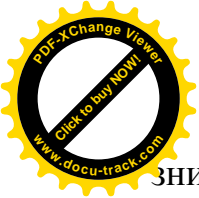


Рис. 4. Концентрація молекул середньої маси у сироватці крові щурів за умов моделювання повношарових вирізаних площинних ран у щурів: ** - $p < 0,01$, *** - $p < 0,001$ у порівнянні з інтактними тваринами; # - $p < 0,05$, ## - $p < 0,01$ порівняно з групою тварин з повношаровими вирізаними площинними ранами без лікування.

Зроблено висновок, що гель карбополу з нанокристалічним діоксидом церію зменшує рівень ендогенної інтоксикації у щурів з повношаровими вирізаними площинними ранами. Це може бути пов'язано як з меншим інфікуванням рани, так і меншим запальним процесом на тлі його дії.

Переокисне окислення ліпідів (ПОЛ) є неспецифічним, але значущим показником запального процесу в організмі. Нами показано, що у щурів з повношаровими вирізаними площинними ранами вміст продуктів ПОЛ у сироватці крові зростає. Так, вміст дієнових кон'югатів збільшувався: на 3-ю добу – в 1,5 рази, на 6-у добу – в 1,6 рази (рис. 5). На 20-у добу рівень первинних продуктів ПОЛ знижувався до рівня інтактного контролю. Вміст дієнових кон'югатів у сироватці крові щурів з експериментальною раною при дії карбополу змінювався подібно до групи тварин з повношаровими вирізаними площинними ранами. При використанні гелю карбополу з нанокристалічним діоксидом церію вміст дієнових кон'югатів у сироватці крові на 3-ю добу був таким же, як і в контрольній групі. Проте, на 6-у добу він знижувався в 1,3 рази відносно контролю, хоча і не досягав рівня інтактного контролю. На 20-у добу рівень первинних продуктів ПОЛ продовжував



знижуватися і був у 2,1 рази нижче відповідного контролю та в 1,7 рази нижче інтактного контролю.

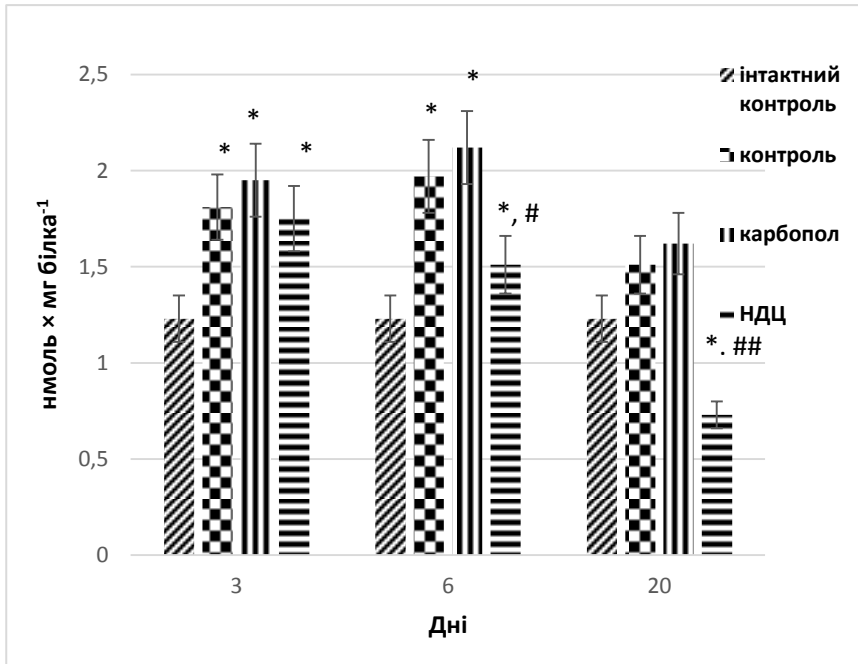


Рис.5. Вміст дієнових кон'югатів у сироватці крові щурів за умов моделювання повношарових вирізаних площинних ран у щурів. * - $p < 0,05$ у порівнянні з інтактними тваринами; # - $p < 0,05$ ## - $p < 0,01$ порівняно з групою тварин з повношаровими вирізаними площинними ранами без лікування.

У щурів після моделювання повношарових вирізаних площинних ран вміст ТБК-активних продуктів у сироватці крові зростав на 3-ю добу – в 2,1 рази, на 6-у добу – в 3 рази та на 20-у добу рівень – в 1,3 рази відносно інтактного контролю (рис. 6). Вміст ТБК-активних сполук у сироватці крові щурів з експериментальною раною при дії карбополу змінювався подібно до групи тварин з повношаровими вирізаними площинними ранами.

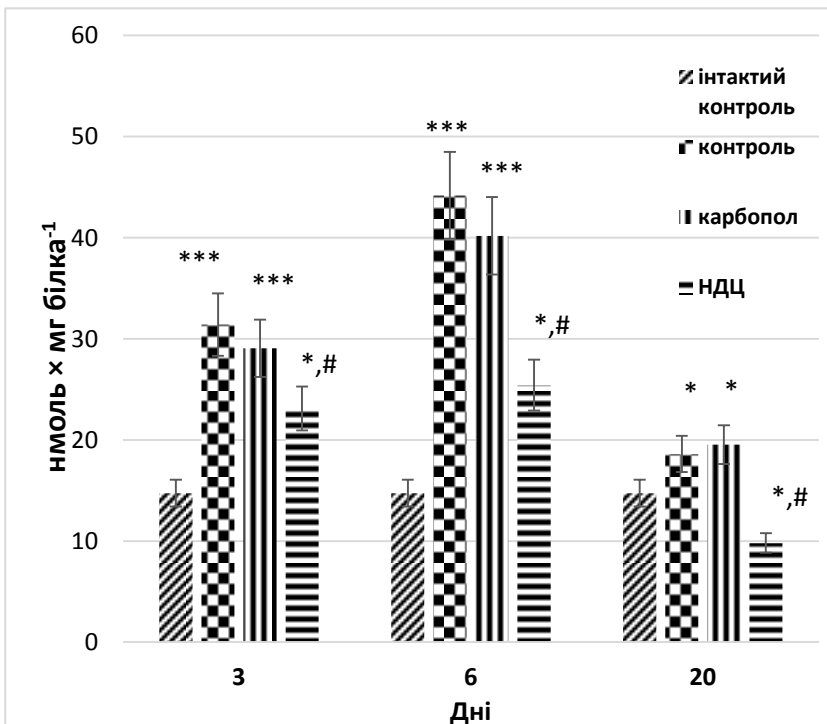


Рис.6. Вміст ТБК-активних продуктів у сироватці крові щурів за умов моделювання повношарових вирізаних площинних ран у щурів. * - $p < 0,05$, **** - $p < 0,001$ у порівнянні з інтактними тваринами; # - $p < 0,05$ порівняно з групою тварин з повношаровими вирізаними площинними ранами без лікування.

У тварин, у яких рани обробляли гелем карбополу з нанокристалічним діоксидом церію, вміст ТБК-активних продуктів у сироватці крові знижувався на 3-ю добу в 1,4 рази та 6-у добу в 1,7 рази відносно контролю. На 20-у добу після моделювання ран їх вміст різко знижувався та був нижче у 1,5 рази у порівнянні з інтактним контролем.

У щурів після моделювання повношарових вирізаних площинних ран у сироватці крові вміст шиффових основ збільшувався: на 3-ю добу в 1,5 рази, на 6-у добу – в 1,8 рази та на 20-у добу – в 1,3 рази порівняно з інтактним контролем (рис. 7). За дії карбополу рівень шиффових основ у сироватці крові щурів з експериментальною раною змінювався подібно до групи тварин з повношаровими вирізаними площинними ранами. При застосуванні гелю карбополу з нанокристалічним діоксидом церію у сироватці крові щурів з повношаровими вирізаними площинними ранами рівень шиффових основ знижувався на 3-ю добу в 1,2 рази та 6-у добу в 1,4 рази відносно контролю, а на 20-у добу їх вміст був навіть нижче, ніж в інтактних тварин в 1,7 рази.

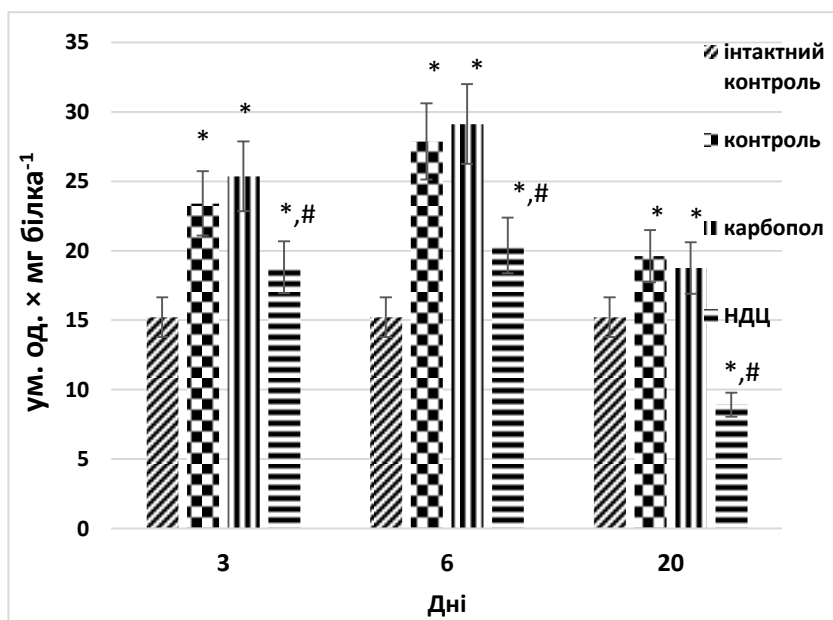


Рис.7. Вміст шиффових основ у сироватці крові щурів за умов моделювання повношарових вирізаних площинних ран у щурів:
* - $p < 0,05$ у порівнянні з інтактними тваринами;
- $p < 0,05$ порівняно з групою тварин з повношаровими вирізаними площинними ранами без лікування.

Інтенсифікація процесів ПОЛ у сироватці крові щурів з повношаровими вирізаними площинними ранами супроводжувалась зміною активності ферментів першої лінії захисту клітин від активних форм кисню: супероксиддисмутазна активність знижувалася на 3-ю добу – в 9,1 рази, на 6-у добу – в 6,6 рази та на 20-у добу – в 6,1 рази відносно інтактного контролю (рис. 8). При цьому каталазна активність зростала на 3-ю добу – в 2,9 рази, на 6-у добу – в 3,3 рази та на 20-у добу – в 1,2 рази порівняно з групою інтактних тварин. Активність антирадикальних ферментів у сироватці крові щурів з експериментальною раною за дії гелю карбополу з нанокристалічним діоксидом церію змінювалась подібно до групи тварин з повношаровими вирізаними площинними ранами.

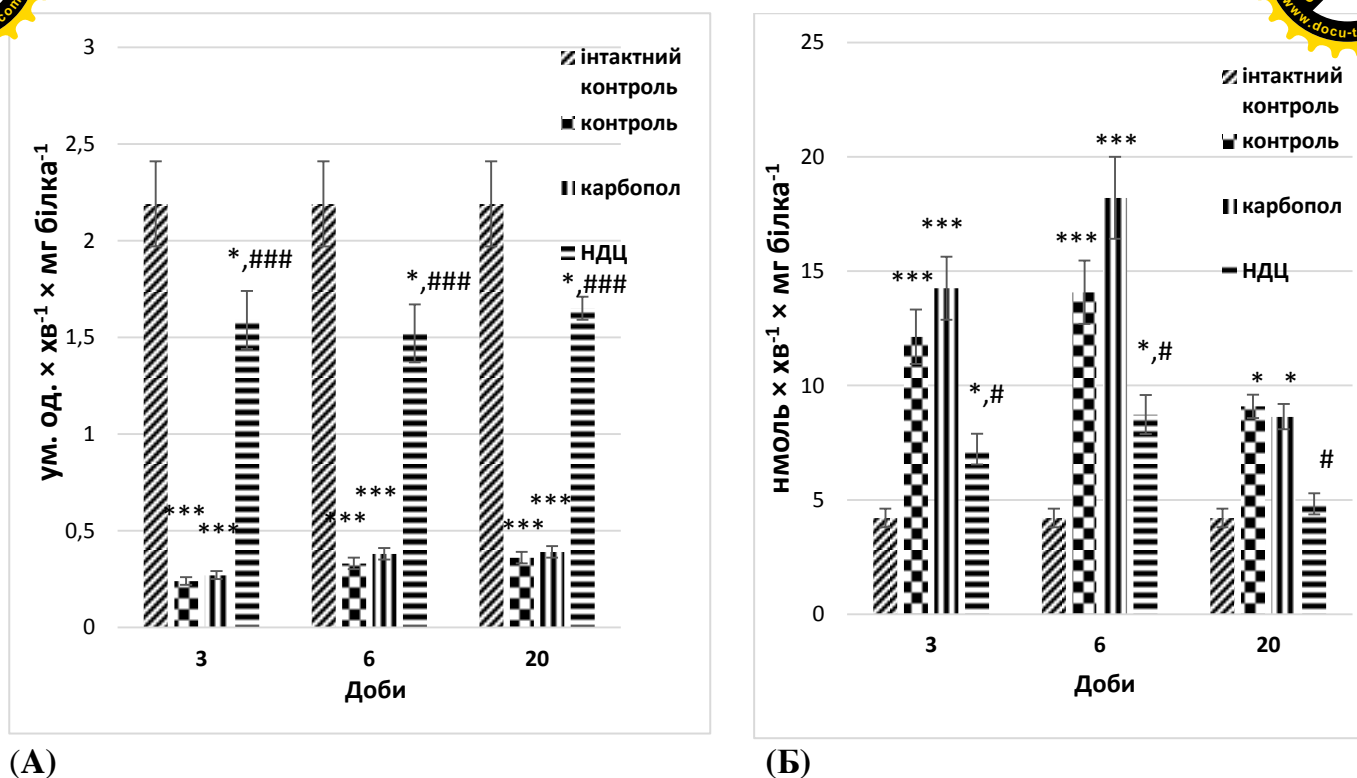


Рис.8. Супероксиддисмутазна (А) та каталазна (Б) активність у сироватці крові щурів за умов моделювання повношарових вирізаних площинних ран у щурів:

* - $p < 0,05$ у порівнянні з інтактними тваринами;

- $p < 0,01$ порівняно з групою тварин з повношаровими вирізаними площинними ранами без лікування.

При застосуванні гелю карбополу з нанокристалічним діоксидом церію супероксиддисмутазна активність зростала на 3-ю добу – в 6,6 рази, на 6-у добу – в 4,6 рази та на 20-у добу – в 4,6 рази відносно контролю. Проте рівня інтактного контролю вона не досягала навіть на 20-у добу. Що стосується каталазної активності, то в даній групі щурів вона знижувалась на 3-ю добу – в 1,7 рази, на 6-у добу – в 1,6 рази відносно контролю, а на 20-у добу каталазна активність відновлювалася до рівня інтактного контролю.

Таким чином, за дії гелю карбополу з нанокристалічним діоксидом церію про-/антиоксидантна рівновага в сироватці крові щурів з повношаровими вирізаними площинними ранами суттєво відновлювалася.

У тварин з повношаровими вирізаними площинними ранами у сироватці крові спостерігається зниження рівня білкових і небілкових сульфгідрильних груп відносно групи інтактних тварин, що свідчить про їх пошкодження вільними радикалами (рис. 9). Так, вміст небілкових SH-груп знижувався на 3-ю добу – в 1,8 рази, на 6-у добу – в 1,9 рази та на 20-у добу – в 1,4 рази. При цьому вміст білкових SH-груп зменшувався на 3-ю добу – в 1,3 рази, на 6-у добу – в 1,6 рази та на 20-у добу – в 1,4 рази. Вміст загальних SH-груп знижувався на 3-ю добу – в 1,3 рази, на 6-у добу – в 1,2 рази та на 20-у добу – в 1,4 рази. Подібні зміни вмісту сульфгідрильних груп виявлені у сироватці крові при дослідженні дії гелю карбополу.

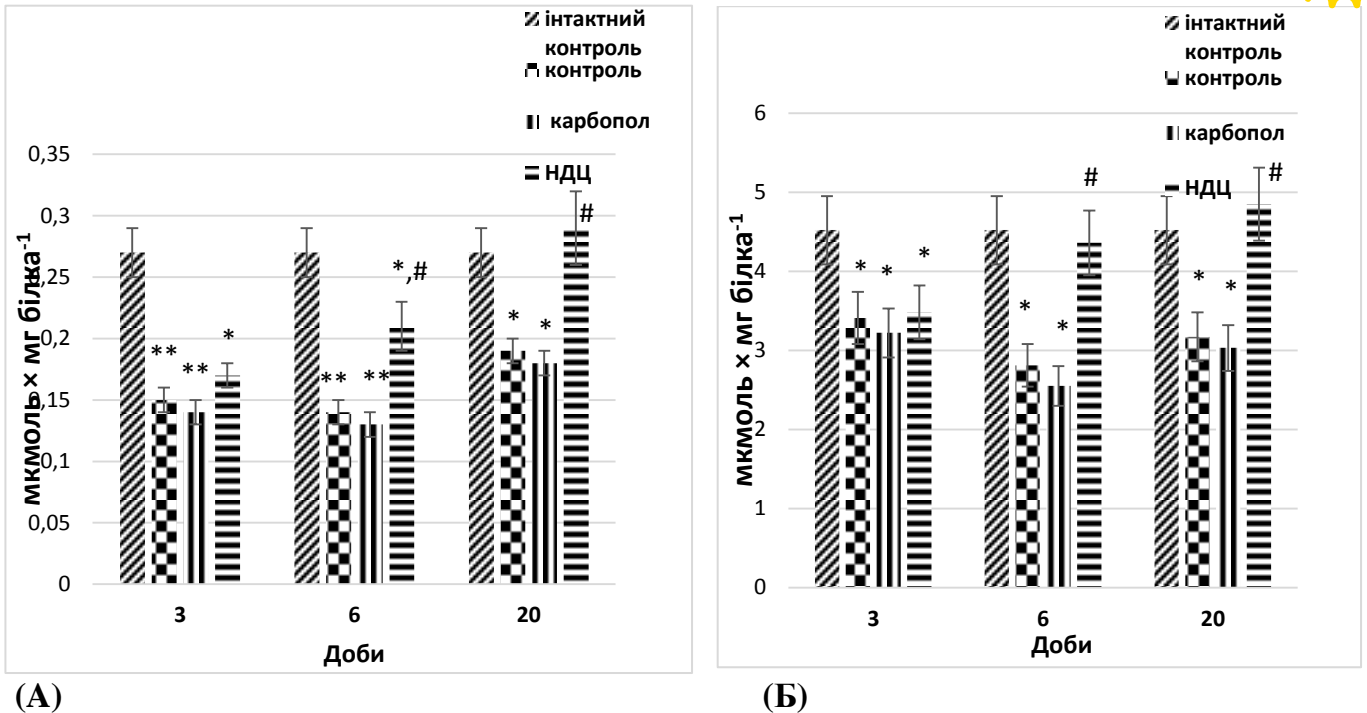


Рис.9. Рівень білкових (А) і небілкових (Б) сульфгідрильних груп у сироватці крові щурів за умов моделювання повношарових вирізаних площинних ран у щурів:

* - $p < 0,05$ у порівнянні з інтактними тваринами;

- $p < 0,01$ порівняно з групою тварин з повношаровими вирізаними площинними ранами без лікування.

Отримані результати свідчать, що у тварин з повношаровими вирізаними площинними ранами у сироватці крові зростає рівень вільних радикалів, а це призводить до виснаження рівня небілкових низькомолекулярних тіолів (цистеїну, глутатіону та ін.) та пригнічення активності тіолових ферментів за рахунок блокування їх сульфгідрильних груп (глутатіонпероксидази, глутатіонтрансферази, глутатіонредуктази). Зниження загальних, білкових та небілкових SH-груп за умов експериментальної площинної рани відображає загальний зсув редокс-балансу у прооксидантний бік. При застосуванні гелю карбополу з нанокристалічним діоксидом церію вміст небілкових SH-груп відновлювався до рівня інтактного контролю на 20-у добу після моделювання ран, вміст білкових SH-груп та вміст загальних SH-груп відновлювалися до рівня інтактного контролю на 6-у добу після моделювання ран.

Високі ранні рівні ММП-9 пов'язані з одночасно підвищеним рівнем колагенази, можливо, для полегшення епітелізації і деградацією денатурованого колагену. Тривале підвищення активності ММП-2 є, ймовірно, важливим для ремоделювання рубцевої тканини. Більш того, желатинази можуть бути індикаторами прогресування процесу загоєння рани. За нашими результатами, фармакологічна композиція на основі НДЦ представлена як потужний регулятор для обох желатиназ в процесі загоєння ран. Фармакологічна композиція на основі НДЦ показала відновлення вмісту HIF-1 α , що дозволяє регулювати транскрипційну активність сотень генів, які сприяють виживанню клітин в умовах гіпоксії. Крім того, виявляючи, що фармакологічна композиція на основі НДЦ має значний вплив

на VEGF і, отже, сприяє більш швидкому ангіогенезу, а також при відновленні нервової чутливості, що проявляється в зростанні NGF на ділянці рани можна зробити висновок про потенційність цієї дерматотропної композиції.

ВИСНОВКИ

Наведені в дисертаційній роботі результати поглиблюють існуючі погляди на загоєння повношарових вирізаних площинних ран шкіри та відкривають перспективи для майбутніх досліджень, що спрямовані на створення нових дерматотропних препаратів на основі наночастинок діоксиду церію, яким притиманні антиоксидатні властивості та здатність пришвидшувати загоєння без утворення грубого рубця

1. Фармакологічна композиція на основі нанокристалічного діоксиду церію, прискорює загоєння повношарових вирізаних площинних ран у щурів та сприяє реепітелізації без утворення грубого келоїдного рубця. У всі терміни спостереження за дією фармакологічної композиції площа ран була суттєво меншою, ніж у щурів контрольної групи без лікування.

2. У рановому ложі щурів з повношаровими вирізаними площинними ранами вміст VEGF, NGF, MMP-2 та HIF 1 α зростав після моделювання ранового процесу і не повертався до рівня інтактного контролю після повного закриття рани. Гель карбополу з нанокристалічним діоксидом церію справляв відновлюючу дію на досліджувані показники.

3. Моделювання повношарових вирізаних площинних ран у щурів супроводжувалось інтенсифікацією процесу ПОЛ і зміною активності антиоксидантних ензимів (супероксиддисмутази і каталази). У щурів даної групи виявлено зменшення вмісту білкових, небілкових і загальних сульфгідрильних груп та збільшення вмісту окисно-модифікованих білків в сироватці крові, що свідчить про збільшення вмісту вільних радикалів. Щоденна аплікація на ранове ложе гелю карбополу з нанокристалічним діоксидом церію відновлювало про-/антиоксидантний баланс в сироватці крові щурів, що проявлялось у зменшенні вмісту продуктів ПОЛ та нормалізації активності ферментів антиоксидантного захисту, а також відновлювався вміст усіх SH-груп та окисно-модифікованих білків до рівня контролю. Отже, один з механізмів дерматотропного впливу фармакологічної композиції на основі НДЦ полягає в його антиоксидантній та антирадикальній дії.

4. Концентрація С-реактивного білка та концентрація молекул середньої маси в сироватці крові щурів з повношаровими вирізаними площинними ранами були суттєво збільшеними на 3-ю, 6-ту, 9-ту, 14-ту і 20-ту доби після моделювання ран у порівнянні з інтактними щурами. Композиція на основі нанокристалічного діоксиду церію справляла позитивний ефект на вказані показники, що проявлялось у зменшенні концентрації С-реактивного білка та молекул середньої маси в сироватці крові на всіх термінах спостереження та їх відновленні до рівня інтактного контролю раніше, ніж в групі контролю. Одержані дані є доказом того, що лікування ран із застосуванням фармакологічної композиції на основі нанокристалічного

діоксиду церію зменшує процес запалення та ендогенну інтоксикацію у щурів повношаровими вирізними площинними ранами у щурів.

5. Фармакологічна композиція на основі нанокристалічного діоксиду церію справляє бактерицидний ефект на тест-культури *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* і *Pseudomonas aeruginosa* та фунгістатичний ефект на тест-культуру дріжджів *Candida albicans*, що є важливим для використання композиції у профілактиці вторинного інфікування та лікуванні інфекційних запальних процесів у ділянці ранової поверхні.

6. Після загоєння повношарових вирізнаних площинних ран у гомогенаті шкіри ранового ложа вміст вологи був низьким, проте вміст колагену, виплавленої желатини та температура плавлення шкіри у щурів були збільшеними. У щурів, у яких ранове ложе щоденно обробляли фармакологічною композицією, вміст вологи в шкірі зростав, проте, не відновлювався до рівня контролю, а вміст колагену, виплавленої желатини та температура плавлення шкіри поверталися до рівня інтактного контролю, що пояснює відсутність грубого колоїдного рубця на місці бувших повношарових вирізнаних площинних ран шкіри.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Arefeh Amiri, Nikitina NS, Stepanova LI, Berehovyi SM, Beregova TV, Spivak M Ya. Effect of Cerium Dioxide Nanocrystal (Nanoceria) On The Concentration of Some Growth Factors During the Wound Healing Process In Rat Model. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. 2019; 10(2): P. 1537-1555. *(Особистий внесок здобувача – пошук джерел літератури по обраній темі дослідження, планування експерименту, дослідження вмісту факторів росту в гомогенаті шкіри, аналіз отриманих результатів, підготовка матеріалів до друку).*
2. Arefeh Amiri, Nikitina NS., Stepanova LI., Beregova TV., Potential impact of Cerium Dioxide Nanoparticles (Nanoceria) on the concentration of C-reactive protein and Middle-mass molecules after wound treatment. ScienceRise: Біологічні науки. 2019; Т. 1: С. 14-19. *(Здобувачем особисто здійснено пошук джерел літератури по обраній темі дослідження, проведення експериментальної роботи, статистична обробка результатів та їх аналіз, підготовка матеріалів до друку).*
3. Arefeh Amiri, Radziminska O.V., Vereschaka V.V., Stepanova L.I., Beregova T.V. The influence of nanocrystalline cerium dioxide on physical and chemical properties of rat skin. Вісник проблем біології і медицини. 2019; Вип. 1, Том 2 (149): 2019, С. 108-111. *(Особистий внесок здобувача – пошук джерел літератури по обраній темі дослідження, планування експерименту, дослідження планіметричних показників шкіри аналіз отриманих результатів, підготовка матеріалів до друку).*
4. Arefeh Amiri, Beregova T., Nikitina N., Stepanova L. The influence of Cerium Dioxide Nanocrystal (Nanoceria) on full-thickness wound healing process. Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Проблеми регуляції фізіологічних функцій. 2018; Т. 1 (24): С. 6-11. *(Особистий внесок*

здобувача – пошук джерел літератури по обраній темі дослідження, планування експерименту, аналіз отриманих результатів).

5. Arefeh Amiri, Beregova TV, Nikitina NS, Stepanova LI, Vovk A, Kondratiuk TO, and Spivak M Ya. Cerium Dioxide Nanocrystal (Nanoceria): A Promising Pioneer Therapeutic Agent in Wound Healing Process. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. 2018; 9(4): P. 859-871. *(Здобувачем особисто здійснено пошук джерел літератури по обраній темі дослідження, планування та проведення експериментальної роботи, статистична обробка результатів та їх аналіз, підготовка матеріалів до друку).*
6. Arefeh Amiri, Beregova T., Kondratiuk T. Antimicrobial effect of Nanoceria in wound healing process. “Biological markers in fundamental and clinical medicine” Collection of abstracts. Prague, the Czech Republic, 2018; Vol. 2, N 1: P. 48-49.
7. Arefeh Amiri, Beregova T., Skochko N., Medvedieva N. The effect of cerium Dioxide on cut-wound healing. The Bukovinian International Medical Congress (BIMCO) 2018. Collection of abstract. Chernivtsi: 2018, P. 319.
8. Arefeh Amiri, Nikitina N., Vovk A., Nagorniak E., Riazhkova D., Beregova T. Potential impact of Cerium Dioxide nanocrystal(Nanoceria) on pro- and antioxidant system in blood serum of rats with full-thickness wounds. Biosciences Advance 2018 “XVI International Scientific Conference of Students Young Scientists”. Collection of abstract. Kiev: 2018, P. 113-114.
9. Amiri A., Medvedieva N., Taburets O., Nikitina N. Correction parameters of endogenous intoxication in experimental cut-wound International scientific and practical conference “Actual Questions of Medicine and Biology”. 30.05-1.06.17, Poltava-Ukraine – с. 5-6.

АНОТАЦІЯ

Амірігорзодіні Арефех. Механізм дерматотропної дії нанокристалічного діоксиду церію. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія. – Київський національний університет імені Тараса Шевченка МОН України, Київ, 2019.

Робота присвячена дослідженню біохімічних механізмів дерматотропної дії фармакологічної композиції, яка складається з нанокристалічного діоксиду церію (НДЦ) в концентрації 0,05%, розчиненого в 0,5% гелі карбополу, на моделі повношарової вирізаної площинної рани у щурів.

В результаті проведених досліджень встановлено, що за дії гелю карбополу з НДЦ на 6-ту, 9-ту та 14-ту доби досліду площа ранового процесу зменшувалась відповідно на 20,1% ($p < 0,05$), 37,5% ($p < 0,05$) і 34,0% ($p < 0,05$) у порівнянні з контролем. Повне закриття рани у тварин контрольної групи відбувалося за $23,0 \pm 0,8$ доби з утворенням грубого рубця. В дослідній групі щурів, у яких рани обробляли гелем карбополу з НДЦ, тривалість загоєння зменшилася на 13,0% ($p < 0,05$)

порівняно з контролем і загоєння відбувалося без утворення грубого рубця, підтверджено подальшим визначенням вмісту колагену та виплавленої желатини в рановому ложі. Показано, що фармакологічна композиція на основі НДЦ справляє бактерицидний ефект на тест-культури *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* і *Pseudomonas aeruginosa* та фунгістатичний ефект на тест-культуру дріжджевих грибів *Candida albicans*. Запропонована композиція справляла позитивний ефект на показники запального процесу (концентрація С-реактивного білка) та ендогенної інтоксикації (концентрація молекул середньої маси) в сироватці крові щурів, які були суттєво збільшеними у щурів з повношаровими вирізаними площинними ранами. Доведена антиоксидантна та антирадикальна дія гелю карбополу з НДЦ. В рановому ложі щурів з нелікованими ранами рівень VEGF, NGF, MMP-2, MMP-9 та HIF 1 α зростає. Застосування НДЦ дозволили з'ясувати роль желатиназу у процесі загоєння ран і справляло позитивний вплив на фактори росту (VEGF, NGF) та HIF 1 α .

Ключові слова: повношарова вирізана площинна рана, нанокристалічний діоксид церію, колаген, металопротеїнази, фактори росту.

АННОТАЦІЯ

Амиригорзодіні Арєфєх. Механізм дерматотропного діяння нанокристалічного діоксида церія. - Кваліфікаційний науковий труд на правах рукопису.

Дисертація на соискание ученої ступені кандидата біологічних наук по спеціальності 03.00.04 - біохімія. - Київський національний університет імені Тараса Шевченка МОН України, Київ, 2019.

Робота посвячена дослідженню механізмів дерматотропного діяння фармакологічної композиції на основі нанокристалічного діоксида церія (НДЦ) на моделі повношарової вирізаної площинної рани у щурів.

Установлено, що застосування фармакологічної композиції, складовою якою є 0,5% гелю карбополу, в якому розчинено НДЦ (0,05%), зменшувало площу поранення на 6-й, 9-й і 14-й день експерименту на 20,1% ($p < 0,05$), 37,5% ($p < 0,05$) і 34,0% ($p < 0,05$) відповідно, в порівнянні з контрольною групою щурів, у яких відбувалося самозаживлення. Якщо в експериментальній групі щурів повне закриття рани відбувалося через $23,0 \pm 0,8$ днів з утворенням грубого рубця, то в групі щурів з застосуванням гелю карбополу з НДЦ час повного заживлення зменшувався на 13,0% ($p < 0,05$) без утворення грубого рубця, що підтверджено подальшими дослідженнями по визначенню в рановому ложі вмісту колагену і виплавленої желатини. Показано, що фармакологічна композиція викликає бактерицидний ефект на тест-культури *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* і фунгістатичний ефект на тест-культуру дріжджевих грибів *Candida albicans*. Представлена композиція мала позитивний вплив на показники запального процесу (концентрація С-реактивного білка) і ендогенної інтоксикації (концентрація молекул середньої маси) в сироватці крові, які були суттєво збільшеними у щурів з ранами без лікування. Доведено антиоксидантний і антирадикальний ефект гелю

карбопола с НДЦ. В раневом ложе крыс с ранами без лечения уровень VEGF, MMP-2, MMP-9 и HIF 1 α возрастала. Применение НДЦ позволило выяснить роль желатиназы в процессе заживления ран и оказало положительное влияние на факторы роста (VEGF, NGF) и HIF 1 α .

Ключевые слова: полнослойная вырезанная плоскостная рана, нанокристаллический диоксид церия, коллаген, металлопротеиназы, факторы роста.

SUMMARY

Amirigorzoddini Arefeh. The mechanism of Dermatotropic Action of Nanocrystalline Cerium Dioxide. - Manuscript.

The thesis for candidate of biological sciences degree in special 03.00.04 - biochemistry. - Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ministry of Education and Science of Ukraine, Kyiv, 2019.

The work is devoted to the study of the biochemical mechanisms of the dermatotropic action of a pharmacological composition consisting of nanocrystalline cerium dioxide at a concentration of 0.05% dissolved in 0.5% carbopol gel on a model of a full-thickness excised plane wound in rats.

As a result of the studies, it was found that in phase I of the wound process (inflammation phase) the carbopol gel with nanocrystalline cerium dioxide did not affect the healing of full-thickness excised plane wounds. However, in the II phase (phase of regeneration, formation and maturation of granulation tissue) and III (phase of formation and reorganization of the scar) of the wound process, the composition accelerated the healing of full-thickness plane wounds, which was confirmed by the determination of their area in dynamics. Thus, it was found that on the 6th, 9th and 14th days of the experiment, the area of the wound process decreased by 20.1% ($p < 0.05$), 37.5% ($p < 0.05$) and 34.0% ($p < 0.05$) respectively, compared to the control group of rats in which self-healing occurred. The nature of the wound bed in the animals of the control group during the experiment was significantly worse than in the animals in which the wounds were treated with carbopol gel and nanocrystalline cerium dioxide. In the experimental group, the crust covering the wound on day 6 was thinner and disappeared on day 9 but in the control group the crust was thicker and disappeared only on day 20. Complete wound closure in the control group of animals occurred at 23.0 ± 0.8 days with the formation of a rough scar. In the experimental group of rats in which the wounds were treated with carbopol gel and nanocrystalline cerium dioxide, the healing time decreased by 13.0% ($p < 0.05$) compared to control group and was equal to 20.0 ± 0.5 days. In this case, the healing occurred without the formation of a rough scar.

The results obtained showed that the pharmacological composition based on nanocrystalline cerium dioxide exhibits a bactericidal effect on the test cultures of *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* and the fungistatic effect on the test culture of yeast fungi.

After the healing of full-thickness excised plane wounds in the skin bed homogenate, the moisture content was reduced, but the collagen content, gelatin melting, and skin melting temperature in rats were increased. In rats in which the wound bed was treated daily with nanocrystalline cerium-based pharmacological composition, the

moisture content of the skin increased, however, did not recover to the control level. The collagen content, gelatin melting, and skin melting temperature returned to the intact control level, which explains coarse keloid scar at the site of former full-thickness plane wounds of the skin.

The concentration of C-reactive protein and the level of middle-mass molecules in the blood serum of rats with full-thickness excised plane wounds were significantly increased on the 3rd, 6th, 9th, 14th and 20th days after wound modeling compared with intact rats. The composition based on nanocrystalline cerium dioxide had a positive effect on these indicators, which was manifested in a decrease in the concentration of C-reactive protein and level of middle-mass molecules in blood serum at all observation periods and their restoration to the level of intact control earlier than in the control group. The data obtained are evidenced of the inflammation processes and endogenous intoxication in rats with full-layer excised plane wounds at the treatment of wounds using a nanocrystalline cerium-based pharmacological composition.

Simulation of full-thickness excised plane wounds in rats was accompanied by intensification of lipid peroxidation, an increase in the level of redox proteins of the serum and alteration of the activity of antioxidant enzymes (superoxide dismutase and catalase). The rats of this group showed a decrease in the content of protein, non-protein and total sulfhydryl groups in the blood serum, indicating an increase in the content of free radicals. Daily application to the wound bed of carbopol gel with nanocrystalline cerium dioxide restored pro /antioxidant balance in the blood serum of rats, which was manifested in reducing the content of lipid peroxidation products and normalizing the activity of antioxidant enzyme level of control. When using nanocerium, there is a decrease in the content of both neutral aldehyde and ketone products, as well as the main aldehyde and ketone products of oxidative modification of proteins in blood serum. Therefore, one of the mechanisms of dermatotropic effect of carbopol gel with nanocrystalline cerium dioxide is its antioxidant and antiradical action.

In the skin samples of untreated animals the level of VEGF, NGF, MMP-2, MMP-9 and HIF 1 α was increased. The high early levels of MMP-9 appear to be associated with concomitantly elevated collagenase levels, possibly to facilitate epithelialization and degradation of denatured collagen. The prolonged elevation of MMP-2 activity is probably important for the remodelling of scar tissue. Moreover, gelatinases may serve as indicators of the progression of the wound healing process. Nanocerium-based composition may be represented as a great regulator for both gelatinases in wound healing process. Nanocerium-based composition has a positive influence on growth factors (VEGF, NGF) and HIF

Key words: full-thickness excised plane wound, nanocrystalline cerium dioxide, collagen, metalloproteinases, growth factors.