

Київський національний університет імені Тараса Шевченка
Міністерство освіти і науки України
Київський національний університет імені Тараса Шевченка
Міністерство освіти і науки України

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

Табурець Олеся Володимирівна

УДК 616-001.4-085.33:615.03.032:612-092.9

ДИСЕРТАЦІЯ

МЕХАНІЗМ ДЕРМАТОТРОПНОЇ ДІЇ ФАРМАКОЛОГІЧНОЇ КОМПОЗИЦІЇ НА ОСНОВІ МЕЛАНІНУ

03.00.04 – біохімія

Біологія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело
_____ Табурець О.В.

Науковий керівник: **Верещака Володимир Валентинович**, доктор медичних наук, старший науковий співробітник.

Київ – 2017

АНОТАЦІЯ

Табурець О.В. Механізм дерматотропної дії фармакологічної композиції на основі меланіну. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04 – біохімія. – ННЦ «Інститут біології та медицини», Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, 2017.

Робота присвячена дослідженню механізму дерматотропної дії фармакологічної композиції на основі меланіну за умов моделювання вирізаної площинної рани та хімічного опіку шкіри щурів.

Встановлено, що фармакологічна композиція, до складу якої входить 0,1 % меланін розчинений в 0,5% карбополі справляє бактерицидну дію на тест-культури *Staphylococcus aureus* і *Pseudomonas aeruginosa* та фунгістатичну дію на тест-культуру дріжджових грибів роду *Candida*.

На всіх термінах спостереження площа ран під дією фармакологічної композиції на основі меланіну була достовірно меншою у порівнянні з ранами без нанесення композиції. Найбільші темпи загоєння вирізаної площинної рани під впливом фармакологічної композиції на основі меланіну спостерігали на 6-9 добу, при гнійно-некротичних ранах на 12-14 добу. Повна епітелізація ран обох видів під впливом фармакологічної композиції наступала швидше на 4 доби при вирізання площинній рані та на 9 діб при гнійно-некротичній рані.

При використанні нової фармакологічної композиції загоєння вирізаної площинної та гнійно-некротичної рани відбулося без грубого рубцювання тканини, що підтверджують наші дослідження (відсотковий вміст колагену та виплавленої желатинив шкірі був меншим, вміст вологи був більшим, ніж у тваринз ранами без лікування).

Показано, що при щоденному нанесенні (двічі на добу) на площинно-вирізану та гнійно-некротичну рану фармакологічної композиції на основі меланіну, починаючи з 6-ої доби ранового процесу в гомогенаті шкіри і

сироватці крові знижується вміст супероксидного аніон радикалу та пероксиду водню, що свідчить про антиоксидантні властивості меланіну.

Встановлено зниження продуктів перекисного окиснення ліпідів при змодельованих нами патологіях шкіри при використанні фармакологічної композиції на основі меланіну. Зменшення цих продуктів відбувалось на початкових фазах ранового процесу, як в сироватці крові так і в гомогенаті шкіри щурів, що може бути пов'язано саме з будовою меланіну, він як ЗолоїдногоЗні сполука здатен реагувати з пероксидними радикалами та руйнувати гіпероксиди, запобігати утворенню вільних радикалів, що призводить до обриву ланцюга та сповільнення швидкості окиснення.

За умов площинно-вирізаної та гнійно-некротичної рани в гомогенаті шкіри та сироватці крові зростає активність глутатіонпероксидази та глутатіонтрансферази, знижується супероксиддисмутазна активність та зростає каталазна активність. При місцевому нанесенні на рани фармакологічної композиції на основі меланіну активності вказаних ферментів нормалізуються, що пояснюється здатністю меланіну до поглинання вільних радикалів.

Показано зростання рівня експресії генів, *Tlr2*, *Ptgs2* та *Tgfb1* та зниження *Tjp* при загоюванні вирізаних площинних та гнійно-некротичних ран. Під впливом фармакологічної композиції, рівень експресії цих генів змінювався в сторону контрольної групи щурів, рани яких не обробляли фармакологічною композицією. Таким чином, можна зробити припущення про вплив меланіну на зменшення експресії зазначених генів: зменшення експресії *Tlr2* за умов використання фармакологічної композиції можна пояснити потужною бактерицидною дією меланіну на патологічну мікрофлору: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*; меланін володіє цитопротекторною дією: він знижує активність процесів перекисного окиснення ліпідів, збільшує активність ферментів антиоксидантної системи, запобігаючи пошкодженню ДНК; впливає на продукцію цитокінів: TNF- α , ІЛ-6, VEGF тощо за рахунок, наприклад, впливу на експресію ядерних рецепторів

PPAR, посилює експресію eNOS та виділення протизапальних цитокінів задля зниження інтенсивності запалення й утворення рубців при ранозагоєнні. Зниження експресії *Ptgs2* та *Tgfb1* може бути пов'язано із синтезом простагландину E₂ та TGF-β₁, що є необхідними передумовами для швидкого загоювання ран без виражених рубців.

Отже, фармакологічна композиція на основі меланіну володіє антибактеріальними, ранозагоюючими, протизапальними та антиоксидантними властивостями, що свідчить про ефективність застосування композиції для прискорення гоєння ран шкіри без утворення грубого келоїдного рубця.

Ключові слова: вирізана площинна рана, хімічний опік шкіри, меланін, колаген, перекисне окиснення ліпідів, антиоксидантна система.

SUMMARY

Taburets O.V. Mechanism of dermatotropic effect of the pharmaceutical composition based on melanin. - – Qualification scientific work on the rights of manuscripts.

Tesis for obtaining the Candidate of Sciences degree in Biology, specialty 03.00.04- Biochemistry. - ESC "Institute of Biology and Medicine", Kyiv National Taras Shevchenko University, Kyiv, 2017.

The work is devoted to the study of mechanism of the dermatotropic action pharmaceutical composition based on melanin under the conditions of modeling full-thickness wound and a chemical burn of the skin rats.

It has been established that a pharmacological composition containing 0.1% melanin dissolved in 0.5% carbopol has a bactericidal effect on the test cultures of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*, have the fungistatic effect on the test culture of yeast fungi of the genus *Candida*.

At all times of observation, the wound area under the action of the melanin-based pharmacological composition was significantly less than the wounds without

application of the composition. The greatest healing rates of a full-thickness wound under the influence of a melanin-based pharmacological composition were observed on the 6th-9th day, in purulent necrotic wounds on 12-14 days. Complete epithelization of the wounds of both species under the influence of the pharmacological composition occurred more quickly for 4 days for full-thickness wound and for 9 days with a purulent necrotic wound.

When we used new pharmacological composition to healing the full-thickness wound and purulent necrotic wound, there was no gross scarring of the tissue confirming our studies (the content of collagen and melted gelatin in the skin was less, the moisture content was greater than in animals with wounds without treatment).

It has been shown that with the daily application (twice a day) of a pharmacological composition which include melanin on full-thickness and purulent necrotic wound, in the skin homogenate and serum starting from the sixth day of the wound process the content of the superoxide anion radical and hydrogen peroxide decreases, which indicates about antioxidant properties of melanin.

The reduction of lipid peroxidation products in the skin pathologies was established using a melanin-based pharmaceutical composition. The decrease in these products occurred in the initial phases of the wound process, both in the blood serum and in the skin homogenate of rats, which can be due precisely to the melanin device; it is neither a liquid nor a compound capable of reacting with peroxide radicals and destroying hyperoxides, preventing the formation of free radicals, which leads to breakage of the chain and slowing down the rate of oxidation.

In the conditions of full-thickness and purulent-necrotic wound in the skin homogenate and serum, the activity of glutathione peroxidase and glutathione transferase increased, the superoxide dismutase activity decreased and catalase activity increased. When locally applied to the wounds of the melanin-based pharmacological composition, the activity of these enzymes is normalized, which is explained by the ability of melanin to absorb free radicals.

The growth and level of gene expression, *Tlr2*, *Ptgs2* and *Tgfb1*, and a decreased in *Tjp* in the healing of full-thickness and purulent necrotic wounds was showed. Under the influence of the pharmacological composition, the level expression of these genes changed toward a control group of rats whose wounds were treated with a pharmacological composition. Reducing *Tlr2* expression can be explained by a strong bactericidal effect on melanin to abnormal flora: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*. Melanin have cytoprotective effect. It reduces the activity of lipid peroxidation, increases the activity of enzymes of antioxidant system, preventing DNA damage; impact on production of cytokines: TNF- α , IL-6, VEGF, etc. by, for example, the influence on the expression of nuclear receptors PPAR, increases eNOS expression and secretion of anti-inflammatory cytokines to reduce the intensity of inflammation and scarring during healing.

Therefore, we can make assumptions about the impact of melanin to reduction of *Ptgs2* and *Tgfb1* expression, and thereafter the synthesis of prostaglandin E2 and TGF- β 1, which is a prerequisite for rapid wound healing without expressed scarring.

Key words: full-thickness wound, chemical skin burn, melanin, collagen, lipid peroxidation, antioxidant system.

Список опублікованих праць за темою дисертації

1. Taburets OV, Morgaienko OO, Kondratyuk TO, BeregovaTV, Ostapchenko LI. The Effect of "Melanin-Gel" on the Wound Healing. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences (RJPBCS). 2016;7(3):2031-2038. (SCOPUS).
2. Табурець ОВ, Грінченко ОО, Дворщенко КО, Верещака ВВ, Остапченко ЛІ. Вплив меланіну на прооксидантно-оксидантний гомеостаз у сироватці крові за умов різаної рани шкіри щурів. Вісник проблем біології та медицини. 2017;1:191-196.
3. Dranitsina AS, Taburets OV, Dvorshchenko KO, Grebinyk DM, Beregova TV, Ostapchenko LI. *Tgfb1, Ptgs2* Genes Expression During Dynamics of Wound Healing and with the Treatment of Melanin. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences (RJPBCS). 2017;8(1):2014-2023.
4. Табурець ОВ, Дворщенко КО, Тимошенко МО, Верещака ВВ, Берегова ТВ, Остапченко ЛІ. Глутатіонова система у сироватці крові щурів в динаміці різаної рани та при дії фармакологічної композиції на основі меланіну. Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія: Проблеми регуляції фізіологічних функцій. 2017;1(22):5-8.
5. Табурець ОВ, Дворщенко КО, Верещака ВВ, Берегова ТВ, Остапченко ЛІ. Окисна модифікація білків сироватки крові за умов моделювання вирізаної площинної рани у щурів. Вісник проблем біології та медицини. 2017;3:219-223.
6. Dranitsina A, Taburets O, Dvorshchenko K, Grebinyk D, Beregova T, Ostapchenko L. *Tlr2, Tjp1* genes expression during dynamics of wound healing and with the treatment of melanin. Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences. 2017;30(2):81-85. (SCOPUS).

7. Табурець ОВ, Верещака ВВ, Берегова ТВ, Остапченко ЛІ. Вплив меланіну на морфофункціональні показники шкіри за умов різаної рани та хімічного опіку у щурів. Фізіологічний журнал. 2017;63(5):28-33.
8. Табурець ОВ, Горова ІМ, Скочко НС. Дослідження репаративних властивостей препарату на основі меланіну. X Міжнародна конференція молодих учених «Біологія: від молекули до біосфери», 2-4 грудня 2015: матер.конф.Харків, Україна. 2015: 75-76.
9. Горова ІМ, Табурець ОВ, Дудар ІВ. Дослідження репаративних властивостей «Меланін-гелю» різних концентрацій на площинних ранах. IV Міжнародна наукова конференція студентів, аспірантів та молодих вчених «Фундаментальні та прикладні дослідження в біології і екології», 12 – 14 квітня 2016: матер. конф.Вінниця, Україна. 2016:334.
10. Табурець ОВ, Гринченко ОА, Дворщенко ЕА. Влияние фармакологической композиции на основе меланина на активность антирадикальных ферментов (СОД, КАТ). «XII international research and practice conference», 30 января-7 февраля, 2017: матер.конф. Sheffield, United Kingdom. 2017:51-54.
11. Табурець ОВ, Грінченко ОО, Дворщенко КО. Вміст активних форм кисню у шкірі щурів на фоні застосування нової фармакологічної композиції на основі меланіну при експериментальній різаній рані. IV Міжнародний медико-фармацевтичний конгрес студентів і молодих учених «Інновації та перспективи сучасної медицини» ВІМСО, 5 – 7 квітня, 2017: матер.конф.Чернівці, Україна. 2017:57.
12. Taburets O, Dranitsina A, Grebinyk D, Dvorshchenko K, Vereschaka V, Beregova T. New pharmacological composition which contained melanin stimulates wound healing without scarring. XIII міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології», 25 – 27 квітня 2017: матер. конф. Львів, Україна. 2017:72.

13. Гринченко ОО, Табурець ОВ, Тимошенко МО, Дворщенко КО. Вміст відновленого та окисленого глутатіону на фоні застосування нової фармакологічної композиції на основі меланіну. XV Міжнародна наукова конференція «Шевченківська весна: досягнення біологічної науки / BioScience Advances», 18 – 21 квітня, 2017: матер. конф. Київ, Україна. 2017:82-83.
14. Табурець ОВ, Верещака ВВ, Берегова ТВ, Остапченко ЛІ. Вплив меланіну на фізико-хімічні показники шкіри щурів при моделюванні хімічного опіку шкіри. Міжнародна науково-практична конференція «Актуальні питання медицини і біології», 30 травня – 1 червня, 2017: матер. конф. Полтава, Україна. 2017:38-40.
15. Taburets O, Dvorshchenko K, Dranitsina A, Grebinyk D, Beregova T, Ostapchenko L. The influence of melanin on genes expression during wound healing. Lviv-Lublin conference of experimental and clinical biochemistry, September 21-23, 2017: abstract book. Lublin, Poland. 2017:27.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	13
ВСТУП.....	14
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	22
1.1. Біохімічні і молекулярні механізми гоєння різаних та гнійно-некротичних ран.....	22
1.2. Дерматотропні препарати. Характеристика та застосування.....	30
1.3. Меланін: властивості та застосування в якості дерматотропного засобу.....	34
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	40
2.1. Об'єкт дослідження.....	40
2.2. Схема експериментів.....	40
2.3. Модель повношарових вирізаних площинних ран.....	42
2.4. Опіки, викликані розчином кальцієвої солі.....	42
2.5. Приготування фармакологічної композиції.....	42
2.6. Отримання сироватки крові.....	43
2.7. Отримання гомогенату шкіри тварин.....	43
2.8. Планіметричні показники.....	43
2.9. Гістологічні методи дослідження.....	44
2.10. Визначення фізико-хімічних показників шкіри щурів.....	44
2.11. Визначення концентрації білка за методом Лоурі.....	45
2.12. Визначення вмісту супероксидного аніон-радикалу та пероксиду водню.....	45
2.13. Визначення продуктів перекисного окиснення ліпідів.....	45
2.14. Визначення активності супероксиддисмутази та каталази.....	45
2.15. Визначення активності глутатіонової ланки антиоксидантної системи та вмісту відновленого та окисненого глутатіону.....	46
2.16. Визначення рівня сульфгідрильних груп.....	46
2.17. Дослідження молекулярних маркерів запальних процесів на різних	

стадіях ранового процесу.....	46
2.18. Дослідження бактеріальних властивостей меланіну.....	48
2.19. Статистична обробка результатів.....	49
РОЗДІЛ 3. МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНІ ТА ПЛАНІМЕТРИЧНІ ПАРАМЕТРИ СТАНУ ШКІРИ ЩУРІВ НА РІЗНИХ ЕТАПАХ РАНОВОГО ПРОЦЕСУ ТА ПРИ ЗАСТОСУВАННІ ФІРМАКОЛОГІЧНОЇ КОМПОЗИЦІЇ НА ОСНОВІ МЕЛАНІНУ.....	50
3.1. Біоцидний вплив фармакологічної композиції на тест культури мікроорганізмів.....	50
3.2. Вплив фармакологічної композиції на основі меланіну на морфофункціональні показники експериментальних ран шкіри щурів.....	53
3.3. Візуалізація поверхні шкірних ран на різних етапах ранового процесу.....	59
3.4. Фізико-хімічні властивості шкіри при моделюванні вирізаної площинної рани та хімічного опіку шкіри щурів.....	66
РОЗДІЛ 4. ІНТЕНСИВНІСТЬ ВІЛЬНОРАДИКАЛЬНИХ ПРОЦЕСІВ У ШКІРІ ТА СИРОВАТЦІ КРОВІ ЩУРІВ В ДИНАМІЦІ РАНОВОГО ПРОЦЕСУ ТА ПРИ ЗАСТОСУВАННІ ФІРМАКОЛОГІЧНОЇ КОМПОЗИЦІЇ НА ОСНОВІ МЕЛАНІНУ	72
4.1. Інтенсивність накопичення супероксиданіон радикалу та пероксиду водню за умов моделювання вирізаної площинної рани шкірита при використанні фармакологічної композиції на основі меланіну.....	72
4.2. Інтенсивність накопичення супероксиданіон радикалу та пероксиду водню за умов моделювання хімічного опіку шкіри при використанні фармакологічної композиції на осно.....	76
РОЗДІЛ 5. ОЦІНКА ПРОЦЕСІВ ОКИСНЕННЯ ЛІПІДІВ ТА БІЛКІВ.....	82
5.1. Інтенсивність процесів перекисного окиснення ліпідів при вирізаний площинній рані та за умов її корекції фармакологічною композицією на основі меланіну.....	82

5.2. Інтенсивність процесів перекисного окиснення ліпідів при хімічному опіку шкіри та за умов його корекції фармакологічною композицією на основі меланіну.....	90
РОЗДІЛ 6. АНТИОКСИДАНТНА СИСТЕМА ШКІРИ ТА СИРОВАТКИ КРОВІ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ РАНАХ ТА ЗА УМОВ КОРЕКЦІЇ ФАРМАКОЛОГІЧНОЮ КОМПОЗИЦІЄЮ НА ОСНОВІ МЕЛАНІНУ.....	98
6.1. Активність ферментів антиоксидантного захисту при моделюванні вирізаної площинної рани.....	99
6.2. Активність ферментів антиоксидантного захисту при моделюванні хімічного опіку шкіри.....	123
РОЗДІЛ 7. ОЦІНКА РІВНІВ ЕКСПРЕСІЇ ГЕНІВ У ШКІРІ, ЗАЛУЧЕНИХ У РЕЕПІТЕЛІЗАЦІЮ.....	146
7.1. Експресія генів <i>Tgfb1</i> , <i>Ptgs2</i> в динаміці загоєння ран та при використанні фармакологічної композиції на основі меланіну.....	146
7.2. Експресія генів <i>Tlr2</i> та <i>Tjp1</i> в динаміці загоєння ран та при використанні фармакологічної композиції на основі меланіну.....	156
АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ.....	165
ВИСНОВКИ.....	170
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	172
Додаток 1.....	200

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АОС – антиоксидантна система

АПБ – антибактеріальний препарат

АФК – активні форми кисню

ГР – глутатіонредуктаза

ГП – глутатіонпероксидаза

ГТ – глутатіонтрансфераза

МДА – малоновий диальдегід

КАТ – каталаза

ПОЛ – перекисне окиснення ліпідів

СОД – супероксиддисмутаза

PDGF – тромбоцитарний фактор росту

TGF- β – трансформуючий фактор росту β

FGF – фібробластичних фактор росту

EGF – епідермальний фактор росту

PDAF – тромбоцитарний фактор ангіогенезу

ВСТУП

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Однією з актуальних проблем сучасної фармакології є створення нових ранозагоювальних засобів з виразними протизапальними, антимікробними, репаративними властивостями і водночас відсутністю токсичного впливу на організм. [259- 261]. Це обумовлено наявністю великої кількості хворих з ранами та ушкодженнями шкіри, які потребують як хірургічного, так і місцевого лікування. Щорічно мільйони хірургічних ран створюються в ході рутинних хірургічних операцій [World Health Organization, 2014]. За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ) близько 2% людей, від загальної кількості загиблих від травм, гине від уражень отриманих у ході війни і 5% – від отриманих опіків. Число таких хворих зростає в зв'язку з підвищенням кількості побутових і виробничих травм [262], збільшенням дорожньо-транспортного травматизму, а також числа хворих із синдромом діабетичної стопи, результатом якої є ампутація нижніх кінцівок [4, 263]. Розробка таких препаратів набула ще більшої актуальності у зв'язку з неоголошеною війною на Сході України, що призвело до зростання числа хворих. Ушкодження шкіри та рани різної етіології супроводжуються інфекціями, порушенням про/антиоксидантного стану шкіри та запаленням [264, 265]. Наслідком чого є кисневе голодування шкіри, порушення репаративних механізмів, з подальшим утворенням келоїдного рубця, а в деяких випадках розвитком гангрени [266]. Клінічна практика свідчить, що застосування антибіотиків, цитостатиків, кортикостероїдів та імунодепресантів негативно впливає на перебіг гнійно-запального процесу (знижується загальна реактивність організму, виникають ускладнення: алергія, кандидомікоз та ін.) [267]. Дефекти шкіри, такі як виразки, опікові, хірургічні рани або рани

внаслідок травм, спричиняють колонізацію ширшим спектром бактерій [268]. Мікробний спектр збудників інфекції характеризується зростанням резистентності до існуючих лікарських препаратів. Водночас лікування хворих додатково ускладнюється наявністю чинників, що призводять до ускладнень та інтоксикації організму (вік, наявність інфекцій, діабету, судинних захворювань, раку [269]). Більшість препаратів має вузько направлену дію: лише антимікробну чи дегідратуючу, або некролітичну, тобто вони не забезпечують всебічної дії на рановий процес. У цьому полягає їх головний недолік. Темпи поширення ран мультифакторного генезу спонукають до пошуку більш ефективних дерматотропних засобів та оптимізації лікування.

Тому нині, зусилля вчених різних країн спрямовані на розробку нових лікарських форм для лікування ран [270]. Так, в Національному фармацевтичному університеті (НФУ) розроблено ліпосомальні лікарські препарати на основі сировини тваринного походження (шкіри свиней) у формі розчину для ін'єкцій та спрею на основі нанобіотехнології [271]. Також в НФУ розроблено гель комплексної дії для лікування ран у другій фазі ранового процесу на основі активних фармацевтичних ієгрідентів: глюкозамінугідрохлориду, алантоїну, лавандової олії [272]. У Білорусі створена мазь на основі меланіну, що виділений із *Aspergillus niger*, до складу якої входить 0,05 % меланін, 5% бієн. Вона відноситься до дерматотропних та фотозахисних препаратів, використовується як лікувально-профілактичний препарат у хворих з дискоїдною червоною вовчанкою, фотодерматитами, сонячною екземою. Однак літературні дані щодо даної мазі відсутні, а ціна є достатньо високою. Відомо, що меланін, продуцентом якого є дріжджоподібні гриби *Pseudonadsoniella brunnea* (раніше *Nadsoniella nigra* sp. X-1) [9], які були отримані зі зразків вертикальних скель острова Галіндез (Українська антарктична станція «Академік Вернадський»), має цитопротекторні, стреспротекторні, антиоксидантні властивості, та в нього виражена профілактично-лікувальна дія на розвиток ерозивно-виразкових уражень у

слизовій оболонці шлунка різного генезу [10, 11]. Ми припустили, що препарат на основі меланіну міг би мати дерматотропні властивості та поєднував у собі більшість із властивостей репаративного препарату для лікування ран різного генезу.

Виходячи із результатів раніше опублікованих досліджень, та на наявність невирішеної проблеми загоєння ран різного генезу, що є актуальною нині, необхідність розробки препаратів, які попереджують розвиток інфекцій, сприяють очищенню і грануляції ран, прискорюють регенерацію, спонукало нас до дослідження дерматотропних властивостей меланіну у складі нової фармакологічної композиції.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.

Дисертаційна робота виконана на кафедрі біохімії ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка у рамках бюджетної тем «Механізм реалізації адаптаційно-компенсаторних реакцій організму за умов розвитку різних патологій» (№ д/р 0111U004648, 2011 – 2015 рр), «Механізм регуляції метаболічних процесів в організмі за умов розвитку патологічних станів» (№ д/р 0111U004648, 2016 – 2018 рр), науково-дослідної теми «Доклінічні дослідження токсичності меланіну субстанції для нових лікарських препаратів та ефективності дерматотропних препаратів на основі наночастинок» (№д/р 0116U004828, 2016 – 2017 рр).

Мета і завдання дослідження. Метою роботи було з'ясувати молекулярно-біохімічні механізми дії фармакологічної композиції на основі меланіну за умов моделювання вирізаної площинної рани та хімічного опіку шкіри щурів.

Відповідно до мети перед нами були поставлені такі завдання:

1. Дослідити антибактеріальні властивості фармакологічної композиції, щодотест-культур бактерій *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* та дріжджових грибів роду *Candida albicans*.
2. Вивчити морфологічні, планіметричні параметри стану шкіри щурів на різних етапах ранового процесу та при застосування нової фармакологічної композиції на основі меланіну.
3. Визначити фізико-хімічні властивості шкіри при шкірній патології та за умов використання фармакологічної композиції.
4. Оцінити інтенсивність вільнорадикальних процесів та стан антиоксидантної системи у гомогенаті шкіри та сироватці крові щурів при вирізаний площинній рані та хімічному опіку шкіри щурів за умов застосування фармакологічної композиції на основі меланіну.
5. Визначити рівень експресії генів у шкірі, залучених у загоєння ран без рубців.

Об'єкт дослідження: біохімічні механізми ушкоджень та відновлення шкіри при вирізаний площинній рані та хімічному опіку шкіри

Предмет дослідження: біохімічні, фізико-хімічні та молекулярно-генетичні властивості шкірного покриву за умов експериментальної площинної рани та хімічного опіку шкіри, обґрунтування корекції цих змін за допомогою фармакологічної композиції на основі меланіну.

Методи дослідження: спектрофотометричні (визначення вмісту вільних радикалів, продуктів перекисного окиснення ліпідів, окисної модифікації білків, ферментативної активності про- та антиоксидантних ензимів), флуоресцентні (визначення вмісту шиффових основ), молекулярно-генетичні (визначення рівня експресії генів), планіметричні (площа рани, швидкість загоєння), фізико-хімічні (вмісту вологи і колагену, виходу желатини, термічного зварювання), морфологічні та методи математичної статистики.

Наукова новизна одержаних результатів.

Доповнено наукові дані про біохімічні та молекулярні механізми розвитку шкірних уражень за умов експериментальної вирізаної площинної рани та хімічного опіку шкірі в динаміці та встановлені механізми дії фармакологічної композиції на основі меланіну при цих патологічних станах. Встановлено, що фармакологічна композиція, до складу якої входить 0,1 % меланін, розчинений в 0,5% карбополі, справляє бактерицидну дію на тест-культури *Staphylococcus aureus* і *Pseudomonas aeruginosa* та фунгістатичну дію на тест-культуру дріжджових грибів роду *Candida*, що при нанесенні фармакологічної композиції на рану запобігатиме її вторинному інфікуванню. На основі проведеної оцінки планіметричних та морфологічних параметрів стану шкіри щурів на всіх термінах спостереження під дією фармакологічної композиції на основі меланіну, встановлено, що площа вирізаних площинних та гнійно-некротичних ран і тривалість їх гоєння були достовірно меншими у порівнянні з ранами без нанесення композиції. При використанні нової фармакологічної композиції загоєння ран у щурів відбувалося без утворення грубого келоїдного рубця, що підтверджено зменшенням вмісту колагену і виплавленої желатини в шкірі та температури її зварювання, а також зростанням вмісту вологи в рановій поверхні шкіри у порівнянні з тваринами з ранами без обробки ранової поверхні. Вирізаних площинних і гнійно-некротичних ран шкіри супроводжувалися розвитком оксидативного стресу та зміною активності ферментів антиоксидантної системи в організмі щурів, в результаті чого в гомогенаті шкіри і сироватці крові зростає вміст супероксид аніон радикалу, пероксиду водню, продуктів перекисного окиснення ліпідів, зменшувався вміст білкових, небілкових і загальних сульфгідрильних груп. При цьому супероксиддисмутазна активність знижувалась, а каталазна – зростала на тлі виснаження глутатіонової системи антиоксидантного захисту. Застосування фармакологічної композиції з меланіном відновлювало показники оксидативного стресу та активність ферментів антиоксидантного захисту до

рівня контролю. Показано, що гоєння повношарових площинних вирізаних та гнійно-некротичних ран шкіри супроводжується підвищенням рівнів експресії мРНК генів *Ptgs2*, *Tgfb1* та *Tlr2* і зменшенням рівня експресії мРНК гену *Tjp1*. Застосування фармакологічної композиції на основі меланіну знижувало рівні експресії мРНК генів *Ptgs2*, *Tgfb1* і *Tlr2* та збільшувало рівень експресії мРНК гену *Tjp1*, що є необхідною передумовою для швидкого загоєння ран без виражених рубців.

Практичне значення одержаних результатів.

Одержані результати доповнюють уявлення про патогенез порушень шкіри та механізми дії поліфенольних сполук при експериментальній вирізаний площинній рані та хімічному опіку шкіри. Робота містить експериментальне обґрунтування клінічного застосування фармакологічної композиції на основі меланіну при вирізаний площинній рані та хімічному опіку шкіри. Запропоновано нову фармакологічну композицію для корекції порушень після шкірних ран, що може використовуватись у медичній практиці при лікуванні хворих з ураженням шкіри. Окремі положення дисертаційної роботи та методи досліджень можуть бути впроваджені у навчальний процес на біологічних факультетах університетів та медичних вузів при розробці курсу з вивчення молекулярних та біохімічних аспектів патологічних станів.

Висновки

1. Фармакологічна композиція, що містить 0,1 % меланін, розчинений в 0,5% карбополі, справляє бактерицидну дію на тест-культури *Staphylococcus aureus* і *Pseudomonas aeruginosa* та фунгістатичну дію на тест-культуру дріжджових грибів роду *Candida*, запобігає вторинному інфікуванню ран.

2. На всіх термінах спостереження площа ран під дією фармакологічної композиції на основі меланіну була достовірно меншою у порівнянні з ранами без нанесення композиції. Найбільші темпи загоєння вирізаної площинної рани під впливом фармакологічної композиції на основі меланіну спостерігали на 6-9

добу, при гнійно-некротичних ранах на 12-14 добу. Повна епітелізація ран обох видів під впливом фармакологічної композиції наступала швидше на 4 доби при вирізаних площинній рані та на 9 діб при гнійно-некротичній рані.

3. При використанні фармакологічної композиції, що містить 0,1 % меланін, розчинений в 0,5 % карбополі, загоєння відбувалося без утворення грубого келоїдного рубця, що підтверджено зменшенням вмісту колагену і виплавленої желатини в шкірі, та зростанням вмісту вологи.

4. Вирізаних площинні і гнійно-некротичні рани шкіри супроводжувалися розвитком оксидативного стресу та зміною активності ферментів прооксидантно-антиоксидантної системи в організмі щурів, що супроводжується зростанням вмісту супероксид аніон радикалу, пероксиду водню, продуктів перекисного окиснення ліпідів, зменшенням вмісту білкових, небілкових і загальних сульфгідрильних груп. При цьому супероксиддисмутазна активність знижується, а каталазна – зростає на тлі виснаження глутатіонової системи антиоксидантного захисту. Застосування фармакологічної композиції з меланіном відновлює показники оксидативного стресу та активність ферментів антиоксидантного захисту до рівня контролю.

5. Гоєння повношарових площинних вирізаних та гнійно-некротичних ран шкіри супроводжується підвищенням рівнів експресії мРНК генів *Ptgs2*, *Tgfb1* та *Tlr2* і зменшенням рівня експресії мРНК гену *Tjp1*. Застосування фармакологічної композиції на основі меланіну знижує рівні експресії мРНК генів *Ptgs2*, *Tgfb1* і *Tlr2* та збільшує рівень експресії мРНК гену *Tjp1*, що є необхідною передумовою для швидкого загоєння ран без виражених рубців.

Особистий внесок здобувача. Аналіз літератури, проведення експериментів, статистична обробка та написання дисертації виконані здобувачем самостійно. Планування напрямків досліджень, обговорення отриманих результатів, формулювання висновків здійснено за участю наукового керівника д.мед.н., с.н.с. Верещаки В.В. В проведенні молекулярних

досліджень по визначенню експресії генів допомагала н.с., к.б.н. Драніцина А.С. В обговоренні результатів дослідження брали участь співавтори наукових публікацій, зокрема, окрему подяку висловлюю д.б.н., проф. Остапченко Л.І., д.б.н., проф. Т.В. Береговій., д.б.н., с.н.с. К.О. Дворщенко. Автор висловлює вдячність всім колегам за надану допомогу та їх участь відмічена у спільних публікаціях.

Апробація результатів дисертації. Основні результати дисертаційної роботи доповідалися та обговорювалися на: X Міжнародній конференції молодих учених «Біологія: від молекули до біосфери» (Харків, 2015), IV Міжнародній науковій конференції студентів, аспірантів та молодих вчених «Фундаментальні та прикладні дослідження в біології і екології» (Вінниця, 2016), XII international research and practice conference» (UK, 2017), IV Міжнародний медико-фармацевтичний конгрес студентів і молодих учених «Інновації та перспективи сучасної медицини» (Чернівці, 2017), XIII Міжнародній науковій конференції "Молодь і поступ біології" (Львів, 2017), Шевченківська весна: конференція студентів, аспірантів та молодих вчених (Київ, 2017), Міжнародна науково-практична конференція «Актуальні питання медицини і біології», (Полтава, 2017), Lviv-Lublin conference of experimental and clinical biochemistry (Lublin, 2017).

Публікації. За темою дисертації опубліковано 15 наукових робіт, у тому числі 7 статей (4 статті у фахових виданнях, рекомендованих МОН України, 3 статті в іноземних виданнях, 8 публікацій у матеріалах з'їздів та конференцій.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається зі вступу, огляду літератури, методів досліджень, розділу з викладенням отриманих результатів, розділу, присвяченому аналізу й узагальненню результатів, висновків та списку літератури, що містить 272 джерел. Матеріали дисертаційної роботи викладені на 201 сторінці друкованого тексту, ілюстрована 4 таблицями та 77 рисунками.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Біохімічні і молекулярні механізми гоєння різаних та гнійно-некротичних ран

Загоєння ран – це складний та динамічний комплекс подій пов'язаний з відновленням пошкоджених та втрачених клітинних структур, тканинних шарів. Репарація втрачених тканин являє собою лінійний процес, де фактори росту викликають проліферацію клітин, продукцію позаклітинного матриксу та проліферацію паренхіматозних клітин. За Мітчелом, процес загоєння шкіри, ілюструє принципи відновлення більшості тканин [12]. Молекулярні та біохімічні процеси, які відбуваються при загоєнні рани, розділяють на наступні фази: фаза запалення - настає безпосередньо після травми і триває 2-3 дні; фаза регенерації і формування грануляційної тканини - починається з 3-4 доби; фаза рубцювання і епітелізації (загоєння) – починається з 8-го дня після травми.

Виникнення і розвиток ранових дефектів відноситься до вільнорадикальних патологій, які супроводжуються активацією вільнорадикальних реакцій. Під час фази запалення нейтрофіли та цитокіни продукують окисники, такі як активні форми кисню (АФК) чи реакційно здатні форми азоту. Ці речовини діють як вільні радикали, за рахунок чого затримують загоєння ран та викликають значні пошкодження в здорових клітинах тканин по усьому організму. У відповідь на окисний стрес в місці рани, антиоксиданти знешкоджують вільні радикали та створюють необхідне середовище для загоєння ран.

Характерною особливістю запальної фази є «окисний вибух». Поліморфноядерні клітини і макрофаги, мігруючи в рану, вивільняють велику кількість супероксидного радикала, який перетворюється в пероксид водню за

рахунок СОД. Супероксид продукується NADPH-оксидазою, цей ферментативний комплекс переносить електрони з NADPH на молекулярний кисень і утворює супероксидний радикал. Він складається з білків, локалізованих в фагосомних мембранах і в плазматичних мембранах фагоцитарних клітин [13,14]. Деякі компоненти комплексу знаходяться в цитоплазмі; вони переміщуються в мембрану внаслідок фагоцитозу або під впливом розчинних стимуляторів. Активність NADPH-оксидази в фагоцитах регулюється невеликим GTPase Rac2 [15].

Збільшення концентрації супероксиду і перекису водню є нетривалою, оскільки міграція нейтрофілів і макрофагів зменшується і в результаті дії АОС [16]. Здатність макрофагів виробляти АФК набагато нижча, ніж у нейтрофілів, але АФК і особливо H_2O_2 є важливими другими месенджерами, що регулюють фізіологічні функції макрофагів [17]. Мієлопероксидази, що міститься в гранулоцитах і моноцитах, каталізує реакцію перекису водню з аніонами хлориду; утворюється потужна окислювальна хлорноватиста кислота [18]. Реакція мієлопероксидази також є джерелом синглетного кисню [19].

Але якщо запальна фаза затягнеться у часі, то концентрація АФК буде перевищувати антиоксидантну здатність клітини, що ми як раз і спостерігаємо при різаній рані без лікування, як результат виникає окисний стрес. Окисний стрес, що опосередкований радикальними АФК (супероксид аніон радикал) та нерадикальними АФК (перекис водню), інгібує міграцію та проліферацію клітин та викликає пошкодження тканин, як наслідок запальна фаза продовжується у часі. З іншої сторони, дефект нейтрофілів викликає складні інфекції та погане загоєння ран [20]. Зниження рівня регуляторного білка Rac2 фагоцитарної NADPH-оксидази може бути однією із причин затяжної епітелізації рану клініці.

Відомими членами антиоксидантної системи є тиоредоксин-1 (Trx-1) та -2 (Trx-2), глутатіон(GSH), глутатіон-s-трансферази (GST), супероксиддисмутаза (СОД), глутатионпероксидази (GPx), NADP (H) хінон-оксидоредуктаза

(NQO1), каталаза (КАТ), епоксидгідролаза, гемоксигеназа-1 (НО-1) UDP-глюкуронозилтрансферази (UGT) и лютамілцистеїнсинтетаза. Окрім білкових АФК, клітини також використовують не ферментативні метаболіти, які являють собою невеликі антиокисні молекули, такі як вітамін С, вітамін Е, β -каротин, глутатіон, кофермент Q, білірубін, α -токоферол, нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат (НАДФ) та урат. Частина з іонами металів здатна до реакцій окиснення/відновлення, такі як трансферрин та ферритин, які володіють підвищеною здатністю до поглинання АФК[21,22].

Окисний стрес можливо оцінити шляхом вивчення окисненої форми глутатіону – GSSG, а також шляхом скринінгу окисно-чутливої кінази ASK-1, p38 та JNK, та факторів транскрипції, таких як NF- κ B та особливо AP-1 [23, 24]. За рахунок того, що білки реагують на окисний стрес, клітини еволюціонували для використання АФК не тільки для сигналу, але і для попередження клітинної патолофізіології.

Таким чином, використання антиоксидантів під час гоєння ран покращує репарацію ран. Вітамін Е, альфа-ліпоева кислота, вітамін С, екстракт виноградних кісточок, коензим Q10, глутатіон та лютеїн, за рахунок зниження концентрації вільних радикалів сприяють розвитку нової тканини в рані.

Кисень є основним субстратом, який необхідний для мітохондрій залежного аденозинфосфата (АТФ), він забезпечує збільшення кількості енергії, необхідної для відновлення пошкодженої тканини при гоєнні ран.

АФК похідні O_2 , діють як вторинні сигнальні молекули. Найбільш важлива роль серед АФК припадає на супероксидний аніон-радикал ($O_2^{\cdot-}$), перекис водню (H_2O_2), гідроксил радикал ($\cdot OH$), пергідроксильний радикал ($HO_2\cdot$) та молекулярний синглетний кисень [25,26]. Ендогенні клітинні АФК виникають в результаті мітохондріального окисного фосфорилування при продукуванні АТФ із ендоплазматичного ретикулуму, або із класу ферментів оксидоредуктази. АФК через реакції окиснення забирають електрони із сусідніх

молекул, що порушує їх структуру. Низькі рівні АФК індукують зупинку клітинного циклу (тобто є цитостатичними); базові рівні АФК підтримують нормальне функціонування клітин та гомостазу; збільшення кількості АФК індукує ряд транскрипційних факторів та черезмірна індукція АФК активує проапоптичні білки. Окрім вищезазначеного АФК регулюють звуження судин (вазоконстрикція) та судинну релаксацію (вазодилатація).

Однак, окрім позитивного впливу низьких рівнів АФК на загоєння ран, надмірне утворення АФК призводить до окисного стресу, що пагубно впливає на гоєння ран. Підвищення рівня АФК було виявлено *in vivo*, що пов'язано з порушенням репарації при хронічних незагоююваних ранах [27]. На молекулярному рівні окрім АФК-опосередкованої транскрипції, що призводить до секреції прозапальних цитокінів та індукції матричних металопротеїназ, надлишкові АФК та реакційно здатні види азоту можуть прямо чи шляхом активації протеолізу модифікувати чи руйнувати білки позаклітинного матриксу, викликати порушення функцій шкірних фіброblastів та кератиноцитів [28].

Загоєння ран являє собою динамічний процес, з одного боку - надмірний запальний процес, з іншого – не загоювання пошкоджень або хронічна рана [29-31]. Супероксидний аніон-радикал бере безпосередню участь в ініціації вільнорадикальних процесів. Його генерація є пусковою ланкою каскаду реакцій, які призводять до виникнення інших АФК [32].

Як вже згадувалось вище, АФК відіграють важливу роль в захисті, особливо під час загоєння ран, оскільки фагоцитарні нейтрофіли та макрофаги використовують їх реактивні та пошкоджуючі властивості. Ці клітини здатні поглинати бактерії в фагосомі це є пусковим механізмом цитозольних компонентів NADPH оксидази (p47, p67, p40 та Rac2) поряд із мембранною субодиницею (цитохром b558). При інтенсивному поглинанні O_2 , відомому як дихальний вибух, NADPH зменшує молекулярний кисень в фагосомі до $\cdot O_2^-$ чи

H_2O_2 ; це створює летальні рівні АФК, які можуть зруйнувати заражений патоген [33]. По мірі того як, фагоцитуючі макрофаги та нейтрофіли руйнують мікроби в фагосомах, вони виділяють високу концентрації H_2O_2 , це уповільнює ріст сусідніх бактерій.[34].

Бактерієстатичні ефекти H_2O_2 в *Escherichia coli* були показані при концентраціях від 25 до 50 мкМ, які необхідні для знешкодження бактерій. Таким чином, здатність фагоцитів виділяти H_2O_2 у внутрішньоклітинне середовище, а не тільки утримувати його в фагосомі свідчить про антимікробні властивості АФК в ділянці рани.

H_2O_2 виконує роль основного вторинного посередника у відповідь на загоєння ран, його рівень регулюється на крайових ділянках рани місцевими антиоксидантними ферментами, СОД, ГП, що раніше було показано на моделях шкірної рани щурів [35]. Функціональна роль H_2O_2 є наслідком деяких його властивостей, він легко синтезується, легко розкладається, присутній в усіх типах клітин, має більш тривалий період напіврозпаду, ніж радикальні АФК, його невелика незаряджена молекула дозволяє вільно дифундувати через мембрани та тканини.

Пероксид водню також стимулює проліферацію фібробластів людини та ендотеліальних клітин судин у порівняльній серії концентрацій [36]. Встановлено, що 500 мкМ H_2O_2 стимулюють продукування запального макрофагального білка (MIP)-1 α , який є хемотактичним лігандом для мононуклеарних фагоцитів, нейтрофілів, еозинофілів, базофілів та лімфоцитів [37]. Було також показано, що 100 мкМ H_2O_2 стимулює ангіогенез через сигналізацію судинного ендотеліального росту (VEGF) [38] і є хемотаксичним для кератиноцитів; Низькі рівні H_2O_2 також сприяють міграції та проліферації клітин кератиноцитів [39].

Вивчаючи поранені спинні плавці zebrafish, було показано, що H_2O_2 , що вивільняється механізмом подвійної оксидази, поширюється на краю рани

при зменшенні градієнта концентрації протягом декількох хвилин після пошкодження епітелію і це свідчить про швидкеутворення лейкоцитів [40].

Продукти первинної альтерації та клітини можуть викликати вторинну альтерацію. Вторинні пошкодження тканин можуть відбуватись по кисневозалежному АФК та кисневонезалежному (гідролітичні ферменти) механізмам.

Кисневозалежні пошкодження пов'язані з утворенням лейкоцитами АФК, що активують процеси перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) плазми крові та клітинних мембран. Наприклад, у випадку гнійних ран, в зоні запалення виникає окисний стрес, тобто функціонування антиоксидантної системи порушується. Утворені при цьому АФК та перекиси посилюють деструкцію клітин, призводячи до утворення вторинних некрозів, збільшенню площі ураження, спричинюють мікроциркуляторні порушення.

З моменту утворення ранового дефекту відбувається зменшення активності ендогенної антиоксидантної системи (АОС). Активність ферментативних та неферментативних компонентів АОС (супероксиддисмутази, каталази, глутатіонпероксидази (ГП), глутатіон -S-трансферази, аскорбінової кислоти, вітаміну А та глутатіону) в умовах гнійних інфікованих ран знижується протягом перших 7 днів та відновлюється лише на 14-16 добу [41, 42]. Кількість продуктів ПОЛ (малоновий діальдегід) залишається на високому рівні та знижується лише через 14 днів. Основною кисневонезалежною ланкою вторинної альтерації є гідролітичні ферменти, які руйнують компоненти міжклітинної рідини та клітинні елементи сполучної тканини. Нейтральні протеази такі як, колагеназа, еластаза, катепсини, желатинази, руйнують колаген, еластин та базальні мембрани. Кислі протеази викликають деструкцію глікопротеїдів та протеогліканів.

Через 48 годин, після ушкодження, посилюється міграція моноцитів із сусідніх кровоносних судин та утворюються нові генні профілі експресії, вони диференціюються в макрофаги, які активуються шляхом хемокінового

сигналінгу, можуть виконувати роль клітин, які являють собою антигени та допомагають нейтрофілам у фагоцитозі [43].

Фаза регенерації. Цей етап відповідає за закриття самого ураження, яке включає ангиогенез, фіброплазію та реепітелізацію. Грануляційна тканина починає формуватись у вигляді окремих островців вистилаючи дно рани. Характеризується інтенсивним новоутворенням капілярів, навколо яких розташовані тучні клітини, які секретують біологічно активні речовини, сприяючи проліферації капілярів.

Фібробласти з'являються в рані протягом 2-3 діб після її утворення і домінують серед клітинних популяцій в перший тиждень. Ранній матрикс в значній мірі складається з фібронектину і гіалуронатів, виконуючи роль базиса, на якому фібробласти можуть мігрувати і фіксуватися. Джерело цих фібробластів - похідні фіброцитів регіонарної сполучної тканини і периваскулярної адвентиції. Фібробласти продукують різноманітні субстанції, необхідні для ранового загоєння, в тому числі глікозаміноглікани (GAG) і колаген. Протеоглікани - протеїни, до яких прикріплюються полісахариди. Чотири головних глікозаміноглікана включають гіалуронову кислоту, хондроїтин-4-сульфат, дерматин сульфат і сульфат гепарину [44]. Вони формують аморфний гель, який грає важливу роль у відкладенні і агрегації колагенових фібрил [45].

У період фібробластичної проліферації продукується колаген. Кількість колагену постійно зростає протягом 3-ьох тижнів, досягаючи стабільного рівня, коли колагеновий синтез стає рівним колагеновому лізису. Збільшення вмісту колагену в рані в фазі фіброплазії корелює зі збільшенням міцності рани.

Синтез колагену починається як внутрішньоклітинний процес, в результаті якого спочатку утворюється мономер, активно секретується в екстрацелюлярне ранове середовще, де відбувається полімеризація в колагенові фібрили. У них потім ковалентно формуються поперечні зв'язки, внаслідок чого значно зростає міцність рани.

Сигналом, що активізує продукцію колагену, є комбінація факторів росту, стимульованих гіпоксією і продуктами анаеробного метаболізму (молочна кислота) [46]. На 1-му тижні після поранення активність синтезу колагену досягає максимуму, і незрілі колагенові фібрили стають гістологічно видимими в рані. Колаген - основний будівельний матеріал сполучної тканини, що утворює три поліпептидні ланцюги, які закручена проти годинникової стрілки

Нормальний колагеновий синтез відбувається внутрішньоклітинно і триває в позаклітинному просторі. Вміст колагену в рані регулюється балансом між продукцією і лізисом колагену за допомогою колагенази. Активність колагенази контролюється багатьма факторами, включаючи паратиреоїдні гормони, адренкортикостероїди і колхіцином. Контроль за цими процесами відкриває терапевтичні можливості для втручання в процес ранового загоєння і запобігання патологічному формуванню рубця.

У фазі рубцювання і епітелізації відбувається перебудова грануляційної тканини та заміщення її зрілою сполучною тканиною, та формування рубця. На цьому етапі колаген третього типу заміщується на колаген I типу, знижується вміст фібронектину. Важливу роль у цьому процесі відіграють металопротеїнази (ММР-1,2,3,9), забезпечуючи деградацію компонентів позаклітинного матриксу [47]. Баланс активності ММР та тканинного інгібітору (ТІМР) визначає об'єм міжклітинного матриксу та ймовірність утворення атрофічних чи гіпертрофічних рубців. Гранулярна тканина перетворюється в зрілу фіброзну тканину, бідну на судини, з грубими колагеновими волокнами та фіброцитами [48].

В основі механізму послідовного ремоделювання рубця лежить баланс між руйнуванням колагену під дією колагенази та синтезом нового колагену. Колагенази та інші матриксні металопротеїнази призводять до деградації колагену I та III типів, у зрілій шкірі колагени цих типів присутні у співвідношенні 4:1. Стягування рани забезпечує організований порядок фібрил

та міцність тканини. З часом чисельність макрофагів та фібробластів знижується шляхом апоптозу [49].

Повне загоєння рани визначається як таке, що призводить до повного відновлення нормальної анатомічної будови, функцій та зовнішнього вигляду тканини. Певні системні та місцеві фактори можуть уповільнювати загоєння рани, викликаючи порушення збалансованих процесів відновлення тканин, що призводить у свою чергу до хронізації патологічного процесу.

1.2. Дерматотропні препарати. Характеристика та застосування

Важливим етапом лікування є локальна обробка ранового ложа. Цей метод лікування дозволяє прискорити самовільне загоєння рани та посилити ефективність використання інших терапевтичних заходів [50, 51]. Лікування пошкоджень шкіри незалежно від їх причин проводять для відновлення чи покращення фізіологічних функцій шкіри.

На жаль, традиційні методи профілактики та лікування ранової інфекції за допомогою антибіотиків себе не виправдовують. Це пояснюється високими темпами еволюції ранової мікрофлори та швидким формуванням її стійкості до антибактеріальних препаратів [52, 53].

Для терапії використовують дерматотропні препарати, що направлені на усунення специфічного захворювання, а також посилення захисту від дії факторів зовнішнього середовища та запобігання втрати білків, електролітів та води [54].

Ранозагоювальні засоби можна приймати зовнішньо, системно, або вводити безпосередньо у вогнище запалення.

Препарати для зовнішнього застосування мають ряд переваг, серед яких: простота у застосуванні та моніторингу лікування. До того ж, більшість з цих препаратів не потрапляють до системного кровотоку та, відповідно, не

викликають ускладнень в організмі. Також рідко спостерігається взаємодія з іншими лікарськими засобами[55].

Головна перешкода у використанні препаратів зовнішнього застосування – роговий шар епідермісу, а саме його подолання діючою речовиною – лімітуюча стадія всмоктування[56].

Швидкість та ступінь всмоктування препарату через шкіру залежить від багатьох факторів. Діючі речовини зазвичай змішані з формоутворюючими або основою. Основи суттєво впливають на всмоктування, та при правильному їх підборі можуть позитивно впливати на шкіру. Основа повинна легко наноситися та видалятися, не викликати подразнення та псувати зовнішній вигляд шкіри. Діюча речовина має добре зберігатися в основі та легко вивільнюватися з неї [57, 58].

Для лікування шкірних захворювань часто надають перевагу фармцевтичним препаратам місцевої дії, проте необхідно враховувати ймовірність розвитку системних ефектів при їх застосуванні.

Місцевому медикаментозному лікуванню в загальній схемі терапії ран відводиться допоміжна, проте не альтернативна, роль. Тобто, воно має доповнювати активне хірургічне лікування, але не замінювати його.

Задачі медикаментозного лікування ран можна представити в наступному вигляді (табл. 1.1.).

Таблиця 1.1

Алгоритм місцевого медикаментозного лікування ран на різних стадіях ранової репарації

Перша фаза – запалення	«Альгофін» (ХФЗ «Красная звезда», Україна); «Аргосульфан» 2% (Jelfa, Польща); «Дермазин» 1% (Lek, Словенія); «Бактробан» (Smithkline Beecham, Великобританія); «Гентаміцин» «Белмедпрепараты», Білорусь; «Київмедпрепарат», Україна); «Іруксол-моно»(Knoll, Німеччина); «Левоміцетин» («Дарниця», Україна); «Мадекасол» (Syntex, Швейцарія); «Метилурацил» («Дарниця», Україна); «Мірамістин» («Дарниця», Україна); «Нітацид-Дарниця» («Дарниця», Україна);
Друга фаза регенерація	«Метилурацил-Дарниця» («Дарниця», Україна); «Бетадин» (Egis, Угорщина); «Вундехіл» * («ЕЙМ», Україна); «Вулнузан» * (Sopharma, Болгарія); «Карбодерм-Дарниця» * («Дарниця», Україна); «Граумель С» * (Heel, Німеччина); «Репареф» («Белмедпрепараты», Білорусь);
Третя фаза реорганізація рубця –	«Актовегін»* (NucomedAustria, Австрія); «Солкосерил» (Solkobasel, Швейцарія); «Бепантен» (RocheAG, Німеччина); «Мефенат» («Фармак», Україна).

За даними табл. 1.1, у кожній фазі ранового процесу потрібно використовувати препарати з відповідними видами фармакологічної дії та різною осмотичною активністю [59].

Препарати для лікування ран в I фазі ранового процесу.

Виходячи з патогенезу ранового процесу, вважають, що фармакологічні препарати, які приймають в I фазі, мають надавати антимікробну, дегідратуючу, некролітичну та обезболюючу дію, тобто сприяти пригніченню умовно патогенної мікрофлори та якнайшвидшому загоєнню рани, створюючи при цьому умови для наступної репарації.

Однак більшість препаратів має вузько направлену дію: лише антимікробну чи дегідратуючу, або некролітичну, тобто не забезпечують всебічної дії на раневий процес. В цьому полягає їх головний недолік.

Препарати для лікування ран в II фазі ранового процесу.

Негативна дія мазей у II фазі ранового процесу першочергово пояснюється їх високою осмотичною активністю. Згідно з цим препарати для лікування цієї фази повинні володіти відмінними від препаратів, які використовують на першій фазі, властивостями. В першу чергу вони мають стимулювати регенеративні процеси в рані, сприяти росту грануляцій та прискорювати епітелізацію. Необхідно також щоб ці препарати надійно захищали гранулярну тканину від вторинної інфекції та пригнічували в рані мікрофлору, що лишилась, мали певний протизапальний ефект, покращували регіональну мікроциркуляцію та обмінні процеси у тканинах [60]. Часто використовують різні мазі з антибіотиками на жировій основі, індиферентна основа яких перешкоджає репаративним процесам в рані, а наявність антибіотику в складі забезпечує певну протимікробну активність, що залежить від чутливості мікрофлори до даного антибіотику [61]. Для посилення ефекту препаратів до їх складу вводять інгредієнти, що здатні розширити спектр дії мазей, доповнюючи їхню антимікробну дію протизапальним чи стимулюючим впливом на рани.

Більш доцільно приймати ті препарати, що могли б одночасно мати антимікробний ефект та не перешкождали дренажу, сприяли росту грануляцій. Приймати в II фазі мазі на гідрофільній основі не доцільно, бо внаслідок високої осмотичної активності вони «висушують» грануляції.

Лікування ран в III фазі ранового процесу (реорганізація рубця та епітелізація).

Лікування в цій фазі має схожу мету з задачею II фази: збереження рани від травмування та стимуляцію епітелізації. Рекомендовано використання індиферентних мазей та фізіотерапевтичних процедур [62].

Отже, узагальнюючи результати, можна стверджувати, що існує потреба в ефективних комбінованих препаратах, які будуть ефективними на всіх стадіях ранового процесу. Також лишається актуальним питання про створення та

дослідження нових фармакологічних препаратів вітчизняного виробництва на основі речовин рослинного та синтетичного походження.

1.3. Меланін: властивості та застосування в якості дерматотропного засобу

У сучасній фармації одним з актуальних напрямків є пошук нових джерел біологічно активних речовин, які водночас володіють як високими сорбційними властивостями так і біологічною активністю. Основними критеріями до вибору таких речовин є біосумісність та нетоксичність. Цим умовам відповідають природні поліфенольні сполуки. Незначний асортимент на фармацевтичному ринку України вітчизняних лікарських засобів з дерматотропною дією, які не тільки попереджують інфікування рани і прискорюють гоєння раневої поверхні, але і запобігають утворенню келоїдного рубця, обумовлюють пошук і розробку нових препаратів.

Значну групу природних конденсованих фенолів складають меланінові пігменти, наявні у всіх живих організмів. Унікальною властивістю меланінових пігментів, які забезпечують високу реакційну здатність і антиоксидантну активність, є їх стійкий вільнорадикальний стан. Залежно від умов радикальні мономери меланінових пігментів здатні перебувати у вигляді фенокиських або семихінонних радикалів. Широкий спектр біологічних активностей, а також економічна доступність природних меланінових пігментів, дозволяє розглядати їх в якості доступних і економічно вигідних лікарських субстанцій, що володіють, в першу чергу, антиоксидантною і фотопротекторною активністю.

Поліфеноли є природними, синтетичними або напівсинтетичними органічними сполуками, які мають широкий спектр біомедичного застосування. Результати проведених досліджень свідчать про те, що споживання з їжею чи нанесення на шкіру рослинних фенолів може полегшити симптоми та

загальмувати розвиток різних шкірних захворювань. Через їх природне походження і низький рівень токсичності, фенольні сполуки є перспективним інструментом в усуненні причин і наслідків старіння шкіри, шкірних захворювань, а також уражень шкіри, в тому числі ран і опіків[63, 64].

Грибні меланінові пігменти до недавнього часу не розглядались як основа для створення лікувальних препаратів, виключенням є меланін із чаги березової (*Inonotus obliquus*), який входить до складу препарату «Бефунгін».

За результатами досліджень була виявлена висока ефективність застосування таких поліфенолів у якості ресвератрола і флаванола, під час лікування інсульту, ракових пухлин та ниркової недостатності[65]. Також було показано, що Epigallocatechingallate – поліфенол, виділений з зеленого чаю – прискорює загоєння опіків у щурів [63].

Меланіни – це високомолекулярні полімери неправильної форми, темно-коричневого кольору [66]. Ці пігменти є аморфними, нерозчинними і часто виготовлені з використанням природних джерел. Як наслідок вони часто тісно пов'язаними з іншими клітинними матеріалами[64,67]. Меланін з'явилися дуже рано в більшості живих царств на землі[68, 69], зокрема багато грибів синтезують меланіни [70, 71]

Меланіни містяться в шкірі, волоссі, райдужній оболонці ока, тканинах, вовні та інших структурах різних організмів. Експериментальні роботи з вивчення природи меланінів і особливостей їх метаболізму виявили поліфункціональність цих сполук. Незважаючи на те, що хімічна будова природних меланінів до цих пір остаточно не з'ясована через їх надзвичайно складну полімерну будову та високе різноманіття, фармакологічні властивості останніх вивчалися досить інтенсивно. Особливості будови цих пігментів, які роблять їх схожими на молекулярні сита та іонообмінні смоли, їх висока електронно-акцепторна здатність, наявність стабільних вільних радикалів у високих концентраціях та яскраво виражені напівпровідникові властивості дозволяють успішно використовувати меланіни в медицині, фармакології та

інших галузях. Показано, що завдяки стабільному вільнорадикальному стану і здатності до оберненого окислювально-відновного потенціалу меланіни забезпечують захист організму в екстремальних умовах, за яких в клітині генеруються активні вільні радикали, що потенційно здатні порушувати процеси її нормального функціонування [72].

Меланіни поглинають ультрафіолетові промені, і тим самим захищають тканини глибоких шарів шкіри від променевого ушкодження. Меланіни можуть мати знижену концентрацію, і навіть зовсім відсутні - у альбіносів[73, 74].

У результаті експериментів було виявлено, що тривале введення водорозчинного меланіну перешкоджає розвитку у тварин надмірних емоційно-реактивних проявів і достовірно знижує афективні реакції у емоційних щурів. При цьому виявлено, що препарат запобігає утворення виразок, знижує число крововиливів у слизовій шлунка і перешкоджає зниженню загальної маси тіла тварин в умовах стресу[75].

Вперше «чорні дріжджі» *Nadsoniella nigra* були знайдені академіком Б.Л. Ісаченко близько 100 років назад у водах Арктики на глибині 5-10 м., потім *Nadsoniella nigra* var. *Nesuelica*були ізольовані та використані для отримання меланіна [76-78].

Згідно досліджень Лях С.П. мікроорганізми *Nadsoniella nigra* помітно відрізняються від всіх відомих і описаних в літературі по ряду ознак. Наприклад, меланін дріжджової клітини синтезується структурами, які, на думку автора, є аналогами меланосом клітин хребетних тварин.Штами, ізольовані Лях С.П., накопичують і виділяють активну речовину, яка автор назвав «астромеланіном» [77]. За даними, опублікованими в літературі і патентах, астромеланін володіє унікальними властивостями - на відміну від інших меланінів, має високу ступінь впорядкованості структури і надає потужний протипухлинну дію [78].

Штам *Nadsoniella nigra* X-1, використаний при створенні препарату Анкарцин як і штам, виділений і описаний в 1914 році, є дріжджеподібним

грибком, але, на відміну від останнього, не тільки накопичує «захисні» речовини, але і виділяє гранули в навколишнє середовище, що особливо важливо для культивування. Можливо, це пов'язано з більш жорсткими (надкритичними) умовами, при яких він був виведений.

Скельна порода Антарктики (місце проживання *Nadsoniella nigra* в природі), піддається постійному впливу ряду руйнівних факторів: жорсткої УФ-радіації (вона тут вище, ніж в будь-якому іншому місці земної кулі), різких перепадів температур (від нуля до мінус 70-80 °), а також стихійного впливу штормових вітрів, морської, талої води, різних солей, льоду і т.д.

Штам *Nadsoniella nigra X-1* - виведений в лабораторному мікрокліматі. З цією метою дріжджі, безпосередньо з острова Галіндез, поміщали в умови значно жорсткіші, ніж в самій Антарктиді. В такому середовищі з виживали одиниці виключно ті, які виділяли гранули «захисної» речовини з багаторазово посиленою активністю, яка перевершує всі раніше отримані зразки. Саме ці дріжджі продукували ПФК, на основі якого створено новий препарат Анкарцин. Гранули цієї речовини змушують організм гранично мобілізувати всі свої сили, закладені в ньому природою, для виживання і подолання хвороб.

У дослідженнях Моссе І. Б. та ін. (Інститут генетики і цитології НАН Білорусі, Мінськ), Жаворонков Л. П. та ін. (Медичний радіологічний науковий центр РАМН, 249020, Обнінськ, Росія) показано, що меланін є унікальним засобом профілактики генетичних і онтогенетичних наслідків опромінення [79-81]. Особлива цінність досліджень названих вчених полягає в тому, що досліді проводили в природних умовах. Меланін знижує накопичення радіонуклідів в організмі (активний сорбент уран і трансуранові елементи). Меланіни є одними з найпотужніших антиоксидантів [76].

Меланіни визначають забарвлення шкіри і волосся широко поширені в рослинних і тваринних тканинах, а також у найпростіших, в тому числі меланіни містяться в клітинах дріжджеподібних грибів *Pseudonadsoniella brunnea* (штам X1-M), які були висіяні з вертикальних скель острова Галіндез

Аргентинського архіпелагу (Українська антарктична станція «Академік Вернадський»). В клітинах *Pseudonadsoniella brunnea* меланін синтезується структурами, які, є аналогами меланосом клітин хребетних тварин. Ізольовані штами виділяють меланін. Цей меланін, продуцентом якого є дріжджеподібні гриби, може розглядатися як перспективна субстанція для створення нових лікарських засобів через свої цитотоксичні, антистресові, дерматотропні, антиоксидантні та інші властивості. Крім того, меланін *Pseudonadsoniella brunnea*, який має високу ступінь впорядкованості структури, справляє потужну протипухлинну дію [82, 83].

Дріжджеподібні гриби *Pseudonadsoniella brunnea* – це мікроорганізми-екстремофіли, які виживають у найбільш жорстких умовах існування - в Антарктиді. Вони виробляють (синтезують, накопичують, виділяють) унікальні активні "захисні" речовини. Є частиною імунної системи мікроорганізму, перешкоджають накопиченню токсинів і структурним змінам в його клітинах. Ці речовини активізують обмінні процеси мікроорганізмів, служать бар'єром від негативного впливу навколишнього середовища [84, 85].

Мікроорганізм у жорстких умовах існування виробляє ПФК (поліфенолкарбоновий комплекс), що містить максимальну кількість еумеланіна - одного з найпотужніших засобів захисту від особливо агресивного середовища існування [86].

З *Pseudonadsoniella brunnea* вдалося отримати комплекс меланіну, тирозину і ДОФА, який став, наприклад, основою для розробки унікальної біологічно активної добавки «Анкарцин», що не має аналогів в світі; препарат має антиоксидантну, імуномодулюючу, антирадикальну, адаптогенну дію. Унікальність його полягає в тому, що, надаючи допомогу в профілактиці і комплексному лікуванні хвороб шлунково-кишкового тракту, він є ефективним профілактичним онкопротекторним засобом.

Меланін, є полімером певних відомих мономерів, але це, можливо, не є остаточною полімерною структурою. Меланін, скоріше за все, складається з

різних олігомерних компонентів, складених різними випадковими шляхами, що складають остаточну структуру, яка в значній мірі характеризується структурною та хімічною неупорядкованістю [87-89].

Біосинтетично, біополімери еумеланіну виникають в межах органел, які називаються меланосомами шляхом каталізованого тирозиназою окиснення тирозину шляхом окисної полімеризації 5,6-дигідроксиіндолу (DHI), 5,6-дигідроксиндол-2-карбонової кислоти (DHICA) та інших біосинтетичних проміжних сполук [87-89].

Згідно досліджень N. M. Permyakova та колег, виявлено цвітер-іонний характер еумеланінової макромолекули за наявності заряджених NH_2^+ та $-\text{COO}^-$ груп у твердому зразку еумеланіну, що є продуктом життєдіяльності чорних дріжджів *Nadsoniella nigrasp.* X - 1. Поліамфолітичні властивості еумеланіну були яскраво виражені потенціометричним титруванням. Було виявлено деякий надлишок (на 7 моль%) вторинних аміних групи щодо карбонових. Кислотні властивості обох груп були характерними. Значення pK_0 були рівними 4.44 і 9.27 для карбонової та відповідно аміної групи. Через сильне ущільнення меланінових макромолекул поява нерозчинної фракції у водному середовищі спостерігалася в кислих областях. Таким чином, було показано, що стан і розчинність меланіну в водному середовищі визначається складним балансом електростатичних взаємодій та водневих зв'язків [90].

Досвід ефективного використання еумеланіну дріжджеподібних грибів дає змогу сподіватися на подальші перспективи щодо його застосування в медицині та фармакології, в тому числі в складі препаратів, що застосовуються для прискорення загоєння ран різної етіології.

Наведений огляд літератури свідчить про актуальність розробки нових дерматотропних препаратів та перспективи створення на основі меланіну мікробіального походження нової фармакологічної композиції з дерматотропною дією, що обумовлює мету та завдання дисертаційної роботи.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Об'єкт дослідження

Дослідження проводили на білих лабораторних щурах-самцях масою 200-250 г, n=220. Тварин утримували у віварії Навчально-наукового центру

“Інститут біології” Київського національного університету імені Тараса Шевченка за стандартних умов температурного режиму (21°C), освітлення (12/12 год), вологості та раціону харчування (повноцінний корм для лабораторних тварин К – 12-4, „Різан-1”, Україна), згідно “Стандартні правила по упорядкуванню, устаткуванню та утриманню експериментальних біологічних клінік (віваріїв)”.

Експерименти проводили згідно з етичними принципами, ухваленими Першим національним конгресом України з біоетики[91], міжнародним угодам, національному законодавству у цій галузі [92-94].

2.2. Схема експериментів

Перед початком хронічного експерименту щурів витримували на карантині, по завершенню якого лабораторних тварин оглядали і зважували. Тварин індивідуально помітили нанесенням надсічок на вушні раковини. Всі больові процедури та операції проводились під загальним знеболюванням тіопенталом натрію (Thiopental sodium, BiochemieGmbH/Austria) у дозуванні 60мг/кг маси тварини. Тварин тримали в індивідуальних клітках в стандартних умовах віварію протягом всього експерименту.

Експеримент проведено у дві серії, на першій серії тварини були поділені на IV групи, які були поділені на 5 підгруп по 7 тварин у кожній.

I – контрольна група щурів, яким не моделювали рани шкіри;

II – група, щурам моделювали вирізану площинну рану, загоєння відбувалось самостійно, без лікування;

III – група, щурам моделювали вирізану площинну рану, уражену ділянку обробляли 0,5% розчином карбополу ((універсальний розчинник препаратів для надання їм гелеподібної консистенції («Carbopol 980»));

IV– дослідна група тварини з експериментальними вирізаними площинними ранами, яким на уражену ділянку наносили отриманий нами мікробіологічним шляхом меланін (продуцентом якого є антарктичні чорні дріжджеподібні гриби *Pseudonadsoniella brunnea*), 0,1 % концентрації, розчинений в 0,5 % карбополі.

У другій серії експерименту, тварини були поділені на 4 групи, які були поділені на 5 підгруп по 7 тварин у кожній.

I – контрольна група щурів, яким не моделювали рани шкіри ;

II– група, щурам моделювали хімічний опік шкіри, загоєння відбувалось самостійно, без лікування;

III – група, щурам моделювали хімічний опік, уражену ділянку обробляли 0,5% розчином карбополу;

IV– дослідна група тварини з хімічним опіком, яким уражену ділянку обробляли 0,5 % розчином карбополу з розчиненим у ньому 0,1% меланіном.

Щоденно, починаючи з 1-го дня після моделювання рани та до повного загоєння, на ранову поверхню тварин 3-ї та 4-ї груп наносили досліджувані препарати.

Для комплексної оцінки перебігу ранового процесу використовували методи клініко-візуального, планіметричного, біохімічного, молекулярного та гістологічного дослідження ран. Клініко-візуальні та планіметричні показники вимірювали щоденно.

Матеріал для біохімічних досліджень відбирали на 3, 6, 9, 14 добу та в день повного загоєння рани після початку лікування. Тварин виводили з експерименту шляхом декапітації.

2.3. Модель повношарових вирізаних площинних ран

Площинні рани відтворювали на попередньо депільованій ділянці шкіри, у наркотизованих щурів. Для цього шкіру вирізали за допомогою хірургічних скальпеля та пінцету, розміром $1 \times 1 \text{ см}^2$. Кровотечу зупиняли за допомогою стерильних марлевих тампонів та 3% розчину перексиду водню. Лікування починали одразу після відтворення ран і до повного загоєння [95].

2.4. Опіки, викликані розчином кальцієвої солі

Хімічний опік шкіри викликали підшкірним введенням 0,1 мл (10%) CaCl_2 . Звертали увагу на стандартизованість одержуваних ран, розміри яких не повинні були перевищувати 400 мм^2 . На 4-5 день здійснювали некротомію вражених ділянок, після чого розпочинали лікування ран до повного загоєння, а саме: повної епітелізації рани [96].

2.5. Приготування фармакологічної композиції на основі меланіну

Для приготування фармакологічної композиції на основі меланіну, зважували 0,1 г карборолу (Carborol 980) та 0,7 г меланіну та розчиняли в 20 мл дистильованої води та додавали 7-8 крапель 18% NaOH для загустіння (настоювали 2 години) в темному приміщенні. Готову фармакологічну композицію використовували на наступний день.

2.6. Отримання сироватки крові

Сироватку крові ссавців отримували з цільної крові. Кров залишали при 37°C на 4 години для вилучення фібриногену та супутніх білків. На наступному етапі чистою сухою скляною паличкою згусток крові обережно

відділяли від стінок пробірки для пришвидшення отримання сироватки і центрифугували протягом 40 хв. при 2000 g. Отриманий супернатант (сироватку) швидко відокремлювали від формених елементів крові, переносили епендорфи та заморожували при -20°C до подальшого використання [97].

2.7. Отримання гомогенату шкіри тварин

Після декапітації тварин, рану з прилеглою до неї здоровою ділянкою шкіри висікали скалпелем, після чого поміщали в епендорф додаючи фізіологічний розчин та заморожували. В подальшому дослідженнях шкіру гомогенізували у 0,9% NaCl розчині на холоді. Гомогенат фільтрували крізь чотири шари нейлонової сітки та використовували для проведення біохімічних досліджень.

2.8. Планіметричні показники

Для визначення площі ранової поверхні рани фотографували цифровою фотокамерою (Nikon-D3100), зображення переносили на комп'ютер, калібрували та вимірювали площу ранового пошкодження за допомогою програми ImageJ (NIH, USA). Результати виражали у відсотках від початкової площі.

Також розраховували наступні планіметричні показники [98, 99]:

1) площу загоєння ($S_{\text{заг.}}$, мм^2) за формулою: $S_{\text{заг.}} = S_{\text{вихід.}} - S_{\text{досл.}}$;

2) швидкість загоєння ($V_{\text{заг.}}$, $\text{мм}^2/\text{добу}$) за формулою: $V_{\text{заг.}} = S_{\text{заг.}}/n$, де n – кількість днів лікування.

2.9. Гістологічні методи дослідження

Для досліджень на світлооптичному рівні вирізали ділянку тканини, яка містить рану з прилеглою до неї неушкодженою шкірою разом з підшкірною клітковиною. Зразки фіксували в 10%-му розчині нейтрального формальдегіду та піддавали рутинній гістологічній обробці. Гістологічні зрізи фарбували гематоксиліном і еозином та за Романовським – Гімзою [100].

2.10. Визначення фізико-хімічних показників шкіри

Температуру зварювання шкіри визначали з використанням приладу ПТЗ-1 (СРСР). Шматочок шкіри 3x5 см фіксували за допомогою гачків апарата, заливали водою та повільно нагрівали. Під впливом термічного фактора шкіра починала лінійно скорочуватися, що призводило до натягнення шнура і приведення в дію індикатора часового типу. Температуру зварювання визначали за ртутним термометром, і вона відповідала початку руху стрілки індикатора [101]. Визначення загального вмісту азоту проводили за методом К'ельдаля [102].

При дослідженні функціональних властивостей сполучної тканини визначали вихід з колагену желатини гідротермічним зварюванням шкіри [102]. Для визначення відсотка вологи у тканині зразки шкіри зважували на аналітичних вагах і висушували до постійної маси при 80 °С у сушильній шафі СНОЛ 3,5.3.5.3.5./І1.

2.11. Визначення концентрації білка за методом Лоурі

Метод базується на утворенні забарвлених продуктів ароматичних амінокислот з реактивом Фоліна у поєднанні з біуретовою реакцією на пептидні зв'язки [103].

2.12. Визначення вмісту супероксидного аніон-радикалу та пероксиду водню

Інтенсивність генерації супероксидного аніон-радикалу у біологічному матеріалі визначають за накопиченням ХТТ-формагану [104, 105]. Вміст пероксиду водню встановлювали спектрофотометрично з використанням барвника ксиленол оранж [106].

2.13. Визначення продуктів перекисного окиснення ліпідів

Вміст дієнових кон'югатів визначали в гептан-ізопропанольному екстракті спектрофотометричним методом, а шиффових основ – флуориметричним методом [107, 108]. Вміст ТБК-активних сполук визначали по реакції з тіобарбітуровою кислотою [109].

2.14. Визначення активності супероксиддисмутази та каталази

Метод заснований на здатності супероксиддисмутази конкурувати з нітросинім тетразолієм (НСТ) за супероксидні аніони, що утворюються в результаті аеробної взаємодії відновленої форми нікотинамідаденіндинуклеотида (НАД[•]Н) та феназинметасульфата (ФМС). У результаті цієї реакції НСТ відновлюється з утворенням гідразинтетразолію. У присутності СОД процент відновлення НСТ зменшується. Активність ферменту визначали за калібрувальною кривою [110].

Принцип методу полягає в тому, що каталаза руйнує субстрат H_2O_2 , незруйнована частина пероксиду водню при взаємодії з солями молібдену утворює стійкий забарвлений комплекс. Активність визначали у нМоль H_2O_2 на хвилину на 1 мг білка [111].

2.15. Визначення активності глутатіонової ланки антиоксидантної системи

Глутатіонпероксидазну активність (КФ 1.11.1.9) оцінювали за зменшенням вмісту GSH у реакції з реактивом Елмана [112]. Глутатіонтрансферазну активність (КФ 2.5.1.18) визначали за швидкістю утворення кон'югату GSH із 1-хлор-2,4-динітробензолом [112]. Глутатіонредуктазну активність (КФ 1.8.1.7) вимірювали за зменшенням оптичної густини проб у результаті окиснення НАД-ФН [112].

Вміст відновленого та окисненого глутатіону визначали спектрофлюориметричним методом із використанням ортофталевого альдегіду при різних значеннях рН середовища [113].

2.16. Визначення рівня сульфгідрильних груп

Рівень загальних, білок-зв'язаних та небілкових сульфгідрильних (SH)-груп вимірювали за методом Елмана [114].

2.17. Дослідження молекулярних маркерів запальних процесів на різних стадіях ранового процесу

РНК отримували за методом [115]. Відтворюваність результатів ампліфікації було перевірено в паралельних експериментах шляхом повторення кПЛР на зразках РНК усіх тварин, із кожним праймером не менше трьох разів. Після кожного циклу ампліфікації зчитувалась флуоресценція барвника SYBR Green I, а по закінченні реакції будувалась крива плавлення для контролю утворення димерів праймерів та специфічності реакції. Початкову кількість мРНК обраховували за порівняльним СТ методом « $\Delta\Delta\text{CT Method}$ », ефективність ПЛР реакцій була однаковою $E_x = (10^{-1/\text{slope}})^{-1}$, $\text{slope} < 0,1$ [116].

Для попереднього визначення концентрації РНК та її якості в отриманих зразках (для відбору високомолекулярних зразків РНК) проводили електрофорез в агарозному гелі. Для цього наносили виділену РНК на 2,0 % агарозний гель у 0,5 кратному ТВЕ буфері. Розділення проб РНК проводили при 5-10 В/см.

Гелі фарбували водним розчином бромистого етидію (10 мкг/мл) – 15 хв., поміщали їх на ультрафіолетовий освітлювач (трансільюмінатор) із довжиною хвилі 254 нм для візуалізації або фотографували в УФ – світлі цифровим фотоапаратом після гель-електрофорезу в денатуруючих умовах (зادля подальшого визначення концентрації РНК, порівнюючи із стандартами, у програмах «RFLP Scan», «Image J» тощо). В якості стандарту використовували маркер молекулярної маси – “GeneRuler™ 100bp DNA Ladder” або певні стандарти молекулярних мас РНК (“Thermo Scientific”, Lithuania). Якість отриманих препаратів РНК визначали за наявністю електрофоретично розділених не деградованих смуг, що відповідають 18S та 28S рРНК.

Оптична густина $D = 1$ відповідає 40 мкг/мл РНК. Відношення величини D , що вимірювали при 260, до величини D , яку одержували при 280 нм (D_{260}/D_{280}), свідчила про чистоту нуклеїнової кислоти (чисті препарати РНК мають відношення D_{260}/D_{280} , що дорівнює 1,8 – 2,8; якщо препарат забруднений білком, ця величина менша). Потім розводили зразки РНК до концентрації 50 нг/мкл і зберігали у 2,5 об’ємах 96 % етанолу при -20°C .

Синтез кДНК та кількісну полімеразну ланцюгову реакцію в реальному часі (Real-time PCR, кПЛР) проводили за допомогою комерційного набору «Thermo Scientific Verso SYBR Green 1-Step qRT-PCR ROX Mix» («Thermo Scientific», Литва) в 25 мкл реакційної суміші, що містила буферний розчин для ПЛР, по 1 мМ кожного dNTP, до 3 мМ MgCl_2 , 200 од. зворотної транскриптази, 20 од. рибонуклеазного інгібітору, та 1 од. ДНК полімерази «Thermo-Start DNA Polymerase»), використовуючи по 0,4 мкмоль/л кожного праймера, проводили за таких, рекомендованих фірмою-виробником, температурних умов: синтез кДНК 50°C – 30 хв; ініціююча денатурація 95°C – 15 хв; далі 40 циклів: денатурація ДНК 95°C – 15 с; гібридизація праймерів 50°C – 35 с; добудова ланцюга 72°C – 30 с.; елонгація ампліфікатів 72°C – 5 хв.

У реакціях було використано такі послідовності праймерів: для *Ptgs2* (COX2 – циклооксигеназа 2) – прямий – TGCTGTTCCAACCCATGTCA та

зворотний - TGTCAGAAACTCAGGCGTAGT; для *Actb* (ген β -актину, що використовується в якості внутрішнього (ендогенного) контролю реакції завдяки конститутивній експресії) – прямий – TGGGACGATATGGAGAAGAT та зворотний – ATTGCCGATAGTGATGACCT.

Відтворюваність результатів ампліфікації було перевірено в паралельних експериментах шляхом повторення кПЛР на зразках РНК усіх тварин, із кожним праймером не менше трьох разів. Після кожного циклу ампліфікації зчитувалась флуоресценція барвника SYBR Green I, а по закінченні реакції будувалась крива плавлення для контролю утворення димерів праймерів та специфічності реакції. Початкову кількість мРНК обраховували за порівняльним C_T методом « $\Delta\Delta CT$ Method», ефективність ПЛР реакцій була однаковою $E_x = (10^{-1/\text{slope}}) - 1$, $\text{slope} < 0,1$. Відносну кількість мРНК зазначених генів нормалізували до мРНК *Actb*.

2.18. Дослідження бактеріальних властивостей меланіну

Для досліджень антибактеріальних властивостей застосовували метод аплікації меланінового гелю (1 г) на поверхню живильного середовища (NA – Nutrientagar, виробник Sigma-Aldrich, Іспанія). Попередньо поверхню середовища засівали суспензією тест-мікроорганізмів відповідно до рекомендацій (Про затвердження методичних вказівок "Визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів" Міністерство охорони здоров'я України (МОЗ) Наказ № 167 від 05.04.2007).

Кількість колонієутворюючих одиниць (КУО) визначали за допомогою денситометра «Vitek-2» («BioMerieux» (Франція). Навантаження КУО в суспензіях мікроорганізмів складало для бактерій 10⁵ кл/мл, для дріжджів – 10⁶ КУО/мл.

Як тест-культури використовували колекційні культури бактерій *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 та дріжджових грибів *Candida albicans*. Досліджували вплив на вказані тест-

культури мікроорганізмів 0,05%-ого меланінового гелю.

2.19. Статистична обробка результатів

Статистичну обробку результатів проводили за допомогою програмного забезпечення Statistica 7.0. Так як одержані дані були нормально розподіленими, ми визначали середнє значення (M) та стандартну похибку середнього (m) та порівнювали вибірки за допомогою t-критерія Стюдента.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХНЕ ОБГОВОРЕННЯ

МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН ШКІРИ ЩУРІВ ТА ПЛАНІМЕТРИЧНІ ПАРАМЕТРИ ШКІРИ НА РІЗНИХ ЕТАПАХ РАНОВОГО ПРОЦЕСУ ТА ПРИ ЗАСТОСУВАННІ НОВОЇ ФАРМАКОЛОГІЧНОЇ КОМПОЗИЦІЇ НА ОСНОВІ МЕЛАНІНУ

3.1. Біоцидний вплив фармакологічної композиції на тест культури мікроорганізмів

Резистентність збудників інфекцій до антибактеріальних препаратів (АБП) веде до збільшення термінів лікування хворих, підвищує летальність і збільшує тривалість епідемій. В економічному плані ріст антибіотикорезистентності у бактерій веде до суттєвого підвищення вартості терапії. Проблема антибіотикорезистентності мікроорганізмів визнана глобальною і в даний час однією з стратегічних задач у всьому світі є стримування розвитку і розповсюдження антибіотикорезистентних мікроорганізмів. Тому проведення лабораторних досліджень з метою визначення чутливості мікроорганізмів - збудників інфекційних хвороб людини до АБП набуває все більш важливого значення [117].

При сучасному лікуванні ран важливим є комплексний підхід з урахуванням фаз ранового процесу. Тому, для стимуляції загоєння ран доцільно використовувати такі препарати, які б моделювали властивості міжклітинної речовини сполучної тканини і відповідали б патогенезу ранового процесу. Поверхня ран є оптимальним середовищем для розвитку комплексу патогенних мікроорганізмів (серед яких переважають види роду *Staphylococcus aureus* (42,7 %), із грамнегативної мікрофлори часто трапляється *Pseudomonas aeruginosa* (10,3 %), рани можуть бути також інфіковані дріжджовими мікроскопічними грибами *Candida albicans* [118].

Мікробна контамінація суттєво змінює перебіг ранового процесу. Разом із механічним пошкодженням тканин, продукти бактерійної життєдіяльності можуть уповільнити первинні фази загоєння, підвищується осмотичний тиск та ацидоз у тканинах, порушується мікроциркуляція, що призводить до розвитку вторинних некрозів [119].

Створена нами суміш, що вміщує меланін та карбопол, є новою біологічно-активною фармакологічною композицією, в основі якої лежать

поліфеноли природного походження, що мають низьку токсичність, не акумулюються в організмі, мають високий рівень біотрансформації.

Нами було встановлено, що діаметр ділянок відсутності росту тест-культури *Staphylococcus aureus*, за умови дії 0,05 %-ої фармакологічної композиції склав $19,63 \pm 0,18$ мм, тест-культура *Staphylococcus aureus* є чутливою до дії дослідженої нами фармакологічної композиції (рис.3.1).

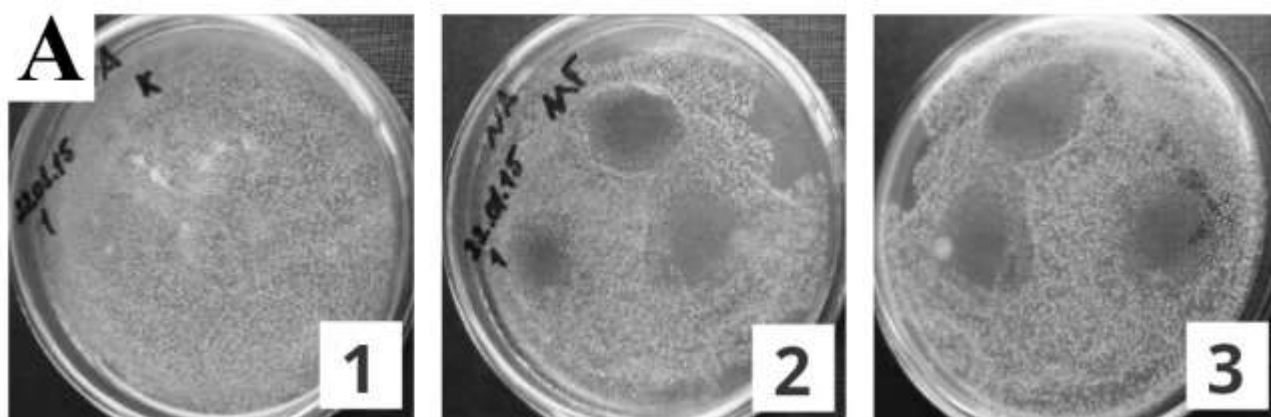


Рисунок 3.1. Бактерицидна дія фармакологічної композиції на тест-культуру *Staphylococcus aureus*. 1– контроль, 2,3 – зони пригнічення росту в місцях нанесення меланінового гелю (зворотня сторона чашки Петрі). 24 години культивування.

Оскільки в літературі різняться дані щодо визначення чутливості мікроорганізмів до дії АБП, при аналізі отриманих результатів ми використовували рекомендації Наказу МОЗ №167 від 05.04.2007 (щодо критеріїв інтерпретації результатів (діаметру зон затримки росту)).

Нами було показано, що діаметр ділянок відсутності росту тест-культури *Pseudomonas aeruginosa* склав $18,75 \pm 0,31$ мм, що відповідало помірній чутливості (рис.3.2).

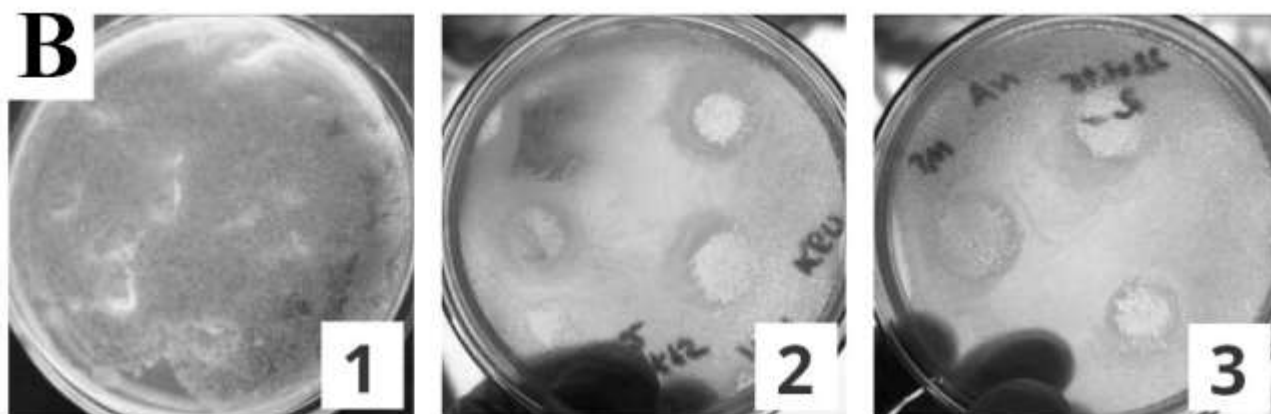


Рисунок 3.2. Бактерицидна дія фармакологічної композиції на тест-культуру *Pseudomonas aeruginosa*. 1 – контроль, 2,3 – зони пригнічення росту в місцях нанесення меланінового гелю (зворотня сторона чашок Петрі). 24 години культивування.

Впродовж наступних 48-72 годин діаметр ділянок відсутності росту *Staphylococcus aureus* та *Pseudomonas aeruginosa* не змінювався. На тест-культури дріжджових грибів роду *Candida* досліджувана композиція чинила фунгістатичну дію (констатували лише зони затримки росту, в яких спостерігали тимчасову відсутність росту дріжджів). Ймовірно, нанесення гелю через певні проміжки часу дозволить запобігти розвитку грибів роду *Candida* (рис. 3.3).

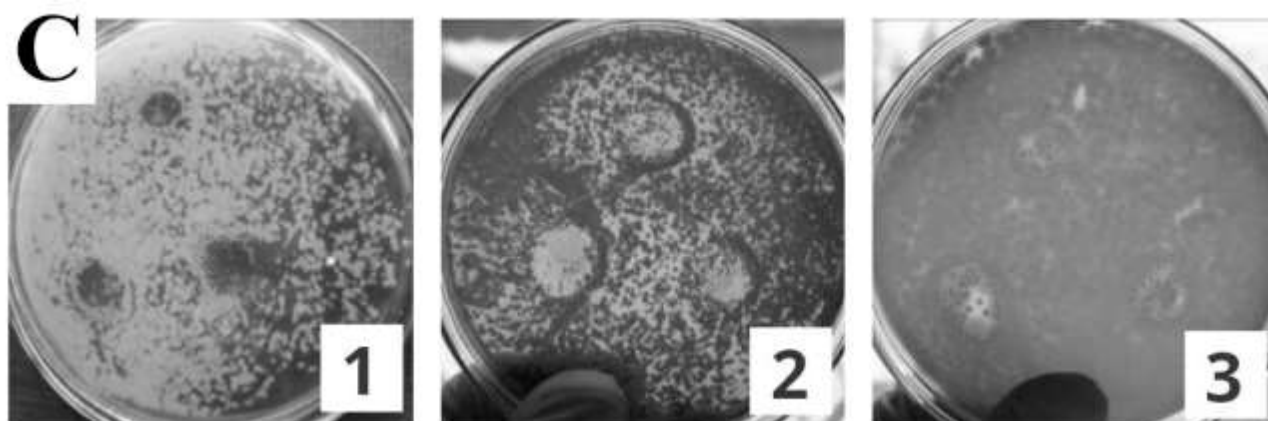


Рисунок 3.3. Фунгістатична дія фармакологічної композиції на тест-культуру дріжджових грибів роду *Candida*. 1,2 – 24 години культивування, 3 – 72 години культивування, зони інгібування росту заросли (зворотня сторона чашок Петрі).

Таким чином, аналіз результатів свідчить про фунгістатичну та антимікробну властивість досліджуваної композиції щодо тест-культур мікроорганізмів. Встановлений нами саногенний ефект композиції на основі меланіну спонукає до подальших експериментально-клінічних досліджень нових дерпатотропних препаратів на основі меланіну для лікування інфекційно-механічних пошкоджень м'яких тканин.

3.2. Вплив фармакологічної композиції на основі меланіну на морфофункціональні показники експериментальних ран шкіри щурів

Нині досягнення біології та медицини дозволили розкрити механізми перебігу ранового процесу. Експериментальні та клінічні дослідження свідчать про те, що результати лікування ран не є оптимально-ефективними [121, 122]. Правильне та успішне лікування хворих з ранами залежить від місцевої терапії [123]. Залишається важливим пошук нових методів та засобів місцевого лікування, які володіють різнонаправленою дією, забезпечуючи репаративний,

антимікробний та протизапальний ефект. Асортимент зовнішніх лікувальних форм, які прискорюють загоєння ран, представлений монопрепаратами синтетичного походження у формі мазі, крему, гелю, тощо [124, 125]. Відкритою залишається проблема рубцювання після травм, яка широко обговорюється як вітчизняними, так і зарубіжними авторами [126, 127]. Для вдосконалення властивостей існуючих препаратів та мінімізації утворення грубого рубця після травми, у НДЛ «Фармакології і експериментальної патології» була створена нова вітчизняна фармакологічна композиція, яку запропоновано як дерматотропний засіб та на сьогодні знаходиться на стадії доклінічних і клінічних досліджень. До складу нової фармакологічної композиції входить меланін (0,1% Melanin), розчинений у (0,5% карбополі (Carborol 980)). Меланін – стабільний полімерний макрорадикал, за хімічною природою, це суміш різнорідних молекул, які утворюються, ймовірно, не в процесі ферментативних реакцій, а шляхом хімічної конденсації; за хімічною структурою – це довголанцюгові полімери хіноїдів, побудовані з індоліл-5,6-хінонових одиниць. Взаємодіючи з білком, меланіни утворюють меланінпротеїни. Карбопол – карбоксиакриловий чи карбоксівініловий полімер, який використовують як основу для приготування гелів та крем-гелів [Зимон А.Д.,1995]. Протягом усього терміну придатностігель з карбополіоме стабільним, не розшаровується, не висихає, не змінює колір.

Рубцювання виникає після хірургічних і травматичних пошкоджень, є нормальним результатом процесу загоєння ран і може призвести до втрати функції, обмеження руху й спотворення ураженої ділянки [128]. Шкірні рубці являють собою макроскопічні фіброзні утворення в нормальній архітектурі тканини [46].

Тому дослідження процесу гоєння ран, на мікроскопічному рівні дає нам змогу провезти профілактичні заходи для запобігання утворення гіпертрофічних та келоїдних рубців та зменшити термін загоєння ран при застосуванні нової фармакологічної композиції на основі меланіну.

Для вивчення проліферативної активності та ангіогенезу в рані ми вивчали морфологічні зміни в рановому вогнищі.

Встановлено, що на 3-ю добу моделювання різаної рани у контрольній групі тварин спостерігалися дрібні косо-вертикальні розриви рогового шару та базальної мембрани епідермісу. Деякі ядра кератиноцитів базального шару епідермісу видовжувалися та були орієнтовані вертикально відносно базальної мембрани. У ділянках перинуклеарного простору, де зустрічалися розриви епідермісу, цитоплазма базальних епідерцитів мала ознаки дистрофії та вакуольної дегенерації. Встановлено, що цитоплазма базальних епідермоцитів набувала ознак еозинофілії, при цьому ядра були слабо забарвлені гематоксиліном, що свідчить про можливі пікнотичні процеси. Виявлялися клітини з ознаками каріорексису, секвестрації та фрагментації ядра. На 3-ю – 4 – добу експерименту спостерігався виражений некроз у дермі із захопленням підшкірної жирової тканини. За рахунок звуження та деформації судинної сітки дерми відбувалося порушення мікроциркуляції некротичної тканини. На фоні вогнищ хронічного запалення, які були більш виражені на границі із зоною некрозу, окремі локуси були інфільтровані лімфоцитами та гранулоцитами. У інфільтраті переважали макрофаги, еозинофіли зустрічалися поодинокі плазматичні клітини, тканинні базофіли, нейтрофільні лейкоцити та лімфоцити.

Морфологічна картина виявлених змін у тварин контрольної та групи, якій на уражену ділянку наносили карбопол не відрізнялася. У тварин яким наносили фармакологічну композицію, некротичні ділянки зменшувалися вже на 5-6 добу дослідження. Вогнища лейкоцитарної інфільтрації, набряк та запалення зменшувалися, відносно контрольної групи.

На 6-у добу розвитку моделі різаної рани та її загоєння у тварин контрольної групи виявлялися локуси некрозу, спостерігалось збільшення ділянок інфільтрації, у яких переважали макрофаги, збільшувалася кількість еозинофілів та лімфоцитів. Фіксувалася яскраво виражена фібробластична реакція, яка полягала у розростанні сполучної тканини (фіброз) морфологічним переродженням м'язових волокон, збереженням лімфостазу. Спостерігались дифузні поля зрілої фібробластичної сполучної тканини (фіброцити з грубими колагеновими волокнами). Тобто відбувалось грубе рубцювання рани, що склало підставу до тривалого процесу загоєння шкіри.

У щурів дослідної групи з фармакологічної композицією на 6-ий день експерименту виявилися локуси помірного і значного розширення синусоїдних капілярів, в просвіті яких часто виявлялися множинні еритроцитарні агрегати. Центральні вени дерми та гіподерми були розширеними, іноді в них виявлявся стаз. Морфологічна картина загоєння різаної рани у щурів з лікуванням фармакологічною композицією істотно відрізнялася від контрольної групи з природною епітелізацією та від експериментальної групи, яким наносили на рану карбопол. У багатьох щурів групи з фармакологічною композицією на 6-9 добу відзначалася крайова епітелізація ран. В грануляційній тканині виявлялася помірна кількість тонкостінних судин, що свідчить про відновлення регенеративних процесів в тканині. Також, зазначалася достатня кількість колагенових волокон, які затягували рану без утворення грубих колагенових волокон, що спостерігалися у контрольній та дослідній групі з карбополом під час досліджу.

У контрольній та експериментальній групах щурів, яким наносили на ранову поверхню шкіри карбопол з 9-ї по 12 добу експерименту спостерігався сухий струп та активна гіперемія навколо ураженої ділянки шкіри. набряк та вогнища запалення зменшувались порівняно з 3-ю добою, виявлялися дифузні лейкоцитарні інфільтрати.

При нанесенні на рану фармакологічної композиції в роговому шарі епідермісу, ми спостерігали щільно з'єднані між собою рогові лусочки. Базальні епідермоцити циліндроподібної форми та мали видовжене ядро (рис. 3.4).

У щурів II групи, спостерігали десквамацію рогового шару епідермісу, що має ознаки лімфатичного просочування. Вакуолізація цитоплазми базальних епідермоцитів, локуси гідропічної дистрофії та їх перинуклеарний набряк. Руйнування базальної мембрани епідермісу. набряк сосочкового шару дерми з утворенням лейкоцитарного конгломерату (рис. 3.4).

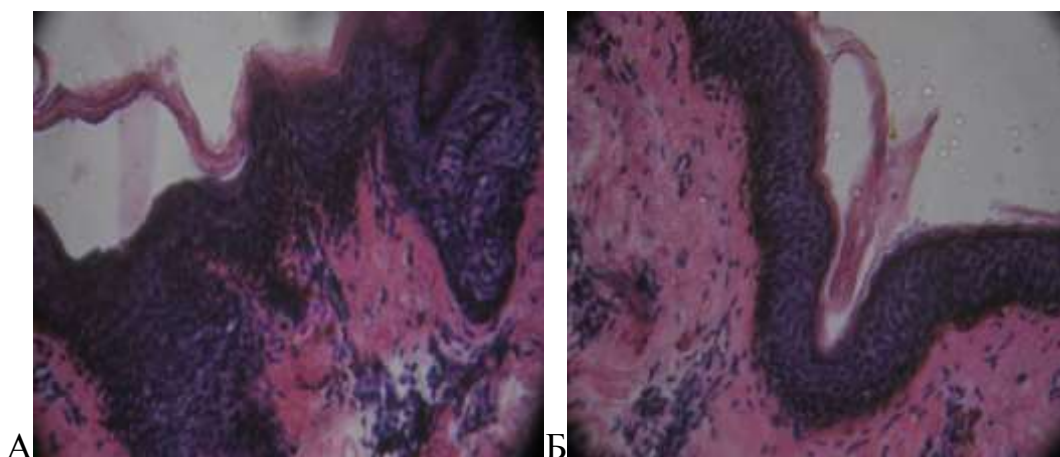


Рис. 3.4. Шкіра на 9 добу після моделювання вирізанної площинної рани (А) та при використанні фармакологічної композиції на основі меланіну(Б). Забарвлення гематоксиліном і еозином. 400^x

На 14-ту добу переважала зріла сполучна тканина з помірною колагенізацією (на гістологічних зрізах у дермі спостерігались тонкі колагенові

волокна, місцями, у вигляді тонкої сітки), при цьому з клітин переважали фібробласти. Розростання сполучної тканини мало поширений, дифузний характер. На гістологічній картині чітко було видно відновлення дрібних артерій і вен судин під час процесу епітелізації.

При аналізі гістологічних зрізів шкіри щурів забарвлених за методом Ван-Гізона, ми можемо візуально спостерігати за ефективністю регенеративних процесів відновлення епідермісу, дерми та гіподерми за рахунок розростання та заміщення деформованих та некротичних ділянок колагеновими волокнами, дослідна група якій наносили фармакологічну композицію. Відповідно, на 14-ту добу досліджень в IV групі тварин, на пошкодженому місці, переважала зріла сполучна тканина, лейкоцитарна інфільтрація була вже слабо виражена, у шарах епідермісу виявлялася добре виражена епітелізація рани (рис.3.5). У I та III групи, лейкоцитарна та гранулоцитарна інфільтрація була помірно виражена, виявлялася велика кількість нейтрофільних лейкоцитів, еозинофілів та макрофагів, як у самій гнійній ділянці шкіри на місці некрозу, так і на границі з нею (рис.3.5.). Процес регенерації епідермісу був слабо виражений на відміну від показників IV групи.

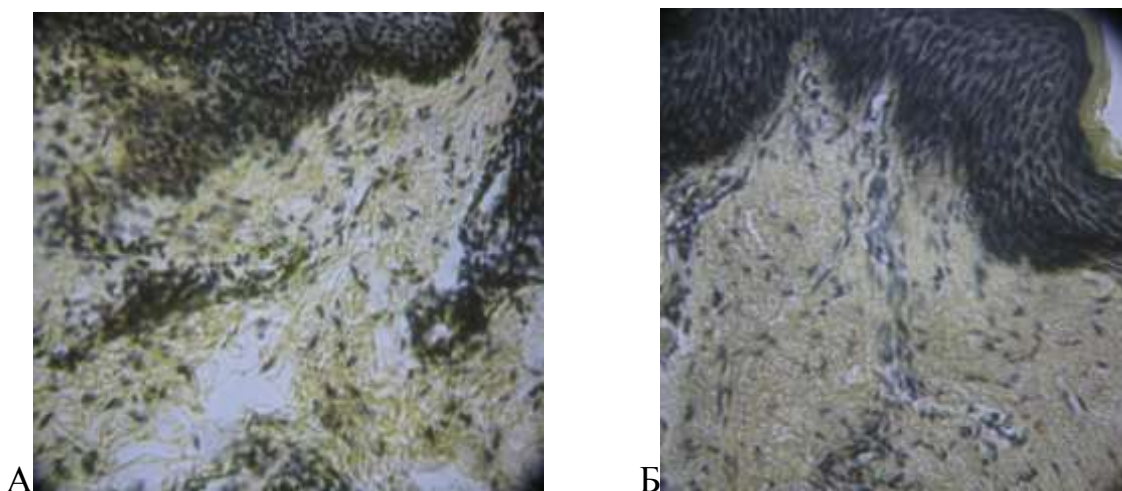


Рис. 3.5. Шкіра на 14 добу після моделювання вирізаної площинної рани (А) та при використанні фармакологічної композиції на основі меланіну (Б). Забарвлення за Ван-Гізоном. 400х

Отже, утворення «грубого рубця» у контрольній та у групі із застосуванням карбополу з подальшим утворенням гнійної ділянки на місці некрозу шкіри, обумовлено довгостроковим запальним процесом в зоні ушкодження, що не відбувається при лікуванні нами фармакологічною композицією на основі меланіну. Меланін, при його зовнішньому застосуванні, знижує запальний процес, що призводить до відновлення структури шкіри при її механічних ушкодженнях.

3.3. Візуалізація поверхні шкірних ран на різних етапах ранового процесу

При сучасному лікуванні ран важливим є комплексний підхід з урахуванням фаз ранового процесу, а також морфологічні, фізіологічні, біохімічні та молекулярні, що можуть відбуватися в тканинах. Тому, для стимуляції загоєння ран доцільно використовувати такі препарати, які б моделювали властивості міжклітинної речовини сполучної тканини і відповідали б патогенезу ранового процесу.

Оцінку ранозагоювального ефекту досліджуваної фармакологічної композиції проводили за аналізом активності контракції поверхні рани у динаміці на 3, 6, 9, 14, 20-ті доби.

У дослідних групах щодня на уражені ділянки наносили фармакологічну композицію за допомогою металевого шпателя, який перед кожним використанням фламбували. Також кожні 24 год. візуально оцінювали загальний стан тварин, стан ураженої поверхні і визначали розмір ранової поверхні.

Для оцінки стану ранової поверхні вивчалися терміни очищення рани від гнійно-некротичних мас, час появи грануляцій та початку крайової епітелізації, а також терміни повної епітелізації поверхні рани.

Отримані дані, що відображають динаміку загоєння ран за різних умов експерименту виявлено поступове зменшення площі ран, проте час повного загоєння відрізнявся у різних експериментальних груп.

У дослідних тварин на третю добу домінував посттравматичний запальний процес, краї рани були валікоподібні, набряклі, рана вкрита товстими кірками коричневого кольору, дно гіперемоване. Ці ознаки були найвиразнішими у тварин контрольної групи (рис.3.6).

У подальші терміни спостереження зареєстровано суттєві зміни у стані ран та перебігу загоєння. На 3-тю добу в контрольній групі надалі спостерігали ознаки запального процесу, краї були набряклими, валікоподібними, спостерігалось незначне виділення гною, рана вкрита кіркою. У тварин, яким наносили карбопол, рани були роздиртими та кровоточили. Стан тварин, яких лікували фармакологічною композицією, різнився значно меншою гіперемією та набряком, рани були вкриті тонким кірковим шаром. У цій групі на 3-тю добу не було виявлено ознак запального процесу.

На 6-ту добу зменшилась площа ран у тварин, яких лікували фармакологічною композицією на основі меланіну, краї рани щільно прилягали до її дна, на якому починають свій розвиток грануляційні тканини. У тварини, яким наносили карбопол, показники загоєння ран були значно нижчими.

Подальше загоєння ран у всіх групах характеризувалось розвитком грануляційної тканини, яка із країв вкривалась епітелієм. Значне домінування цих процесів спостерігалось в дослідній групі тварин, яким наносили фармакологічну композицію.

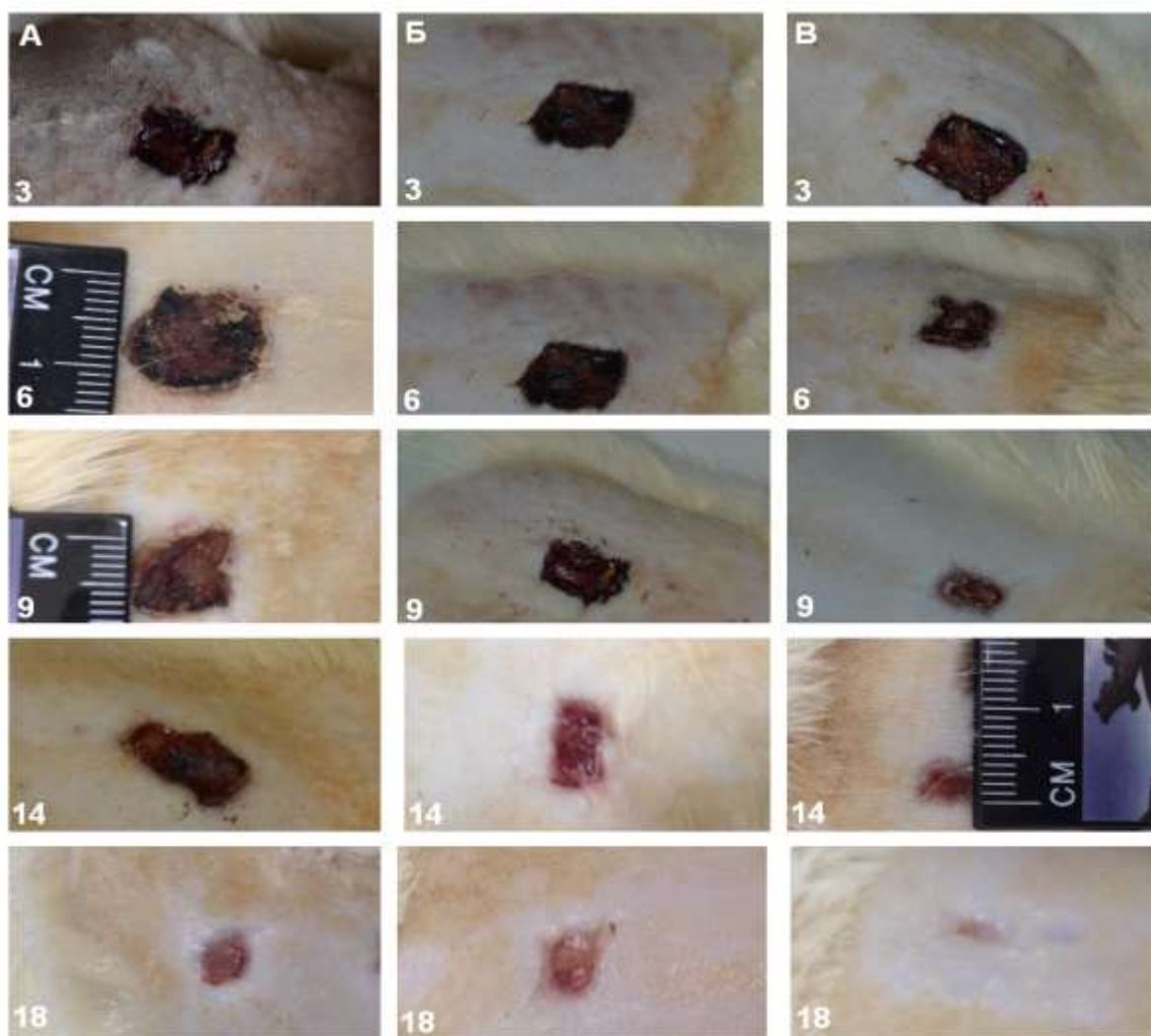


Рис. 3.6. Площа вирізаних площинних ран в динаміці загоєння

А – контроль (рана гоїлась самостійно шляхом епітелізації), доби

Б – на рану наносили 0,5 % карбопол,доби

В – на рану наносили 0,1 % меланін розчинений в 0,5 % карбополі,доби

Також було перевірено ефективність фармакологічної композиції на моделі хімічного опіку шкіри. Показано, що досліджувана композиція володіла вираженою антибактеріальною дією, так як у контрольній групі щурів на 9 добу експерименту, в рановому ложі було виявлено гнійно-некротичні маси, тоді як в групі щурів, яким на уражену ділянку наносили фармакологічну композицію на основі меланіну не було виявлено гнійних мас та ознак запального

процесу, за рахунок чого епітелізація рани відбулась вже на 27- добу без вираженого грубого рубця.

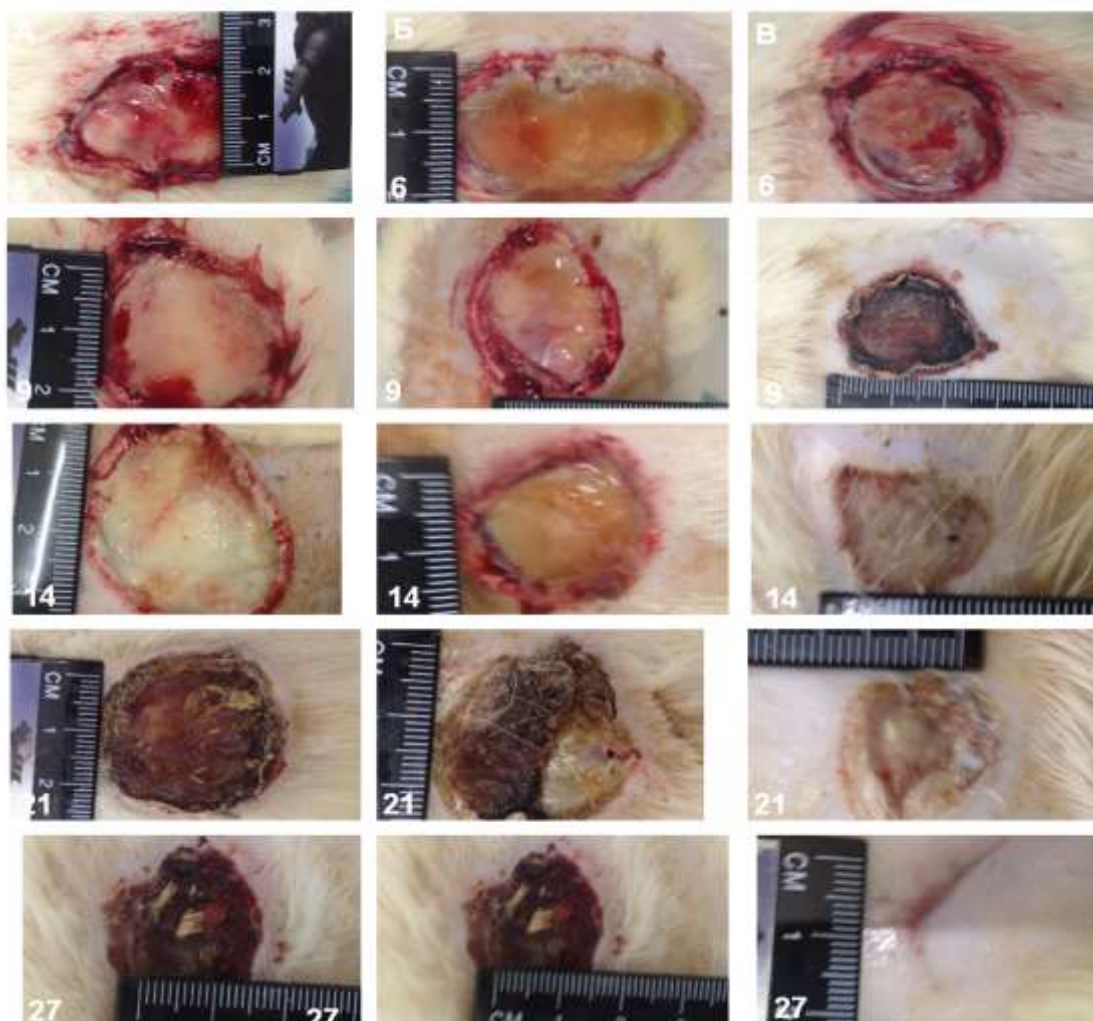


Рис.3.7. Площа хімічного опіку шкіри в динаміці загоєння

А – контроль (рана гоїлась самостійно шляхом епітелізації), доби

Б – на рану наносили 0,5 % карбопол,доби

В – на рану наносили 0,1 % меланін розчинений в 0,5 % карбополі,доби

На 16-ту добу, у дослідній групі із застосуванням фармакологічної композиції рана майже цілковито загоїлась,у контрольній спостерігали ділянку, вкрити щільним струпом.

Повне загоєння відбулось на 18-ту добу у дослідній групі з застосуванням фармакологічної композиції та на 23-тю у контрольній групі.

Клініко-візуальне підтвердження активації ранозагоювання спонукало до подальшого вивчення вимірювальних показників стану ран за умов застосування препарату на основі меланіну.

Аналіз зміни площі ран показав, що застосування фармакологічної композиції позитивно впливає на регенерацію повношарової вирізаної площинної рани, відмічалось достовірне ($p < 0,05$) зниження площі рани в усі терміни спостереження (табл. 3.1).

Таблиця 3.1

Площа повношарової вирізаної площинної рани шкіри щурів на різних етапах ранового процесу та при застосуванні меланіну ($M \pm m$, $n=7$)

Доба дослідження	Площа рани, мм ²		
	контроль	карбопол	фармакологічна композиція
3-тя	100,00 ± 1,62	100,00 ± 2,24*	100,00 ± 3,61
6-та	92,00 ± 1,31	93,52 ± 1,36*	75,03 ± 5,17*
9-та	88,50 ± 3,73	86,16 ± 3,45*	61,42 ± 6,57*
14-та	64,12 ± 1,25	70,83 ± 2,51	31,01 ± 2,61*
18-та	43,27 ± 0,88	40,80 ± 0,83	Повне загоєння*
23-тя	Повне загоєння	Повне загоєння*	

* – різниця між серією контролю та застосуванням препарату вірогідна при $p < 0,05$

У всіх експериментальних групах на 1-шу добу після моделювання вирізаної площинної рани середня площа ран, за даними планіметричного вимірювання, становила 100мм².

В дослідній групі під впливом фармакологічної композиції на 6-ту добу експерименту площа рани зменшилась на 25%, на 9 добу на 38% , на 14-ту добу – становила 31% від початкової площі рани, та повне загоєння спостерігалось на 18-ту добу.

Отже, за умов нанесення фармакологічної композиції відбувалось швидке загоєння ранової поверхні в усі терміни спостереження, достовірно більш активне ніж в інших групах, на фоні відсутнього вторинного інфікування, що пов'язано з антибактеріальними властивостями композиції на основі меланіну.

У тварин дослідної групи, яким наносили карбопол, площа поверхні рани зменшувалась значно повільніше, та на 6-ту та 9-ту доби достовірно не відрізнялась від контрольної групи. Повне загоєння рани спостерігалось на 24-ту добу в дослідній групі та на 23-тю добу в контрольній.

Аналіз даних про добове зменшення площі рани під дією фармакологічної композиції демонструє позитивний вплив на експериментальну рану, достовірний на всіх термінах спостереження.

Швидкість загоєння під впливом карбополу була нижчою ніж при застосуванні фармакологічної композиції на основі меланіну.

На третю добу після некротомії в усіх дослідних групах з хімічним опіком рани були вкриті товстими чорними кірками, з-під яких просочувався гній з різким запахом; рани мали значний набряк та помітний посттравматичний запальний процес.

При подальших спостереженнях за тваринами з хімічним опіком, на 14 добу, показано зниження площі рани на 27% у групі щурів яких лікували фармакологічною композицією відносно контрольної групи. Відмічалось суттєве зниження кількості гною у дослідній групі до повного його зникнення на 14-17 добу (табл.3.2). Тобто, можна стверджувати, що досліджувана композиція покращує відтік гною із рани та пришвидшує гоєння рани.

Таблиця 3.2.

Площа хімічного опіку шкіри щурів на різних етапах ранового процесу та при застосуванні фармакологічної композиції ($M \pm m$, $n=7$)

Доба дослідження	Площа рани, мм ²		
	контроль	карбопол	фармакологічна композиція
3-тя	900,00±5,62	900±4,9	900±3,8
6-та	756,02±2,18	759±1,98	749±1,98
9-та	718,31±1,87	726±2,01	706±2,01
12-та	625,00±1,76	601±1,65	454±1,65*
15-та	300,00±0,98	292±0,67	260±0,67*
18-та	240,00±0,96	231±1,01	223±1,01*
21-ша	185,00±1,32	163±1,13	113±1,13*
24-та	91,00±0,63	84±0,52	65±0,45*
27-ма	72±0,91	78±0,64	Повне загоєння*
30-та	38±0,68	36±0,29	
36-та	Повне загоєння*	Повне загоєння*	
38-ма			

* – різниця між серією контролю та застосуванням препарату вірогідна при $p < 0,05$

На підставі отриманих планіметричних даних можна стверджувати, що прискорення процесу регенерації рани за умов застосування фармакологічної композиції значно перевищувало контрольні показники. У контрольній групі та групі з нанесенням карбополу гній просочувався до повного загоєння, площа рани зменшувалась набагато повільніше.

Проаналізовані дані вказують на те, що швидке загоєння експериментальних вирізаних ран та хімічних опіків при застосуванні композиції на основі меланіну зумовлено інтенсивним впливом на початкові фази регенерації, при цьому зменшується прояв посттравматичного запального процесу. На 6-9 добу, при моделюванні різаних ран, спостерігаються найбільші темпи загоєння рани. При некротичних ураженнях досліджувана композиція покращує відтік гною з рани, зменшуючи запалення що запобігає рубцюванню шкіри.

Таким чином, на основі проведеної оцінки планіметричних параметрів стану шкіри щурів на різних етапах ранового процесу, встановлено активізацію процесів загоєння ран за умов застосування фармакологічної композиції на основі меланіну. Фармакологічна композиція запобігала вторинному інфікуванню рани, забезпечуючи її захист від зовнішніх впливів. Починаючи з фази запалення, відбувалося прискорення репаративних процесів у рані за рахунок скорочення термінів очищення рани з подальшим заповнення ранового дефекту грануляційною тканиною, більш раннім початком крайової епітелізації у фазах регенерації та епітелізації, що приводило до скорочення термінів загоєння ран зі зменшенням строків повної епітелізації в середньому на 4 доби при різаній рані та 9 діб при хімічному опіку шкіри. Це свідчить про ефективність досліджуваної композиції.

Отримані результати потребують досліджень біологічної дії меланіну у складі фармакологічної композиції на біохімічному та молекулярному рівнях в динаміці ранового процесу.

3.4. Фізико-хімічні властивості шкіри при моделюванні вирізаної площинної рани та хімічного опіку шкіри щурів

Відповідно до даних попередніх досліджень, застосування у місцевому лікуванні композиційної суміші дало змогу помітно знизити інфікування

ранової поверхні, тобто композиція має виражені антибактеріальні та протизапальні властивості [129].

Встановлено, що вміст води (табл. 3.5) у шкірі тварин з вирізаними площинними ранами знижувався на 36 % ($p \leq 0,05$), при використанні карбополу на 35 % ($p \leq 0,05$) і на 18 % ($p \leq 0,05$) при нанесенні на рану фармакологічної композиції порівняно з контрольними тваринами.

У тварин із хімічним опіком спостерігали подібну картину: вміст води у шкірі знижувався на 48 % ($p \leq 0,05$), у щурів, яким на рану наносили карбопол на 44 % ($p \leq 0,05$) та на 23 % ($p \leq 0,05$) при використанні фармакологічної композиції на основі меланіну ($p \leq 0,05$) відповідно порівняно з контрольною групою тварин. Ці зміни пов'язані зі зменшенням вмісту рідини в позаклітинному компоненті сполучної тканини, що в кінцевому результаті призводить до руйнування структури колагенових волокон [101].

Вміст колагену в дослідних зразках шкіри з різними ранами навпаки підвищувався. Так, у групі щурів з ранами цей показник зростав на 40% ($p \leq 0,05$) та на 36 % ($p \leq 0,05$) при нанесенні на рану карбополу, порівняно з контрольною групою тварин, тоді як в групі тварин, рани яких обробляли меланіном не було виявлено достовірних відмінностей щодо значень контрольної групи тварин (табл. 3.3).

Наші результати збігаються з даними І.І. Маврова та співт. [130], який показав зменшення вмісту води, збільшення вмісту колагену та температури його зварювання у шкірних покривах, вказує на метаболічні порушення при хронічних дерматозах.

Таблиця 3.3.

Вміст вологи , колагену, виплавленої желатини і температура зварювання у шкірі тварин з вирізаними площинними ранами та при використанні фармакологічної композиції на основі меланіну, ($M \pm m$, $n=10$)

Групи тварин	Вміст вологи, %	Вміст колагену, %	Виплавлення желатини, %	Температура зварювання, °C
Контроль	60,31±5,58	35,80 ± 3,31	2,11 ± 0,20	60,30± 5,58
Рана	38,47± 2,89*	50,06 ± 4,63*	3,67 ± 0,34*	76,16 ± 6,59*
Рана+ 0,5% карбопол	39,24 ± 3,11*	48,81 ± 4,51*	3,56 ± 0,33*	70,35 ± 6,32*
Рана+фармакологічна композиція	49,16±4,18*###	35,05±3,24###	2,22 ± 0,21###	60,21 ± 5,57###

*- $p < 0,05$ порівняно з контрольною групою; ###- $p < 0,01$ порівняно з групою тварин з ранами

Подібні зміни були виявлені і у тварин із хімічним опіком, вміст колагену в групі щурів з ранами та у групі де рани обробляли карбополлом, зростав на 52 % ($p \leq 0,05$) та 34 % ($p \leq 0,05$) відповідно порівняно з контрольною групою тварин. У тварин яким рани обробляли фармакологічною композицією досліджуваний показник достовірно не відрізнявся від значень групи тварин (табл.3.4).

Характерні зміни пов'язані з тим, що при травмуванні шкіри, під час ранового процесу загоєння починається з гострої запальної фази і закінчується утворенням шраму. При рубцюванні накопичується колаген у відповідь на пошкодження тканини. Формування рубця, насамкінець, є результатом надмірного накопичення позаклітинного матриксу (ПМ). Хоча ремоделювання шрамів відбувається протягом місяців або років після початкової травми, повного відновлення нормальної архітектури ПМ ніколи не досягається. Таким

чином, загоєння ран є фібропроліферативною відповіддю, що призводить до неповної регенерації ураженої тканини та надмірного продукування сітчастої структури колагену – рубцевої тканини. При використанні нової фармакологічної композиції загоєння відбулося без рубцювання тканини, що підтверджують наші дослідження (відсотковий вміст колагену в шкірі був меншим, ніж у нелікованих тварин контрольної групи).

Таблиця 3. 4.

Вміст вологи , колагену, виплавленої желатини і температура зварювання у шкірі тварин з хімічним опіком та при використанні фармакологічної композиції на основі меланіну, ($M \pm m$, $n=10$)

Групи тварин	Вміст вологи, %	Вміст колагену, %	Виплавлення желатини, %	Температура зварювання, °C
Контроль	60,31±5,58	35,80 ± 3,3	2,11 ± 0,20	60,30± 5,58
Рана	31,30 ± ,89*	54,36±5,03*	3,42 ± 0,13*	70,05 ±6,39*
Рана+ 0,5% карбопол	33,64 ± ,11*	47,82±4,42*	3,34 ± 0,12*	73,46 ±6,80*
Рана+фармакологічна композиція	46,16±4,26*/##	37,12±3,43##	2,31 ± 0,21##	61,17±5,66##

*- $p < 0,05$ порівняно з контрольною групою; ##- $p < 0,01$ порівняно з групою тварин з опіками

Вихід желатини шкіри у тварин з різаною раною зростає на 74 % ($p \leq 0,05$), у групі тварин, де рани обробляли карбополом на 69% ($p \leq 0,05$) порівняно з контрольною групою тварин, у групі тварин, на рану яким наносили фармакологічну композицію даний показник знижувався на 40% ($p \leq 0,05$) порівняно з тваринами контрольної групи (див.табл. 6.1). У тварин з гнійно-некротичною раною спостерігали підвищення цього показника на 62% та 58% ($p \leq 0,05$) у тварин з опіком та у групі тварин де опік обробляли карбополом, порівняно з контрольними тваринами; у тварин, яким наносили

фармакологічну композицію не було виявлено статистично достовірних змін порівняно з контрольною групою тварин. Ці зміни пов'язані зі зменшенням вмісту колагену в шкірі. При набуханні збільшуються водневі оболонки, які оточують колагенові волокна, послаблюються зв'язки між поліпептидними ланцюгами, як наслідок виникає обмежена пептидація. Утворюються комплекси, де пептидні зв'язки руйнуються легше, ніж у скелетному волокні. Желатина є сумішшю таких поліпептидних комплексів. Швидкість її утворення залежить від кількості води та ступеня набухання колагену, що спричинює желатинування. Вихід желатини при тривалому зварюванні шкіри більший у нелікованих тварин, що пов'язано з високим вмістом колагену.

Температура зварювання шкіри тварин з різаними ранами зростала на 26 % ($p \leq 0,05$) та на 17% у тварин з ранами, які обробляли карбополом ($p \leq 0,05$) відповідно порівняно з контрольними тваринами; у групі тварин, де рани обробляли фармакологічною композицією температура зварювання знижувалася на 21 % ($p \leq 0,05$) щодо значень тварин з ранами. У тварин з ранами за умов гнійно-некротичних ран досліджуваний показник зростав на 16 % ($p \leq 0,05$) і 22% ($p \leq 0,05$) при нанесенні на рану карбополу, щодо значень щурів контрольної групи. У щурів на рани яким наносили фармакологічну композицію показник температури зварювання повертався до значень контрольної групи. Раніше нами було показано, що у шкірі молодих людей вміст вологи та колагену залишались в межах норми, у пацієнтів середнього віку зменшувався вміст вологи, а відсоток колагену залишався незмінним. Вміст вологи та колагену у шкірі осіб похилого віку значно зменшувався [101].

Таким чином, травмування шкіри супроводжується зменшенням вмісту вологи, збільшенням вмісту колагену та температури її зварювання, збільшенням вмісту виплавленої желатини. Зменшення вологи в дермі призводить до зниження гідратації колагенових волокон та їх деструкції як наслідок – патологічні зміни в шкірі, що свідчать про метаболічні порушення.

Отже, при лікуванні шкірних ран ефективним є природний меланін, що входить до складу нової фармакологічної композиції, він проявляє антимікробну, ранозагоювальну, протизапальну дію та антиоксидантні властивості, за рахунок чого загоєння ран відбувається без рубцювання, що підтверджується меншим відсотком вмісту колагену в шкірі лікованих тварин порівняно з нелікованими.

РОЗДІЛ 4

ІНТЕНСИВНІСТЬ ВІЛЬНОРАДИКАЛЬНИХ ПРОЦЕСІВ У ШКІРІ ТА СИРОВАТЦІ КРОВІ ЩУРІВ В ДИНАМІЦІ РАНОВОГО ПРОЦЕСУ ТА ПРИ ЗАСТОСУВАННІ ФАРМАКОЛОГІЧНОЇ КОМПОЗИЦІЇ НА ОСНОВІ МЕЛАНІНУ

4.1. Інтенсивність накопичення супероксиданіон радикалу та пероксиду водню за умов моделювання вирізаної площинної рани шкірита при використанні фармакологічної композиції на основі меланіну

Процеси вільнорадикального окиснення є складовою ланкою метаболічної активності клітин, які постійно відбуваються в живих організмах. Основним механізмом активації вільнорадикальних процесів є збільшення утворення активних форм кисню (АФК). Фізіологічними ефектами АФК є цитотоксична дія у складі фагоцитів, регуляція клітинної проліферації та тонуусу судин, індукція транскрипції окремих генів. У той же час, АФК можуть проявляти й виразну токсичну дію на структури клітин. Їх пошкоджуюча дія в основному обумовлена подальшою стимуляцією процесів вільнорадикального окиснення, що призводить до розвитку окисного стресу, який проявляється накопиченням токсичних продуктів, ушкодженням молекул, мембран клітин, тканин, зниженням репаративних процесів у рані [131, 132]. Отже, при різних патологічних процесах в організмі, виснаженні, хронічних захворюваннях та за умов не ефективного лікування дисфункції у відновленні бар'єрних властивостей шкіри призведуть до посилення й більш тривалої чутливості до алергенів, мікробної колонізації та /або інфекції на доданок до збільшення втрати трансепідермальної води [132]. Що, у свою чергу, може призвести до ускладнень у зоні розташування рани: гіпертрофічних і келоїдних рубців, трофічні виразок, хронічних ран та інколи пухлин [129, 133].

Нами було виявлено підвищення супероксидного аніону в групі тварин з

вирізаними площинними ранами в 2,0 ($p \leq 0,05$), на 3 та 14добу відповідно в порівнянні з контролем(рис.4.1). Проте у щурів, яким на рани наносили фармакологічну композицію на основі меланіну досліджуваний показник знижувався в 1,7 ($p \leq 0,05$) раза на 14 добу, ніж у тварин із нелікованими ранами та починаючи з 14 доби наближався до значень контролю (рис.4.1).

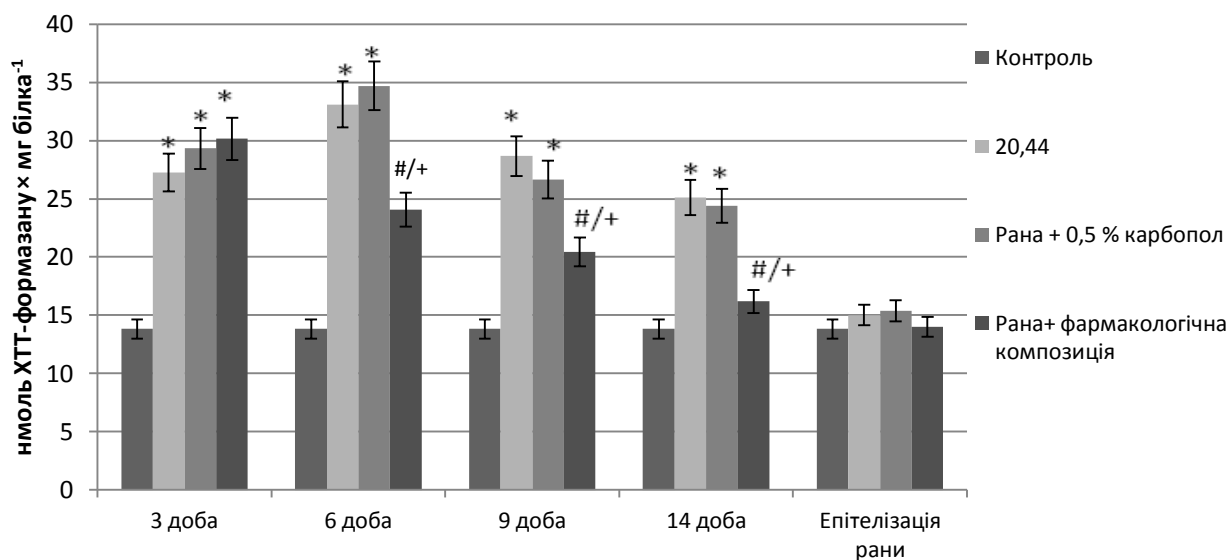


Рис 4.1. Вміст ХТТ-формазау у сироватці крові щурів з вирізаною площинною раною шкіри ($M \pm m$; $n=7$): *- $p \leq 0,05$ порівняно з контрольними тваринами; +- $p < 0,05$ порівняно з групою тварин з раною; #- $p \leq 0,05$ порівняно з групою тварин, рани яких обробляли карбополом 0,5%

У результаті проведених нами експериментальних досліджень було показано, що вміст супероксидного аніону у гомогенаті шкіри тварин із вирізаними площинними ранами був вищим у 2($p \leq 0,05$), та 1,6 раза ($p \leq 0,05$) на 3 і 14 добу загоєння відповідно в порівнянні з контролем(рис.4.2).Однак у щурів, яким на рани наносили фармакологічну композицію, цей показник був в 1,4 ($p \leq 0,05$), 1,7($p \leq 0,001$) і 1,6 раза ($p \leq 0,05$) нижчим на 6, 9 і 14 добу відповідно, ніж у тварин із нелікованими ранами, та був менш підвищеним відносно контролю: в1,9 і 1,7 раза($p \leq 0,0001$) на 3 та 6 добу загоєння

відповідно, і вже на 9 добу повертався до контролю (рис.4.2).

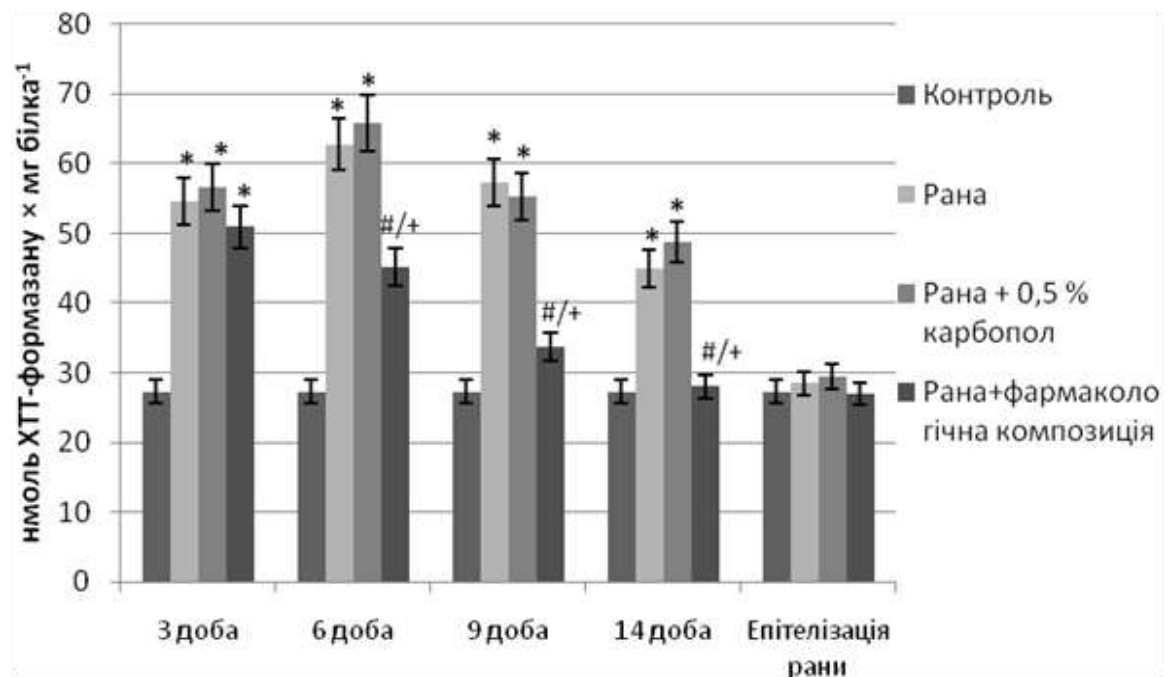


Рис 4.2. Вміст ХТТ-формазану у гомогенаті шкіри щурів з вирізаною площинною раною шкіри ($M \pm m$; $n=7$): *- $p \leq 0,05$ порівняно з контрольними тваринами; +/- $p < 0,05$ порівняно з групою тварин з раною; #- $p \leq 0,05$ порівняно з групою тварин, рани яких обробляли карбополом 0,5%

Нами було досліджено кількість пероксиду гідрогену в сироватці крові та гомогенаті шкіри щурів з ранами. В ході проведених експериментів встановлено, що у групі щурів з ранами зростає рівень перекису водню в 2,5 ($p \leq 0,05$), 2,3 ($p \leq 0,05$), 2,2 ($p \leq 0,05$) та 1,8 ($p \leq 0,05$) раза порівняно з контрольною групою тварин. У групі щурів, яим на рани наносили фармакологічну композицію досліджуваний показник знижувався в 1,4 ($p \leq 0,05$), 1,7 ($p \leq 0,05$) та 1,8 ($p \leq 0,05$) раза на 9, 14 добу та в день епітелізації рани відповідно в порівнянні з травмованими тваринами(рис.4.3).

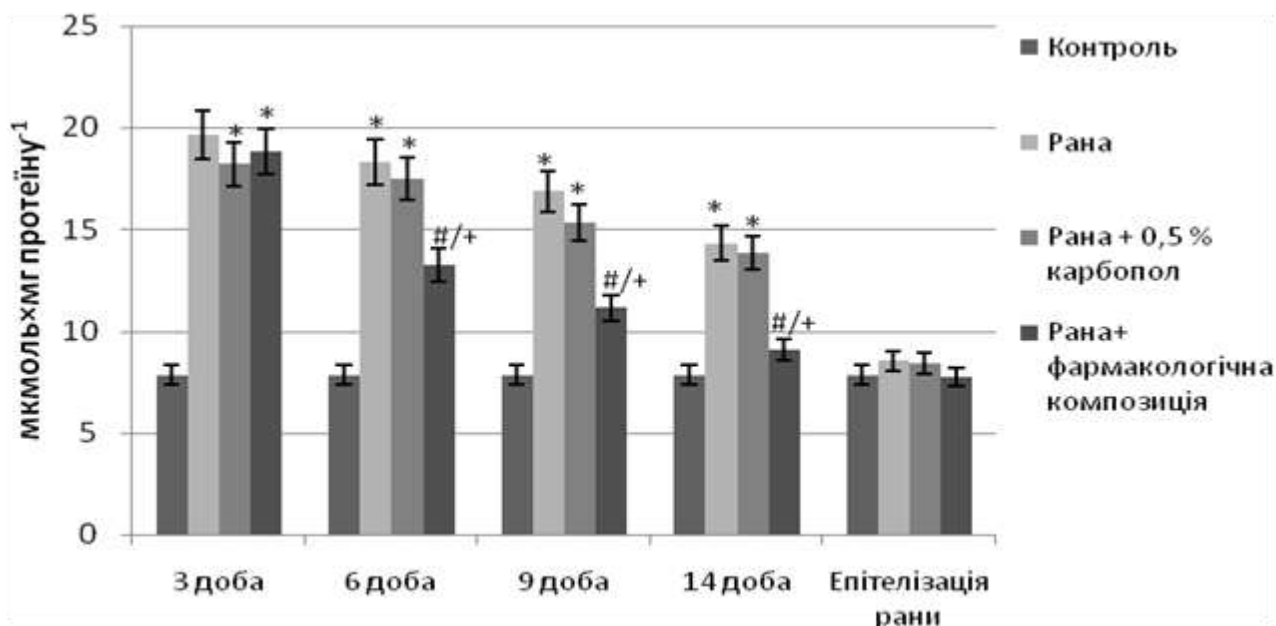


Рис 4.3. Вміст H_2O_2 у сироватці крові щурів з вирізаною площинною раною шкіри ($M \pm m$; $n=7$): * $-p \leq 0,05$ порівняно з контрольними тваринами; + $- p < 0,05$ порівняно з групою тварин з раною; # $- p \leq 0,05$ порівняно з групою тварин, рани яких обробляли карбополом 0,5%

Було встановлено підвищення кількості пероксиду водню в гомогенаті шкіри тварин з ранами в 2,0 ($p \leq 0,05$), 2,3 ($p \leq 0,05$), 2,0 ($p \leq 0,05$), рази відповідно на 3, 6, 9 добу відповідно в порівнянні з контролем (рис.4.4). За умов корекції рани фармакологічною композицією на основі меланіну показано зниження досліджуваного показника в 1,7 ($p \leq 0,05$), 1,7 ($p \leq 0,05$) та 1,4 ($p \leq 0,05$) рази відповідно щодо тварин з ранами (рис.4.4).

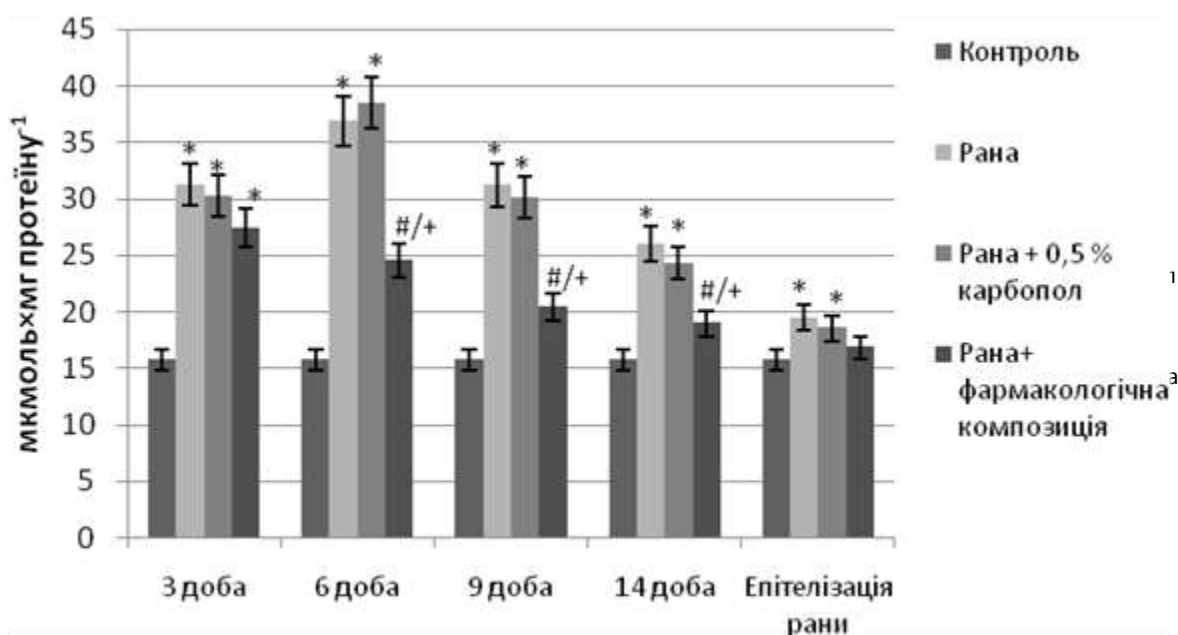


Рис 4.4. Вміст H_2O_2 у гомогенаті шкіри щурів з вирізаною площинною раною шкіри ($M \pm m$; $n=7$): * - $p \leq 0,05$ порівняно з контрольними тваринами; +/- $p < 0,05$ порівняно з групою тварин з раною; # - $p \leq 0,05$ порівняно з групою тварин, рани яких обробляли карбополом 0,5%

4.2. Інтенсивність накопичення супероксиданіон радикалу та пероксиду водню за умов моделювання хімічного опіку шкіри

Молекулярний кисень є кінцевим акцептором електронів у організмів, які отримують енергію шляхом контрольованого окиснення вуглецевих сполук. Молекула кисню O_2 у своєму основному стані (триpletний кисень) містить два неспарених електрона з паралельними спіновими станами. Чотири електрони послідовно приймаються молекулою кисню. Цей процес утворює ряд проміжних і бічних продуктів [134]. Більшість з них - радикали, що містять непарний електрон. Інші речовини (пероксид водню, хлорновата кислота) є реакційними, але не мають характеру радикалу, їх називають АФК [135].

Супероксидний аніонний радикал утворюється коли молекула кисню приєднує один електрон. Він може функціонувати як відновник, а також в якості окисника. Його реакційна здатність відносно низька, але він може приймати протон водню і утворювати гідропероксидний радикал, який є сильнішим окислювачем, ніж O_2^- . Перекис водню утворюється при реакції двох супероксидних радикалів, що називаються диспропорціонуванням. Ця спонтанна реакція значно прискорюється супероксиддисмутазою (СОД) [136]. Відомо, що реакція супероксидного аніон радикалу з перекисом водню в присутності іонів заліза (реакція Габера—Вайса) генерує реактивний гідроксильний радикал [137].

Нашими дослідженнями показано підвищення вмісту супероксид аніон радикалу у сироватці крові в групі тварин зхімічним опіком шкіри в 2,7 ($p \leq 0,05$) та 1,5 ($p \leq 0,05$) раза на 3 добу загоєння та в день епітелізації рани відповідно в порівнянні з контролем (рис.4.5). Проте у групі тварин, яким опік обробляли фармакологічною композицією показано зниження даного показника в 1,4 ($p \leq 0,05$) та 1,7 ($p \leq 0,05$) раза на 9 та 14 добу загоєння відповідно щодо групи тварин з ранами, в день епітелізації рани досліджуваний показник наближався до рівня контрольних значень (рис.4.5).

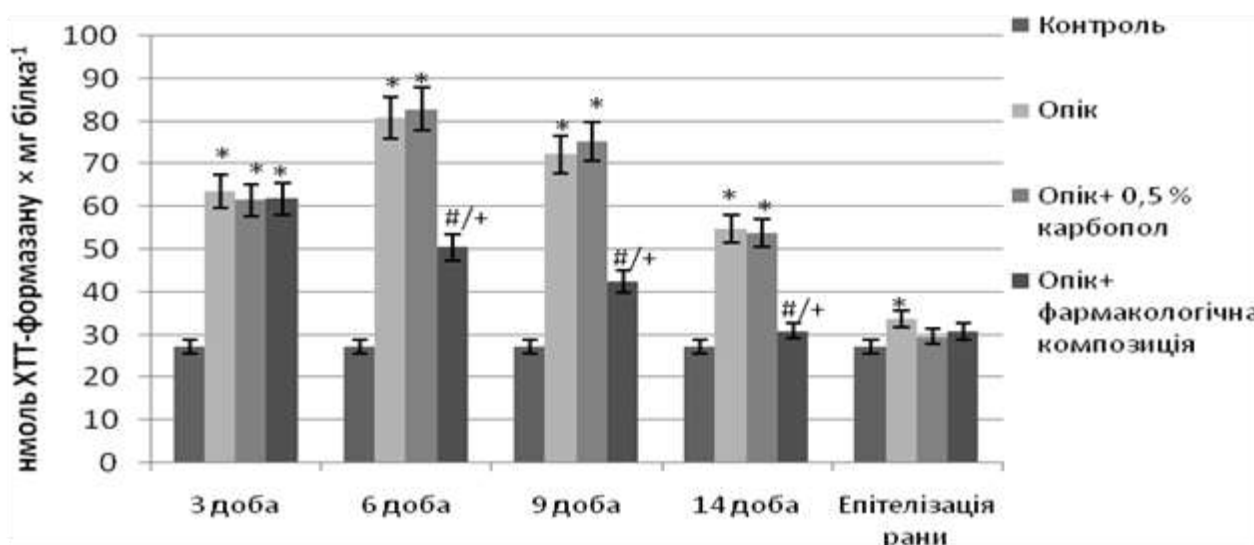


Рис 4.5. Вміст ХТТ-формазау у сироватці крові щурівзхімічним опіком шкіри ($M \pm m$; $n=7$): $*-p \leq 0,05$ порівняно з контрольними тваринами; $+ - p < 0,05$ порівняно з групою тварин з раною; $\#- p \leq 0,05$ порівняно з групою тварин, рани яких обробляли карбополом 0,5%

Вміст супероксидного аніону у гомогенаті шкіри в групі тварин із гнійно-некротичними ранами був вищим у 2,8 ($p \leq 0,05$) на 6 добу загоєння відповідно в порівнянні з контролем (рис.4.6). У той же час у тварин, яким на рани наносили фармакологічну композицію, цей показник був в 1,6, ($p \leq 0,05$), 1,7 ($p \leq 0,05$) і 1,8 раза ($p \leq 0,05$) нижчим на 6, 9 і 14 добу відповідно, ніж у тварин другої групи, та виявився менш підвищеним відносно контролю: у 2,1 ($p \leq 0,05$) і 1,8 ($p \leq 0,05$) раза на 3 та 6 добу загоєння відповідно, і на 9 добу повертався до контрольних значень (рис.4.6).

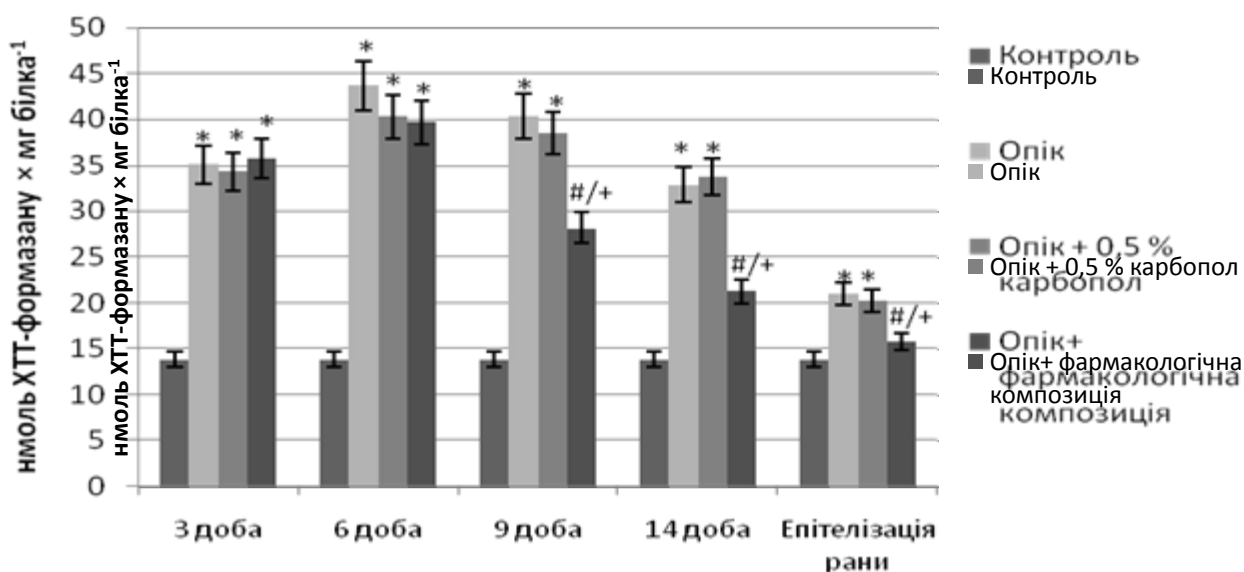


Рис 4.6. Вміст ХТТ-формазау у гомогенаті шкіри щурівзхімічним опіком шкіри ($M \pm m$; $n=7$): $*-p \leq 0,05$ порівняно з контрольними тваринами; $+ - p < 0,05$ порівняно з групою тварин з раною; $\#- p \leq 0,05$ порівняно з групою тварин, рани яких обробляли карбополом 0,5%

Відомо, що продукування супероксидного аніон-радикалу значно підвищується при ускладненому перебігу травм шкіри і відповідає за часом найбільшій інтенсивності запальної фази ранового процесу. Деструктивна роль перебігу ранового процесу, супутня мікрофлора та поглиблення вільнорадикальних процесів у тканинах призводять до первинної та вторинної альтерації (загибелі клітин). За рахунок цього помітно ускладнюється епітелізація рани, поширюється некроз тканин та гальмується початок репаративних процесів [129].

Нами було досліджено кількість пероксиду гідрогену в сироватці крові та гомогенаті шкіри щурів з хімічним опіком. В ході проведених досліджень встановлено, що у групі щурів з хімічним опіком у сироватці крові зростає рівень перекису водню в сироватці крові в 3,0 ($p \leq 0,05$), 2,7 ($p \leq 0,05$), 2,5 ($p \leq 0,05$), 2,1 ($p \leq 0,05$) та 1,3 раза ($p \leq 0,05$) порівняно з контрольною групою тварин. У групі щурів, яким на рани змащували фармакологічною композицією досліджуваний показник знижувався в 1,2 ($p \leq 0,05$) та 1,5 ($p \leq 0,05$) раза на 9 та 14 добу відповідно в порівнянні тварин з опіками (рис.4.7).

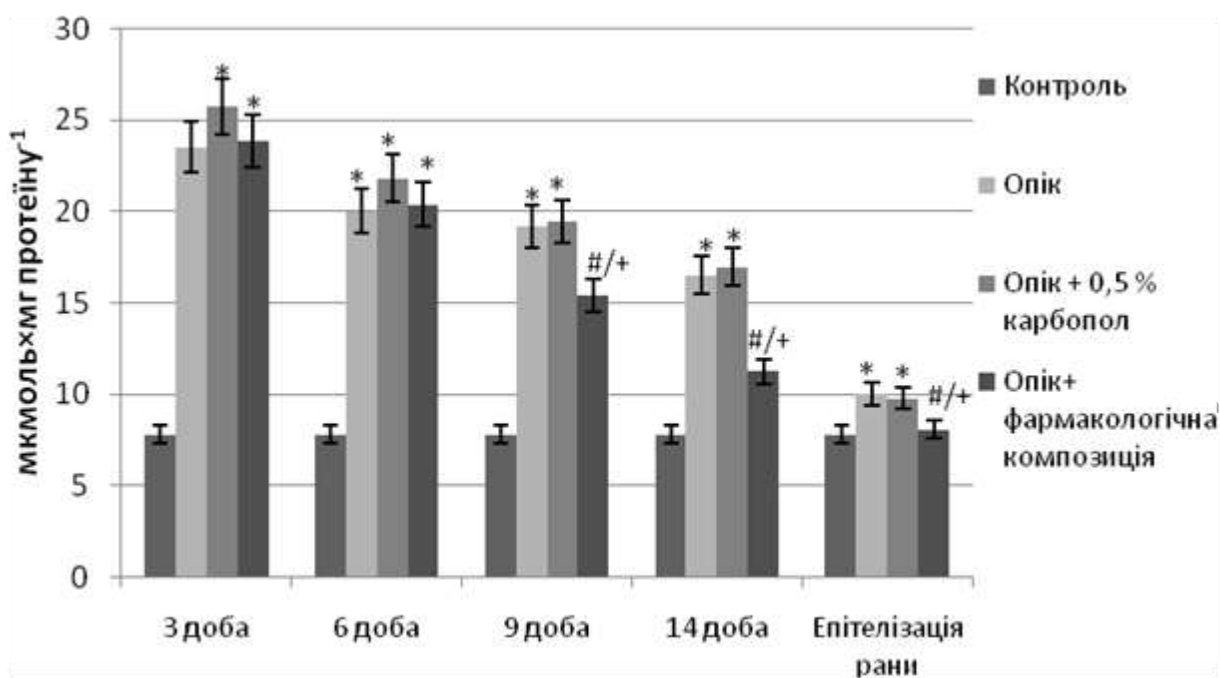


Рис 4.7. Вміст H_2O_2 у сироватці крові щурів з хімічним опіком шкіри ($M \pm m$; $n=7$): * - $p \leq 0,05$ порівняно з контрольними тваринами; +- $p < 0,05$ порівняно з групою тварин з раною; #- $p \leq 0,05$ порівняно з групою тварин, рани яких обробляли карбополом 0,5%

Було показано зростання кількості перексиду водню в гомогенаті шкіри тварин з хімічними опіками в 2,9 ($p \leq 0,05$), 2,7 ($p \leq 0,05$), 2,2 ($p \leq 0,05$), 1,9 ($p \leq 0,05$) та 1,2 ($p \leq 0,05$) раза відповідно на 3, 6, 9, 14 добу загоєння та в день епітелізації рани відповідно в порівнянні з контролем (рис.4.8). За умов нанесення на рану фармакологічної композиції на основі меланіну показано зниження досліджуваного показника в 1,3 ($p \leq 0,05$) та 1,4 ($p \leq 0,05$) раза на 9 та 14 добу відповідно щодо тварин з опіками.

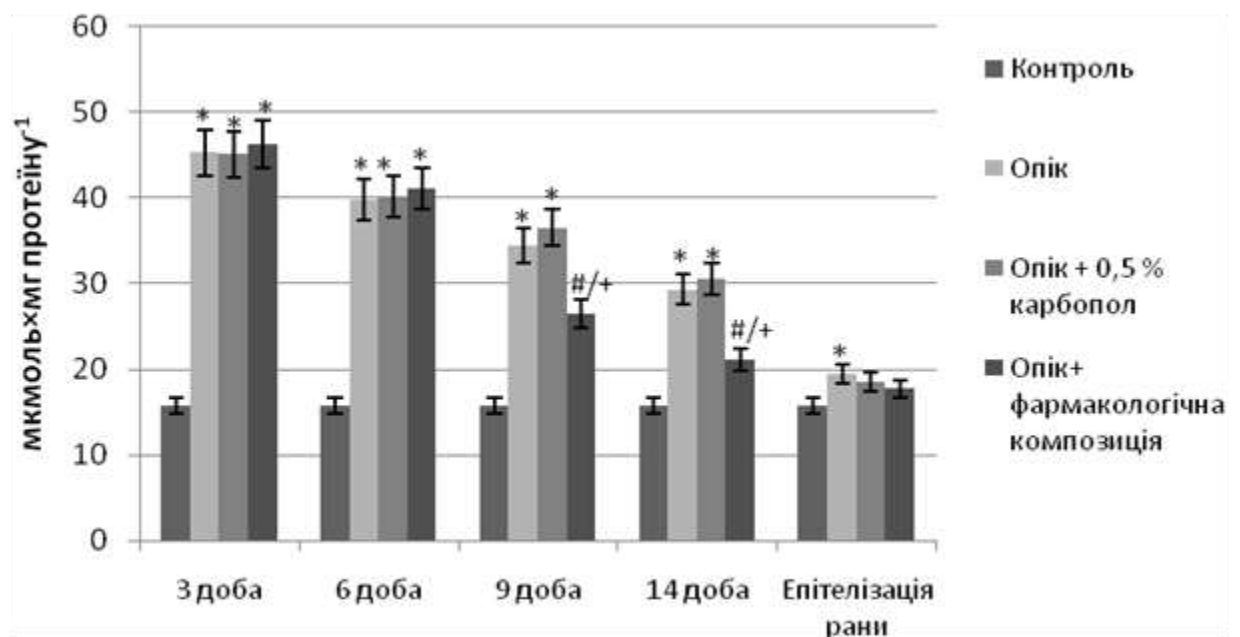


Рис 4.8. Вміст H_2O_2 у гомогенаті шкіри щурів з хімічним опіком шкіри ($M \pm m$; $n=7$): * - $p \leq 0,05$ порівняно з контрольними тваринами; +- $p < 0,05$ порівняно з групою тварин з раною; #- $p \leq 0,05$ порівняно з групою тварин, рани яких обробляли карбополом 0,5%

З літературних джерел відомо, що високі концентрації H_2O_2 (50 мМ), нанесені на ексцизійну шкірну рану у мишей, затримують епітелізацію рани [138]. АФК, що продукується системою ксантину та ксантиноксидази, знижує кількість колагену та збільшує синтез глікозаміноглікану в культивованих шкірних фібробластах людини [139]. H_2O_2 відіграє роль в активації латентної нейтрафільної колагенази, яка може погіршити синтез колагену у рані [140].

Зростання вмісту супероксидного аніон-радикалу за умов загоюванні як повношарових площинних вирізаних ран, так і гнійно-некротичних ранових поверхонь після опіків, викликаних розчином кальцієвої солі відбувається за рахунок його генерації у мітохондріальних та мікросомальних електронтранспортних ланцюгах клітин епітелію. Окрім того, додатковим джерелом супероксиду може бути ксантиноксидазна реакція, під час якої в якості побічного продукту продукується $\cdot\text{O}_2^-$ радикал [141]. Більше того, масована генерація супероксидного радикалу може відбуватися за рахунок ферменту НАДФН-оксидази, що каталізує одноелектронне відновлення молекулярного кисню за рахунок окиснення НАДФН [142]. Відомо, що найвища експресія НАДФН-оксидаз характерна для запальних клітин, таких як нейтрофіли та макрофаги, які рекрутуються до пошкоджених клітин шкіри та різних органів під час пошкоджень і запалення. Внаслідок так званого «дихального вибуху» запальних клітин відбувається потужне продукування супероксидного-аніону під дією фагоцитарної ізоформи НАДФН-оксидази. Нині вважається, що саме інфільтруючі запальні клітини є основним джерелом генерації радикалу $\cdot\text{O}_2^-$. Окрім того, до утворення супероксидного аніону також можуть залучатися нелейкоцитарні ізоформи НАДФН-оксидаз, а також НАДФН-оксидази ендотелію мікросудин шкіри внаслідок підвищення рівня прозапальних цитокінів (зокрема, ФНП- α), які, у свою чергу, є індукторами експресії НАДФН-оксидаз судинного ендотелію [143, 144].

РОЗДІЛ 5

ОЦІНКА ПРОЦЕСІВ ОКИСНЕННЯ ЛІПІДІВ ТА БІЛКІВ

5.1.Інтенсивність процесів перекисного окиснення ліпідів при вирізанній площинній рані та за умов її корекції фармакологічною композицією на основі меланіну

Перекисне окиснення ліпідів можна описати як процес, при якому окислювачі, такі як вільні радикали, атакують ліпіди, що містять вуглець-вуглецевий подвійний зв'язок, особливо поліненасичені жирні кислоти (ПНЖК) [145]. Ліпіди також можуть окислюватися ферментами, такими як ліпоксигенази, циклооксигенази і цитохром р 450 [146, 147]. У відповідь на перекисне окиснення ліпідів мембран і в залежності від специфічних клітинних метаболічних станів та відновлювальних здібностей можуть сприяти виживанню клітин або викликати загибель клітин. При фізіологічних або низьких показниках перекисного окиснення ліпідів клітини стимулюють їх підтримку і виживання через конститутивні системи захисту антиоксидантів або активацію сигнальних шляхів, які активують білки антиоксидантів, що призводить до адаптивної реакції стресу. Навпаки, при середніх або високих показниках перекисного окиснення ліпідів (токсичні умови) ступінь окислювального пошкодження перевантажує здатність до відновлення, а клітини індукують апоптоз або некроз, запрограмовану клітинну загибель; обидва процеси в кінцевому підсумку призводять до пошкодження клітин, що може сприяти розвитку різних патологічних станів [148].

Перекисне окиснення ліпідів дає широкий спектр продуктів окиснення. Основними первинними продуктами перекисного окиснення ліпідів є гідропероксиди ліпідів (LOOH), супероксид, гідропероксид і гідроксил, дієнові кон'югати. Серед багатьох різних альдегідів, які можуть бути утворені в якості вторинних продуктів під час перекисного окиснення ліпідів, малоновий

диальдегід (МДА), пропанол, гексанол і 4-гідроксиноненал (4-HNE) [149]. МДА, мабуть, є самим мутагенну продуктом перекисного окислення ліпідів, тоді як 4-HNE є найбільш токсичним [150]. Кінцевими речовинами ПОЛ є флуоресціюючі сполуки окисної співполімеризації ліпідів і білків – шиффові основи, газоподібні продукти, нітрати й нітрити [151].

Нашими попередніми дослідженнями показано, що застосування у місцевому лікуванні композиційної суміші на основі меланіну дозволило помітно знизити інфікування ранової поверхні, загоєння відбувалось без утворення грубого рубця, тобто композиція володіє вираженими антибактеріальними та протизапальними властивостями [129].

Також нашими колегами показано, що меланін, продуцентом якого є дріжджеподібні гриби *Nadsoniella nigra* штам X-1, на 47% посилював експресію білка eNOS в слизовій оболонці шлунка щурів, що зазнали впливу 24-х годинного стресу, що призводило до збільшення генерації оксиду азоту, в результаті чого зростала концентрація в крові його метаболіти NO_2^- . Тобто, один з механізмів антистресової впливу меланіну полягав в збільшенні продукції оксиду азоту, якому належить важлива роль в цитопротекції [11]. Також показано, що меланін захищав слизову оболонку шлунка від оксидативних уражень, викликаних методом нервово-м'язового напруження за Сельє [83].

Тому доцільно було дослідити дії меланіну у складі фармакологічної композиції для лікування уражень шкіри, отримати дані його дерматотропних властивостей.

Порушення окисно-антиоксидантної рівноваги під час травми шкіри носить системний характер, тому доцільним було визначити дані показники у сироватці крові щурів.

Встановлено, що у сироватці крові щурів з експериментальною різаною ранною, вміст дієнових кон'югатів зростав: на 3 добу ранового процесу – в 1,3 раза, тоді як на 14 добу та у день епітелізації рани зазначений показник

повертався до контрольного рівня значень. Водночас, у щурів, які отримували фармакологічну композицію на основі меланіну, рівень дієнових кон'югатів у сироватці крові знижувався: на 6 добу ранового процесу – в 1,3 раза ($p < 0,05$) та в день епітелізації рани – в 1,7 раза ($p < 0,05$) по відношенню до групи тварин з ранами (рис. 5.1).

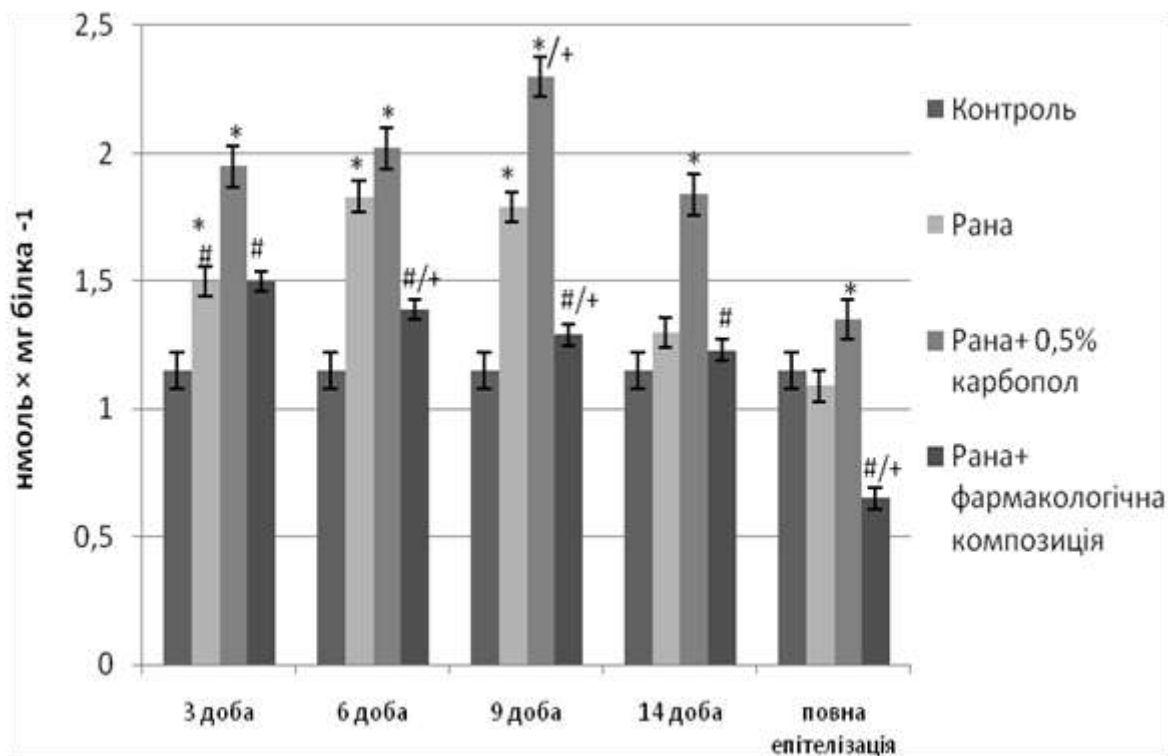


Рис 5.1. Вміст дієнових кон'югатів у сироватці крові щурів з вирізаною площинною ранною, ($M \pm m$; $n=7$). * - $p \leq 0,05$ порівняно з контрольними тваринами; + - $p < 0,05$ порівняно з групою тварин з ранами; # - $p \leq 0,05$ порівняно з групою тварин, рани яких обробляли карбополом 0,5%

Показано зростання вмісту ТБК-активних сполук у сироватці крові тварин з ранами: на 3 добу ранового процесу – у 2 рази ($p < 0,05$) в день епітелізації рани – в 1,4 раза ($p < 0,05$) відносно інтактних тварин, тоді як в групі тварин з фармакологічною композицією на основі меланіну, встановлено зменшення кількості ТБК-активних сполук: на 3, 9 та 14 добу – в 1,3 раза

($p < 0,05$), на 6 добу та в день епітелізації рани – в 1,8 раза($p < 0,05$), в 1,9 раза ($p < 0,05$) відносно групи тварин з ранами (рис. 5.2).

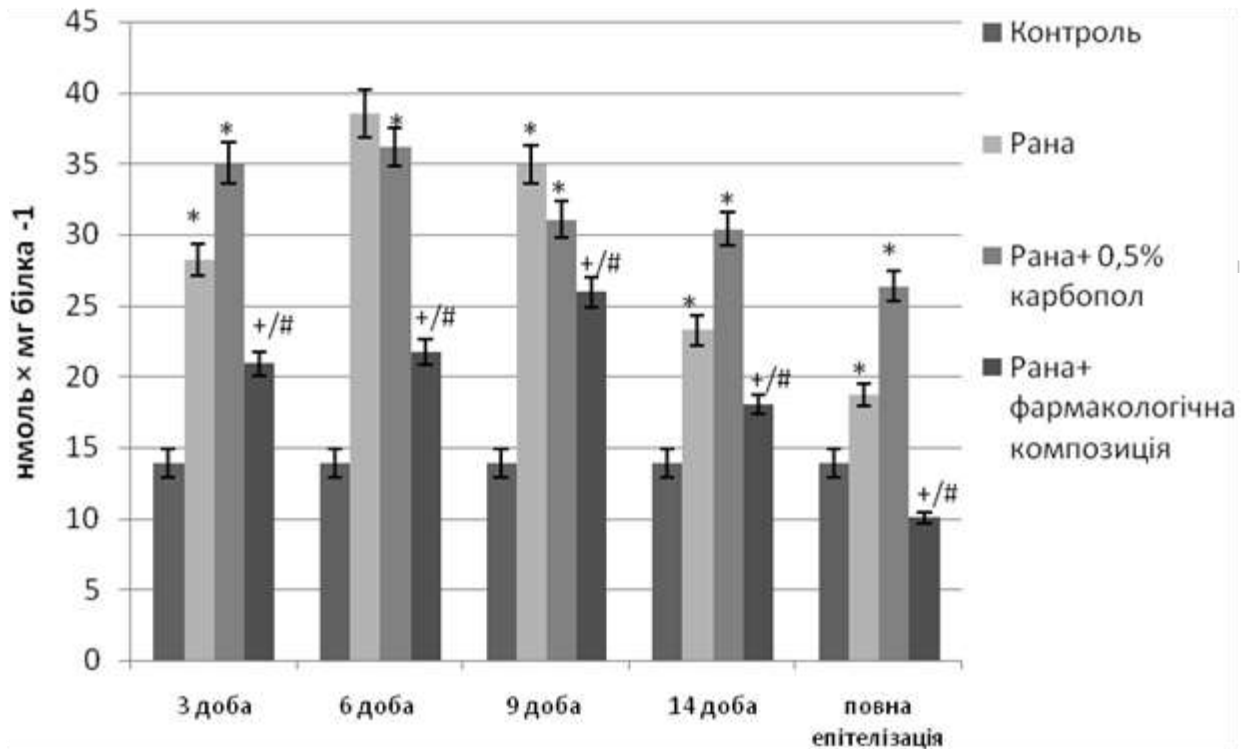


Рис 5.2. Вміст ТБК-активних продуктів у сироватці крові щурів з вирізаною площинною раною, ($M \pm m$; $n=7$). *- $p \leq 0,05$ порівняно з контрольними тваринами; +/- $p < 0,05$ порівняно з групою тварин з ранами; #- $p \leq 0,05$ порівняно з групою тварин, рани яких обробляли карбополом 0,5%

У щурів, які отримували фармакологічну композицію на основі меланіну, спостерігали достовірне зниження вмісту шиффових основ: на 3 добу – в 1,4 раза ($p < 0,05$), на 6 добу – в 1,5 раза($p < 0,05$), на 9 – в 1,3 раза($p < 0,05$) та у день епітелізації рани – у 2,1 раза($p < 0,05$); на 14 добу зазначений показник не відрізнявся від контрольної групи тварин. У щурів, яким наносили карбопол, не було встановлено достовірних відмінностей у вмісті шиффових основ у сироватці крові порівняно з контрольною групою тварин на більшості етапів

ранового процесу, окрім 14 дня, коли зазначений показник зростав в 1,4 раза ($p < 0,05$) відносно контрольної групи тварин (рис. 5.3).

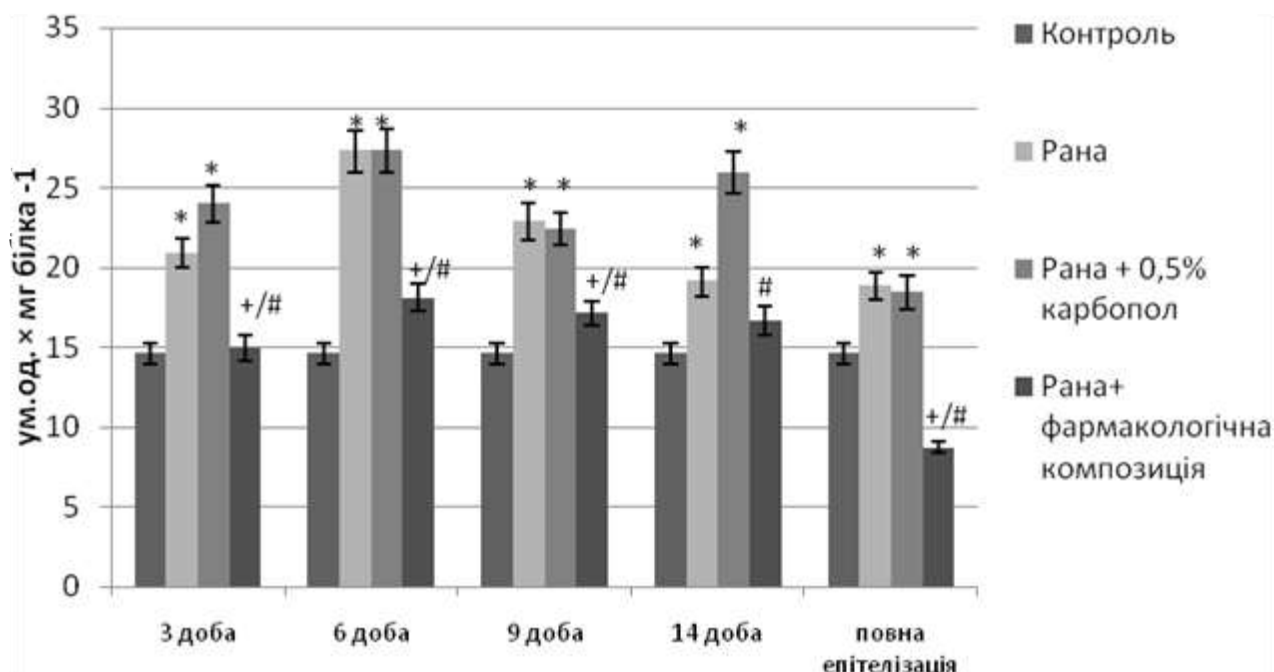


Рис. 5.3. Вміст шиффових основ у сироватці крові щурів з вирізаною площинною раною, ($M \pm m$; $n=7$). *- $p \leq 0,05$ порівняно з контрольними тваринами; +/- $p < 0,05$ порівняно з групою тварин з ранами; #- $p \leq 0,05$ порівняно з групою тварин, рани яких обробляли карбополом 0,5%;

Інтенсифікацію вільнорадикальних процесів за умов різаної рани було показано іншими дослідниками. У дослідях Попова С.Б. та Березнякова А.В. на моделі лінійної різаної рани встановлено активацію вільнорадикальних процесів, зниження антирадикального захисту при запальному процесі та їх нормалізація при використанні мазі «Глітоцид» [152].

Таким чином, отримані нами дані вказують, що у сироватці крові на початку експерименту у відповідь на інтенсивне утворення вільнорадикальних сполук спостерігалась активація процесів перекисного окиснення ліпідів. Застосування ж у місцевому лікуванні композиційної суміші на основі меланіну

дозволило помітно знизити перекисне окиснення ліпідів у сироватці крові, скорегувати перебіг усіх фаз ранового процесу.

Продукти окиснення ліпідів, присутні в шкірі людини та індукують різні шкірні захворювання, але, на відміну від плазми та інших тканин, ідентифікація та кількісне вимірювання продуктів окиснення ліпідів у шкірі рідкісні тому і стали предметом наших досліджень.

Встановлено, що у гомогенаті шкіри щурів у групі з експериментальною різаною раною вміст дієнових кон'югатів зростає: на 3 добу ранового процесу в 3,2 раза ($p < 0,05$) та у день епітелізації рани в 1,3 раза ($p < 0,05$) відповідно, порівняно з контрольною групою тварин (рис.5.4).

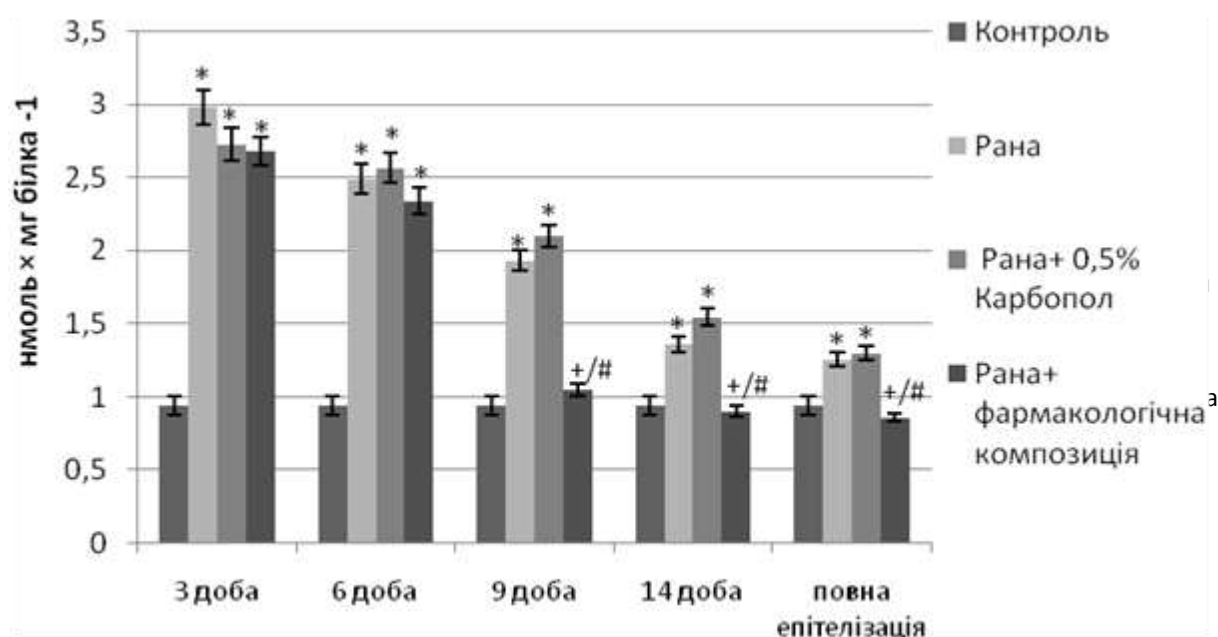


Рис.5.4. Вміст дієнових кон'югатів у гомогенаті шкіри щурів з вирізаною площинною раною, ($M \pm m$; $n=7$): *- $p \leq 0,05$ порівняно з контрольними тваринами; +- $p < 0,05$ порівняно з групою тварин з ранами; #- $p \leq 0,05$ порівняно з групою тварин, рани яких обробляли карбополом 0,5%.

Тварини, яким уражену ділянку обробляли фармакологічною композицією на основі меланіну, рівень дієнових кон'югатів збільшувався на 3 добу в 2,9 раза ($p < 0,05$), починаючи з 9 доби ранового процесу, вміст дієнових кон'югатів знижувався та наближався до значень контрольної групи тварин (рис.5.4).

Показано зростання вмісту ТБК-активних сполук у гомогенаті шкіри тварин групи з шкірними ранами на всіх етапах ранового процесу: на 3 добу в 2,4 раза ($p < 0,05$), на 14 добу – 2,7 раза ($p < 0,05$) та в день епітелізації рани – в 2,2 раза ($p < 0,05$) відносно контрольної групи тварин (рис.4.5).

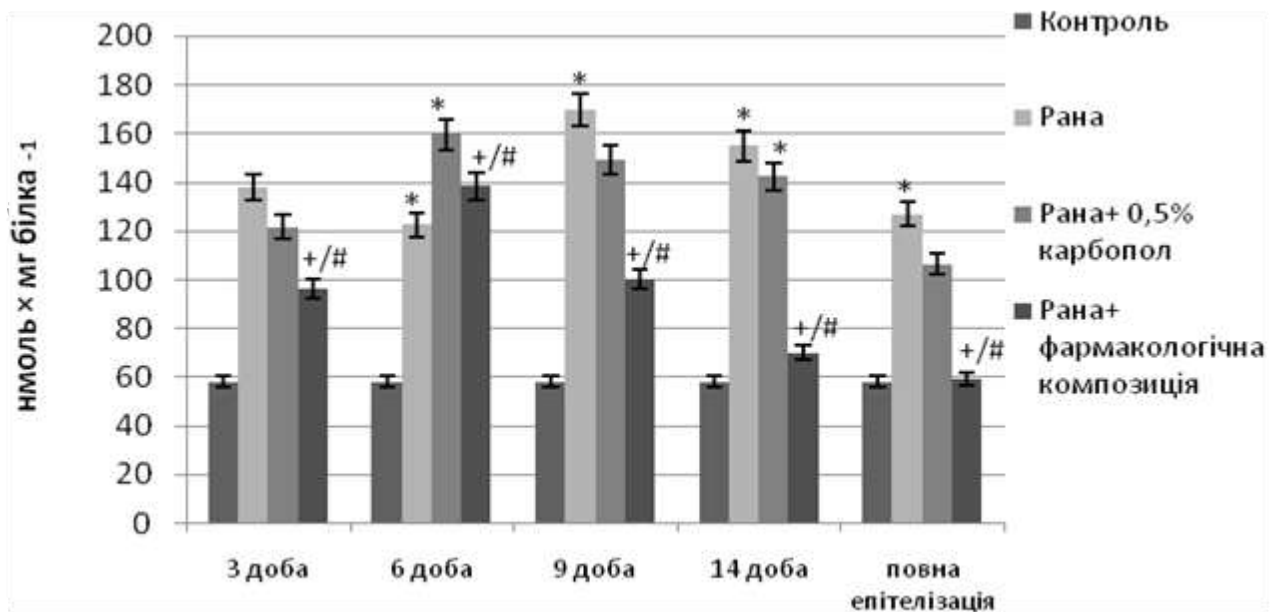


Рис. 5.5. Вміст ТБК-активних продуктів у гомогенаті шкіри щурів з вирізаною площинною раною, ($M \pm m$; $n=7$): *- $p \leq 0,05$ порівняно з контрольними тваринами; +- $p < 0,05$ порівняно з групою тварин з ранами; #- $p < 0,05$ порівняно з групою тварин, рани яких обробляли карбополем 0,5%.

В групі тварин з фармакологічною композицією на основі меланіну досліджуваний показник збільшувався: на 3 добу в 2,4 ($p < 0,05$) раза, в день епітелізації рани досліджуваний показник не відрізнявся від групи контрольних

тварин. Проте, показано зниження досліджуваного показника на 3, 9, 14 добу та в день повної епітелізації рани, порівняно з групою тварин з ранами: в 1,4 ($p<0,05$); 1,7 ($p<0,05$); 2,2 ($p<0,05$) та 2,1 раза ($p<0,05$) (рис. 5.5).

В групі тварин з ранами показано підвищення вмісту шиффових основ: на 3 добу ранового процесу – в 2,4 раза ($p<0,05$); на 6 добу – в 2,7 раза ($p<0,05$); на 9 добу – в 2,6 раза ($p<0,05$); на 14 добу – в 2,1 раза ($p<0,05$) та в день епітелізації рани в 2 раза ($p<0,05$) щодо показників контрольної групи (рис.5.6).

При корекції патології фармакологічною композицією показано зростання досліджуваного показника на 3 та 6 добу ранового процесу – в 2 ($p<0,05$) та 1,8 раза ($p<0,05$), на 14 добу та в день епітелізації рани значений показник повертався до рівня показників контрольних тварин.

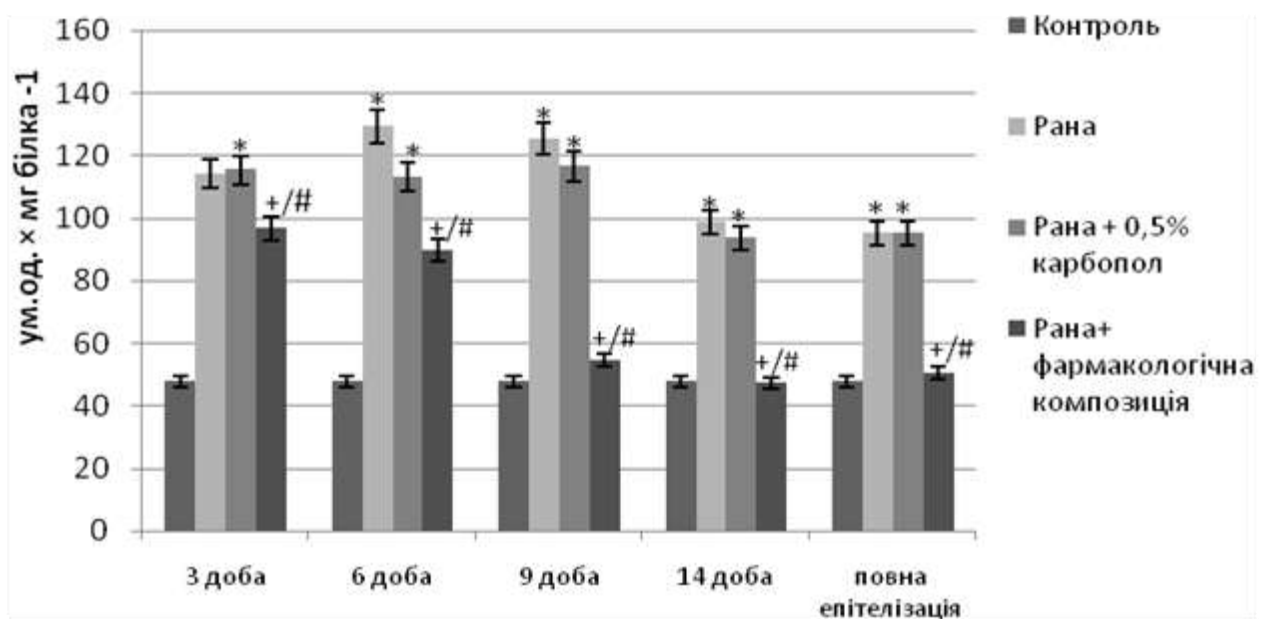


Рис 5.6. Вміст шиффових основ у гомогенаті шкіри щурів з вирізаною площинною раною, ($M \pm m$; $n=7$): *- $p \leq 0,05$ порівняно з контрольними тваринами; +- $p < 0,05$ порівняно з групою тварин з ранами; #- $p \leq 0,05$ порівняно з групою тварин, рани яких обробляли карбополем 0,5%.

Показано, статистично достовірне зниження вмісту шиффових основ в динаміці: на 3 добу – в 1,3 раза; на 6 добу – в 1,4 раза ($p < 0,05$); на 9 добу в 2,3 раза ($p < 0,05$); на 14 добу в 2 раза ($p < 0,05$) та у день епітелізації рани – в 1,8 раза ($p < 0,05$) відносно показників контрольної групи тварин (рис. 5.6). Також продемонстровано зниження рівня шиффових основ при використанні фармакологічної композиції на основі меланіну на всіх етапах ранового процесу в 1,2 ($p < 0,05$); 1,3 ($p < 0,05$); 2 ($p < 0,05$); 2 ($p < 0,05$) та 1,8 раза ($p < 0,05$) на 3, 6, 9, 14 добу та в день гоєння рани щодо щурів, рани яких обробляли карбополом.

Таким чином, в динаміці модельованої вирізаної площинної рани, починаючи із 3-ої доби посттравматичного періоду, відмічається інтенсифікація ПОЛ, що проявляється істотним зростанням вмісту ТБК-активних продуктів, шиффових основ та дієнових кон'югатів, зниження показників віжзначалось під час епітелізації рани. При використанні фармакологічної композиції, вже з 6-доби ранового процесу показано зниження та на кінцевих етапах ранового процесу нормалізацію показників ПОЛ.

5.2. Інтенсивність процесів перекисного окиснення ліпідів за умов хімічного опіку шкіри та його корекції фармакологічною композицією на основі меланіну

При нормальному перебігу обміну кисневі радикали не накопичуються в клітинах [153]. Однак їх вміст може збільшуватися, якщо підвищується швидкість утворення вільних радикалів або знижується здатність клітин до їх нейтралізації. Тому збільшення в клітинах вільно-радикальних сполук і створює умови для розвитку окисного стресу. Основні механізми появи АФК в організмі пов'язані зазвичай з порушеннями функціонування електронно-транспортних ланцюгів мітохондрій або мікросом, а також при зміні властивостей дегідрогеназ [154]. Підвищений вміст вільно-радикальних сполук

в клітинах викликає глибокі пошкодження генетичного апарату клітин, викликаючи їх загибель. Найбільш важливим проявом токсичної дії вільних радикалів є ПОЛ). Ці явища лежать в основі багатьох запальних, нейродегенеративних, злоякісних і вікових змін тканин людини, в тому числі і захворювань шкіри [155].

Так нами показано зміни у вмісті дієнових кон'югатів при травмі шкіри. Встановлено, що у сироватці крові щурів у групі з хімічним опіком шкіри, вміст дієнових кон'югатів зростає на усіх етапах ранового процесу: на 9 добу – в 2,5 рази ($p < 0,05$) та у день епітелізації рани в 1,5 рази ($p < 0,05$) порівняно з показниками контрольної групи (табл. 4.7).

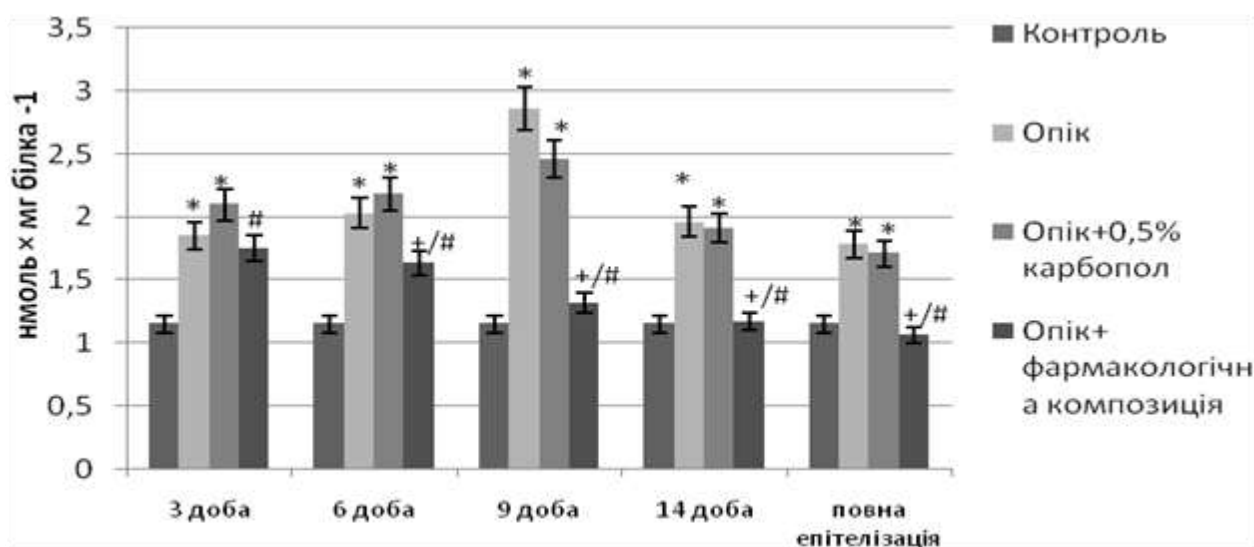


Рис. 5.7. Вміст дієнових кон'югатів у сироватці крові щурів з хімічним опіком шкіри, ($M \pm m$; $n=7$): * - $p \leq 0,05$ порівняно з контрольними тваринами; + - $p < 0,05$ порівняно з групою тварин з опіком; # - $p \leq 0,05$ порівняно з групою тварин, рани яких обробляли карбополом 0,5%.

При нанесенні на рану фармакологічної композиції на основі меланіну, рівень дієнових кон'югатів у сироватці крові знижувався: на 9 добу – в 2,2 рази;

на 14 добу та в день епітелізації рани в 1,7 раза ($p < 0,05$) по відношенню до групи тварин з опіком (рис. 5.7).

Показано зростання вмісту ТБК-активних сполук у сироватці крові тварин контрольної групи: на 3 добу ранового процесу – в 2,6 раза та в день епітелізації рани – в 2 раза ($p < 0,05$) відносно значень контрольних тварин (рис. 5.8).

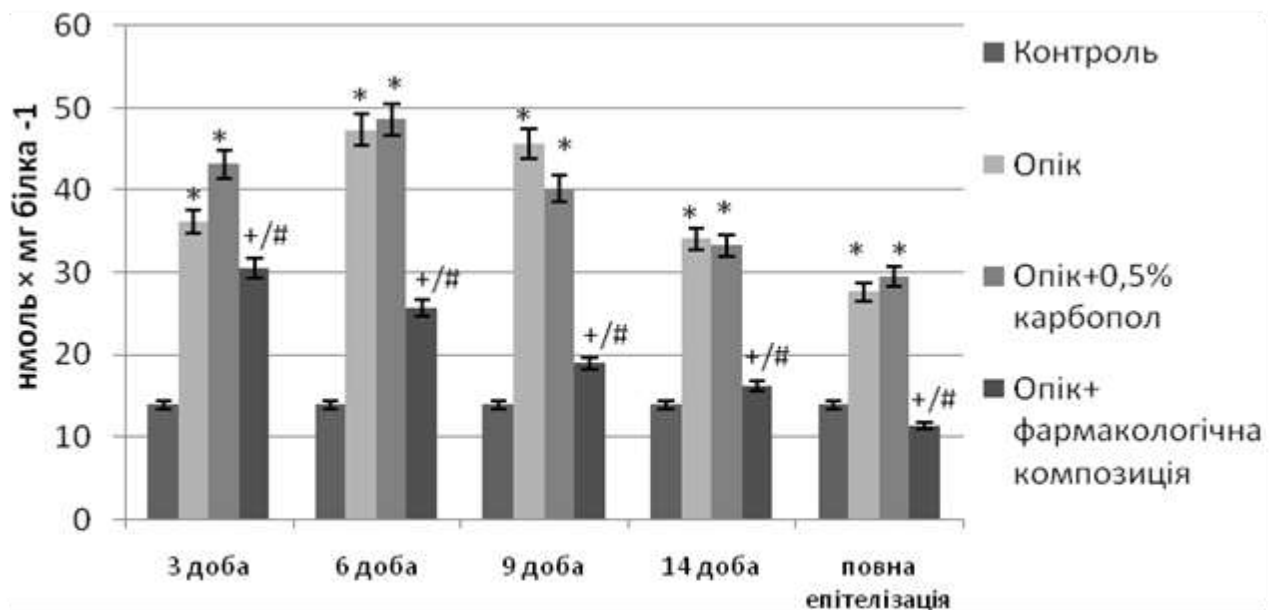


Рис. 5.8. Вміст ТБК-активних продуктів у сироватці крові щурів з хімічним опіком шкіри, ($M \pm m$; $n=7$): *- $p \leq 0,05$ порівняно з контрольними тваринами; +/- $p < 0,05$ порівняно з групою тварин з опіком; #- $p \leq 0,05$ порівняно з групою тварин, рани яких обробляли карбополом 0,5%.

В групі тварин з фармакологічною композицією на основі меланіну, встановлено зменшення кількості ТБК-активних сполук на 9 добу та в день повної епітелізації рани – в 2,4 раза ($p < 0,05$) відносно групи тварин з опіком (рис. 5.8).

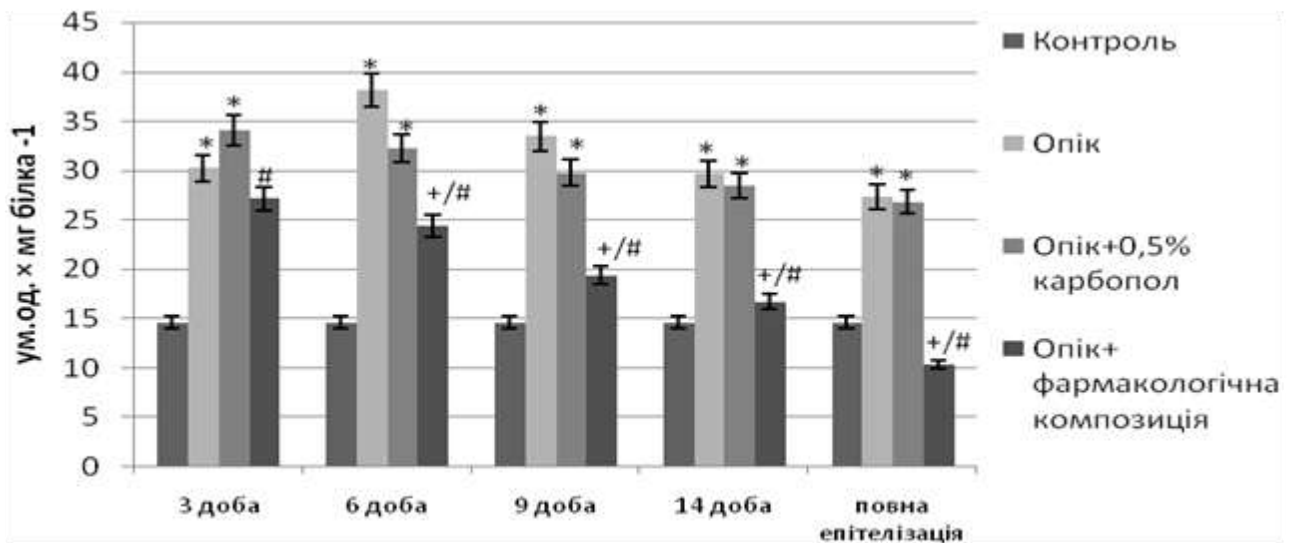


Рис.5.9. Вміст шиффових основ у сироватці крові щурів з хімічним опіком шкіри, ($M \pm m$; $n=7$): *- $p \leq 0,05$ порівняно з контрольними тваринами; +- $p < 0,05$ порівняно з групою тварин з опіком; #- $p \leq 0,05$ порівняно з групою тварин, рани яких обробляли карбополом 0,5%.

В результаті проведених досліджень, нами встановлено, що у порівнянні з контрольною групою тварин щурів з хімічним опіком шкіри показано підвищення вмісту шиффових основ на 6 добу – в 2,6 раза та в день епітелізації рани в 1,8 раза ($p < 0,05$)(рис. 5.9).

При нанесенні фармакологічної композиції на основі меланіну, спостерігали достовірне зниження вмісту шиффових основ в динаміці: на 6 добу – в 1,6 раза та у день епітелізації рани – 2,6 раза ($p < 0,05$) відносно значень тварин з хімічним опіком, де рана гоїлась самостійно (рис. 5.9).

Окрім досліджень процесів ВРО в сироватці крові, було показовим дослідити ці процеси в гомогенаті шкіри з ранового вогнища.

Показано, що вміст дієнових кон'югатів у групі тварин з хімічним опіком, зростав: на 3 добу ранового процесу в 3,8 раза та у день епітелізації рани в 2,4 раза ($p < 0,05$) порівняно з показниками контрольної групи щурів.

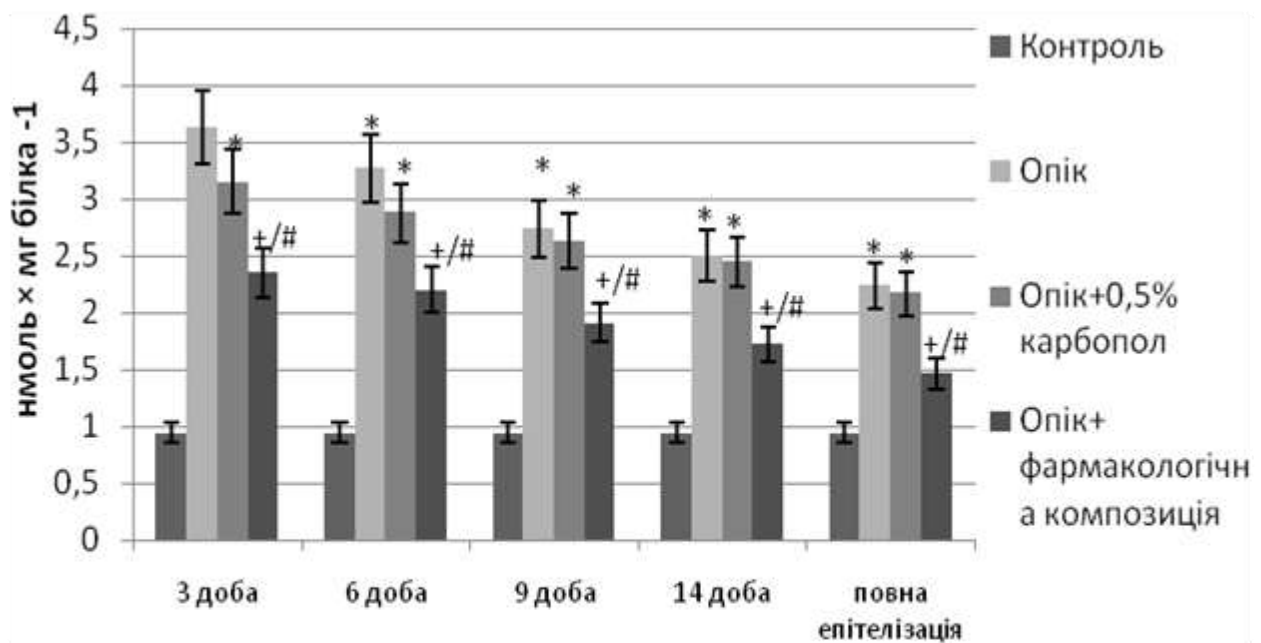


Рис.5.10. Вміст дієнових кон'югатів у гомогенаті шкіри щурів з хімічним опіком шкіри, ($M \pm m$; $n=7$): *- $p \leq 0,05$ порівняно з контрольними тваринами; +- $p < 0,05$ порівняно з групою тварин з опіком; #- $p \leq 0,05$ порівняно з групою тварин, рани яких обробляли карбополом 0,5%.

У щурів, яким уражену ділянку обробляли фармакологічною композицією на основі меланіну, рівень дієнових кон'югатів знижувався: на 3 та 6 добу в 1,5 раза ($p < 0,05$) та у день епітелізації – в 1,3 раза ($p < 0,05$) порівняно із групою щурів з хімічним опіком (рис. 5.10).

В ході проведених експериментальних досліджень встановлено збільшення вмісту ТБК-активних продуктів в гомогенаті шкіри тварин з хімічним опіком у 2,8 і 2 раза ($p \leq 0,05$) на 3 добу загоєння та в день епітелізації рани відповідно в порівнянні з контролем.

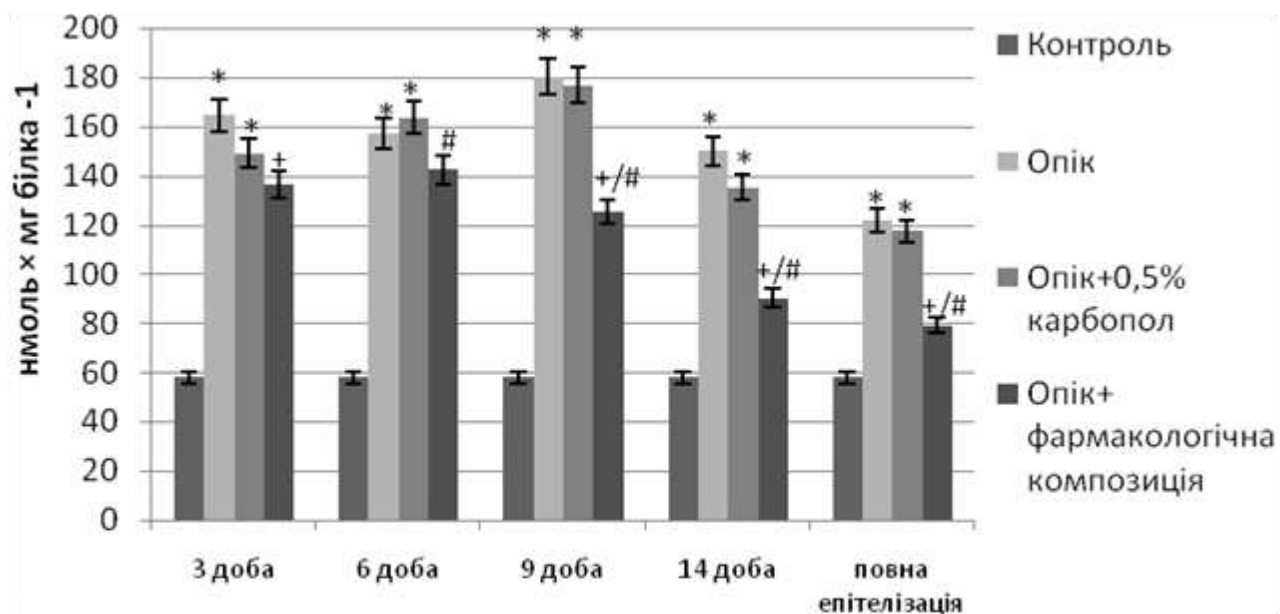


Рис. 5.11. Вміст ТБК-активних продуктів у гомогенаті шкіри щурів з хімічним опіком шкіри, ($M \pm m$; $n=7$): $*$ - $p \leq 0,05$ порівняно з контрольними тваринами; $+$ - $p < 0,05$ порівняно з групою тварин з опіком; $\#$ - $p \leq 0,05$ порівняно з групою тварин, рани яких обробляли карбополом 0,5%.

У той же час у тварин, яким на рани наносили фармакологічну композицію, цей показник був в 1,2 та 1,5 рази ($p < 0,05$) нижчим на 3 добу та в день епітелізації рани відповідно, ніж у тварин з хімічним опіком без лікування, та виявився менш підвищеним відносно контролю на усіх етапах ранового процесу (рис.4.11).

Показано зростання вмісту шиффових основ в групі тварин з хімічним опіком на 3 добу ранового процесу – в 2,8 рази та в день епітелізації рани – в 2,1 рази ($p < 0,05$), порівняно з контрольною групою тварин.

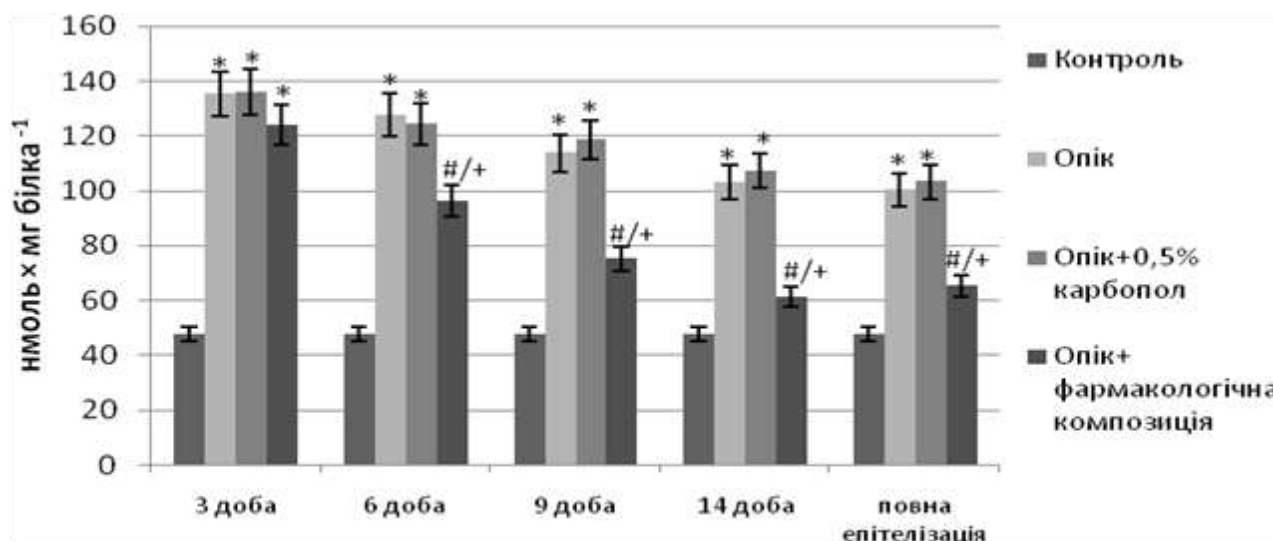


Рис.5.12. Вміст шиффових основ у гомогенаті шкіри щурів з хімічним опіком шкіри, ($M \pm m$; $n=7$): *- $p \leq 0,05$ порівняно з контрольними тваринами; +- $p < 0,05$ порівняно з групою тварин з опіком; #- $p \leq 0,05$ порівняно з групою тварин, рани яких обробляли карбополом 0,5%.

При корекції патології шкіри фармакологічною композицією на основі меланіну показано зниження рівня шиффових основ починаючи з 6 доби експерименту в 1,3 раза; на 9 добу – в 1,5 раза; на 14 добу – в 1,7 раза; та в день епітелізації рани – в 1,5 раза ($p < 0,05$) відносно групи тварин з хімічним опіком.

Накопичення проміжних та кінцевих продуктів ПОЛ в сироватці крові та гомогенаті шкіри свідчить про розвиток окисного стресу та відтермінує початок репаративних процесів в рані. При травмі шкіри показано збільшення первинних та вторинних продуктів ПОЛ сироватці крові та гомогенаті шкіри. Показано, що активність ПОЛ змінюється відносно стадій ранового процесу.

Узагальнюючи отримані нами дані, можна зробити висновок, що використання фармакологічної композиції на основі меланіну для місцевого лікування уражень шкіри, покращує процеси загоєння рани, поступово знижуючи рівень продуктів ПОЛ починаючи з 6-доби ранового процесу при

корекції різаної рани, та з 9-14 доби при хімічному опіку шкіри. Тому використання дерматотропних препаратів з антиоксидантними властивостями для місцевого лікування, створює сприятливі умови для регенерації пошкоджених тканин та знижує прояви окисного стресу.

РОЗДІЛ 6

АНТИОКСИДАНТНА СИСТЕМА ШКІРИ ТА СИРОВАТКИ КРОВІ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ РАНАХ ТА ЗА УМОВ КОРЕКЦІЇ ФАРМАКОЛОГІЧНОЮ КОМПОЗИЦІЄЮ НА ОСНОВІ МЕЛАНІНУ

Порушення балансу прооксидантно-антиоксидантної системи вважають одним з головних чинників розвитку хронічної рани. Динаміка показників рівня ПОЛ та антиоксидантної системи (АОС) свідчить про продовження або зниження запальної реакції [156]. Тому, поряд з оцінкою інтенсивності процесів ПОЛ, одним із завдань дослідження стало вивчення ферментів АОС в гомогенаті шкіри з ранового вогнища і сироватки крові при фармакотерапії пошкоджень шкіри фармакологічною композицією на основі меланіну.

Прояву негативного шкідливої дії вільних радикалів і перекисних сполук перешкоджає багатокомпонентна антиоксидантна система, забезпечуючи зв'язування і рекомбінацію радикалів, попереджуючи утворення чи руйнування перекисів. Система антиоксидантного захисту організму складається з двох основних ланок: ферментативної і неферментативної. До ферментативної ланки антиоксидантної системи належать супероксиддисмутаза (СОД), каталаза (КАТ), глутатіонпероксидаза (ГП), глутатіонтрансфераза (ГТ), глутатіонредуктаза (ГР), які беруть участь у нейтралізації вільних радикалів. СОД — фермент, який відіграє ключову роль в утилізації супероксидних аніон-радикалів [157, 158]. КАТ каталізує двохелектронне відновлення пероксиду водню до води [159]. Глутатіонпероксидази мають п'ять ізоформ, до яких належить цитозольна (ГП-1), специфічний для епітелію фермент, високо виражений в кишечнику (ГП-2), плазматична (ГП-3) та ГП-4 гідропероксидів ліпідів та ядерна ГП. Відповідно, ГП є найважливішим антиоксидантним ферментом, залученим до запобігання шкідливому накопиченню внутрішньоклітинного перекису водню. ГП, використовує відновлену форму глутатіону в якості субстрату, ефективно розщеплює не тільки перексид водню,

але й органічні гідропрекси. За певних умов її роль в тканинах при знешкодженні пероксиду водню більш важлива ніж каталази, оскільки дія каталази обмежена пероксисомами [160]. ГП має високу спорідненість до H_2O_2 , що визначає її провідну роль в метаболізмі пероксиду водню при знижених фізіологічних концентраціях каталази. Активність ГП підвищується при патологічних станах. Важливу роль у антиоксидантному захисті організму відіграють лутатіон-S-трансферази (ГТ). Це антиоксидантні ферменти, які каталізують кон'югацію відновленого глутатіону (GSH) з різними токсичними сполуками, в тому числі ксенобіотиками і окислювальними похідними (наприклад, ліпіди та ДНК) [161, 162]. Це знижує їх токсичність і полегшує виділення з клітини. Їхня ключова роль в клітині це детоксикаційний захист макромолекул від негативного впливу АФК, канцерогенів та хіміотерапевтичних агентів [163]. Все більше доказів вказують на те, що експресія ГТ і його функції відіграють важливу роль як в прогресуванні росту ракових пухлин так і гострих запальних станів [164, 165]. ГР – це локалізований в цитоплазмі NADPH-залежний фермент, який разом з ГП має найбільше значення для підтримки в організмі певного рівня відновленого глутатіону [166, 167].

6.1. Активність ферментів антиоксидантного захисту при моделюванні вирізаної площинної рани

При дослідженні активності антиоксидантних ферментів встановлено, що у сироватці крові тварин з різаною експериментальною раною, на всіх етапах ранового процесу супероксиддисмутазна активність спадала: на 3 добу – у 11,7 разів ($p < 0,05$) та в день епітелізації рани – у 10,5 разів ($p < 0,05$) відносно показників контрольної групи тварин (рис. 6.1).

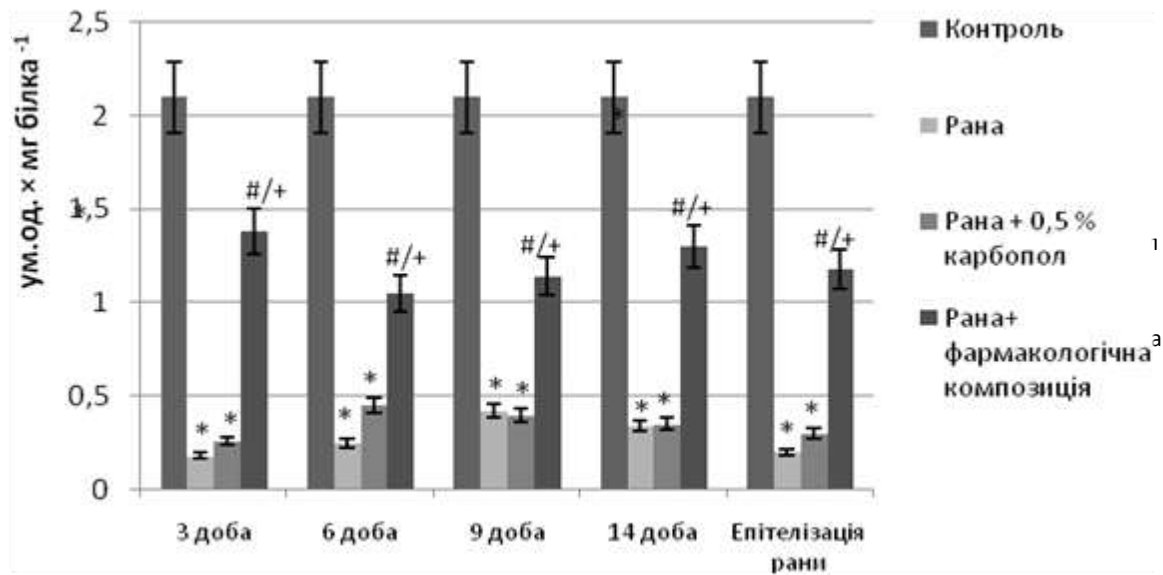


Рис. 6.1. Супероксиддисмутазна активність у сироватці крові щурів з вирізаною площинною раною шкіри, ($M \pm m$; $n=7$): *- $p \leq 0,05$ порівняно з контрольними тваринами; +/- $p < 0,05$ порівняно з групою тварин з раною; #- $p \leq 0,05$ порівняно з групою тварин, рани яких обробляли карбополом 0,5%

У тварин, рани яких обробляли карбополом, не встановлено статистично достовірних змін відносно групи тварин з ранами (рис. 6.1).

Водночас, за умов застосування фармакологічної композиції на основі меланіну, супероксиддисмутазна активність у сироватці крові щурів зростала порівняно з групи тварин з ранами : на 3 добу – у 7,7 раза ($p < 0,05$) та під час епітелізації рани – у 5,9 раз а ($p < 0,05$) (рис. 6.1).

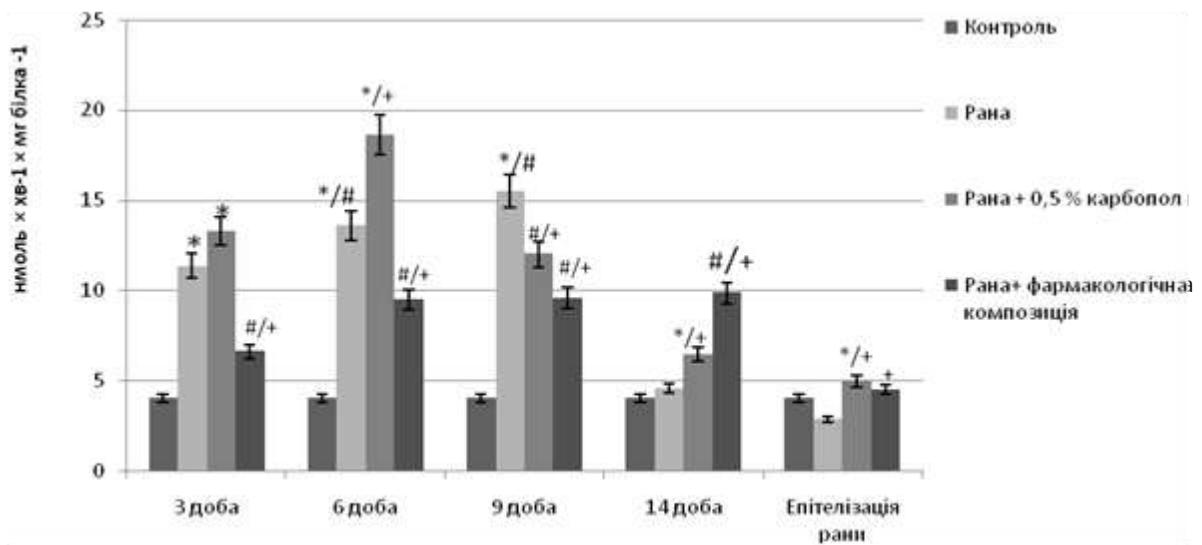


Рис. 6.2. Каталазна активність у сироватці крові щурів з вирізаною площинною раною шкіри, ($M \pm m$; $n=7$): * $-p \leq 0,05$ порівняно з контрольними тваринами; + $- p < 0,05$ порівняно з групою тварин з раною; # $- p \leq 0,05$ порівняно з групою тварин, рани яких обробляли карбополом 0,5%

Було встановлено, що каталазна активність у сироватці крові щурів з ранами, підвищувалася на перших етапах ранового процесу: на 3 добу – у 2,8 ($p < 0,05$) раза, тоді як на 14 добу даний показник лишався без змін, а в день епітелізації рани – знижувався в 1,4 раза ($p < 0,05$) порівняно з контрольною групою тварин. У групі тварин з фармакологічною композицією, каталазна активність у сироватці крові щурів зростала: на 3 добу – в 1,7 раза ($p < 0,05$) у день епітелізації рани – в 1,6 раза ($p < 0,05$) відносно тварин з ранами.

Результати наших досліджень збігаються із даними інших авторів, де в експерименті хронічної рани, в сироватці крові щурів знижується активність антиоксидантних ферментів відносно інтактних тварин [168].

Активність ферменту першої лінії захисту клітин від вільних радикалів – СОД під впливом фармакологічної композиції на основі меланіну підвищувалась, починаючи з 6-доби експерименту, активність КАТ

знижувалась та в подальшому поверталась до рівня контрольних значень. Отже, при травмуванні шкіри в сироватці крові спостерігається підвищення активності ферментів АОС, що свідчить про мобілізацію захисних механізмів, меланін який входить до складу фармакологічної композиції відновлює рівень АОС ферментів.

Однією з основних функцій антиоксидантів, що містяться в плазмі крові є зв'язування іонів металів для захисту організму від шкідливого впливу активних форм кисню, знижуючи їх рівень, адже надмірне утворення може бути основним фактором руйнування тканини і фіброзу, які характерні для різних патологічних станів [169, 170].

Захист тканин від дії АФК здійснюють внутрішньоклітинні ферментні системи і в першу чергу система глутатіону у вигляді відновленого глутатіону і ферментів його метаболізму – головних антиоксидантів в еритроцитах і плазмі крові [170-172].

Надлишок H_2O_2 може призвести до серйозних пошкодження внаслідок утворення гідроксильних радикалів у присутності заліза. Гідроксильні радикали є агресивними до клітин, що призводить до окиснення клітинних макромолекул. Тому H_2O_2 потребує швидкого знешкодження в організмі в якому активну участь приймає ГП [173, 174].

При дослідженні ферментів глутатіонової системи у сироватці крові показано, що активність ГП в групі тварин з різаними ранами зростала в 1,7 ($p < 0,05$) разата 2,2 рази ($p < 0,05$) на 3 добу та в день повної епітелізації рани відповідно, в порівнянні з контрольною групою тварин. В групі щурів, яким наносили фармакологічну композицію, цей показник був в 1,7 ($p < 0,05$), 1,3 ($p < 0,05$), 1,5 ($p < 0,05$) рази більшим на 3, 6 та 9 добу відносно контрольної групи тварин та статистично достовірно не відрізнявся від контрольної групи щурів на 14 добу та в день повної епітелізації рани, проте знижувався в групі тварин, де рани обробляли фармакологічною композицією в 1,8 ($p < 0,05$) та 3,2 рази (p

< 0,05) на 14 добу та в день повної епітелізації рани, в порівнянні з групою тварини з різаними ранами.

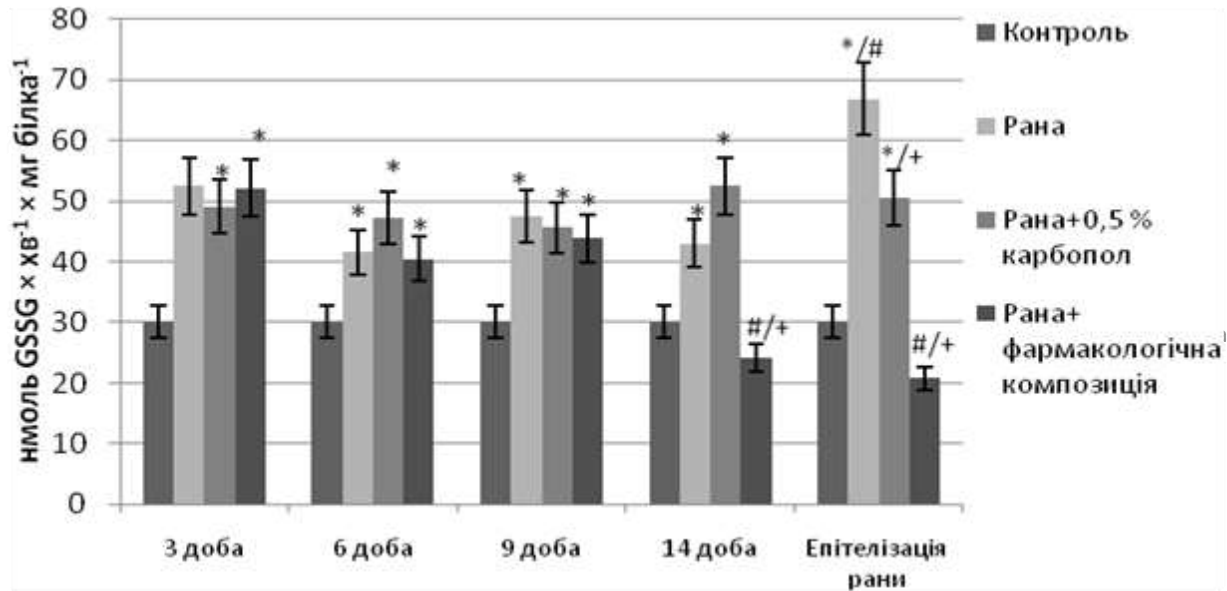


Рис. 6.3. Глутатіонпероксидазна активність у сироватці крові щурів з вирізаною площинною раною шкіри ($M \pm m$; $n=7$): $*-p \leq 0,05$ порівняно з контрольними тваринами; $+ - p < 0,05$ порівняно з групою тварин з раною; $\# - p \leq 0,05$ порівняно з групою тварин, рани яких обробляли карбополем 0,5%

Протягом усього експерименту спостерігалось підвищення ГТ активності в сироватці крові тварин з ранами на 3, 6, 9, 14 добу та в день повної епітелізації рани в 1,4($p < 0,05$)та 1,9 раза ($p < 0,05$) стосовно контрольної групи тварин. Показано збільшення досліджуваного показника в групі тварин, яким рани обробляли фармакологічною композицією на 6 та 9 добу загояння в 1,6 ($p < 0,05$)і 1,7 раза ($p < 0,05$) відповідно, відносно контрольних значень тварин. В той же час показано зниження активності ГЛТ в групі тварин з фармакологічною композицією на 3, 6, 14 добу та в день повної епітелізації рани в 1,5($p < 0,05$), 1,2($p < 0,05$), 1,7 ($p < 0,05$) та 2,0 раза ($p < 0,05$) відповідно, в порівнянні з тваринами з ранами (рис. 6.4).

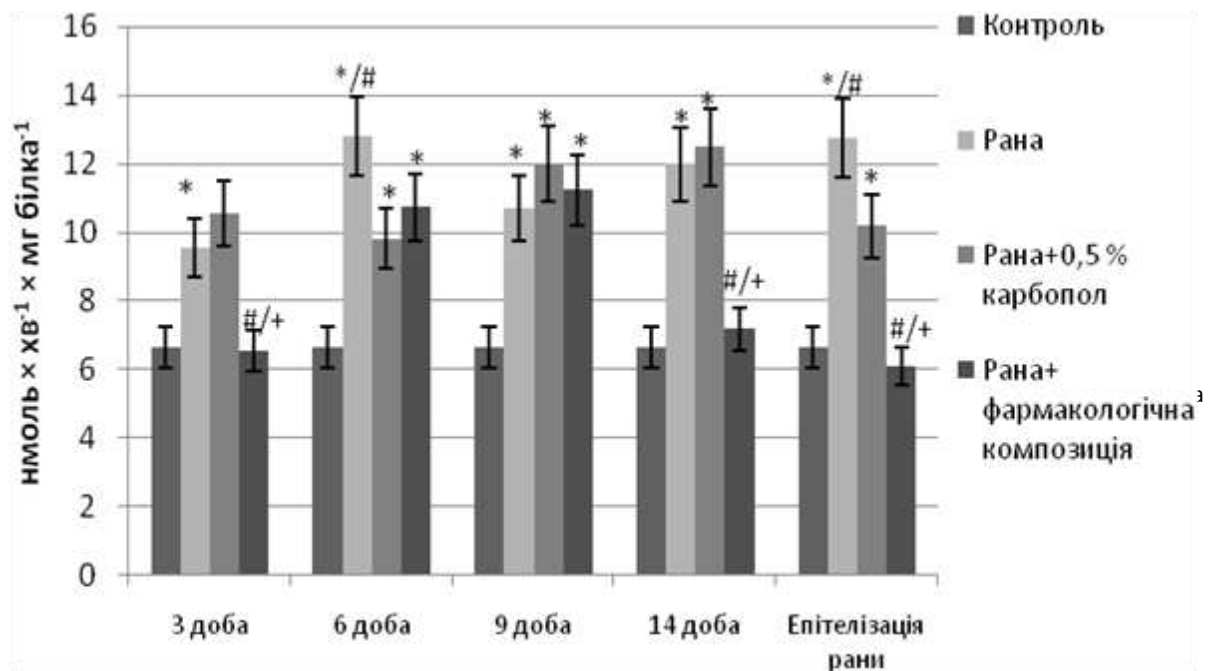


Рис. 6.4. Глутатіонтрансферазна активність сироватці крові щурів з вирізаною площинною раною шкіри ($M \pm m$; $n=7$): * $-p \leq 0,05$ порівняно з контрольними тваринами; + $- p < 0,05$ порівняно з групою тварин з раною; # $- p \leq 0,05$ порівняно з групою тварин, рани яких обробляли карбополом 0,5%

При пошкодженні шкіри активність ГР знижувалась на 3 добу та в день повної епітелізації рани в 1,9 ($p < 0,05$) та 1,5 рази ($p < 0,05$) порівняно з контрольною групою тварин. Схожа картина спостерігалась в групі тварин, яким наносили досліджувану композицію на основі меланіну, даний показник знижувався на 3, 6 та 9 добу експерименту в 1,7 ($p < 0,05$), 1,5 ($p < 0,05$) та 1,3 рази ($p < 0,05$) відповідно, в порівнянні з контрольними тваринами, на 14 добу та в день повної епітелізації рани показник повертався до рівня контрольних значень (рис. 6.5).

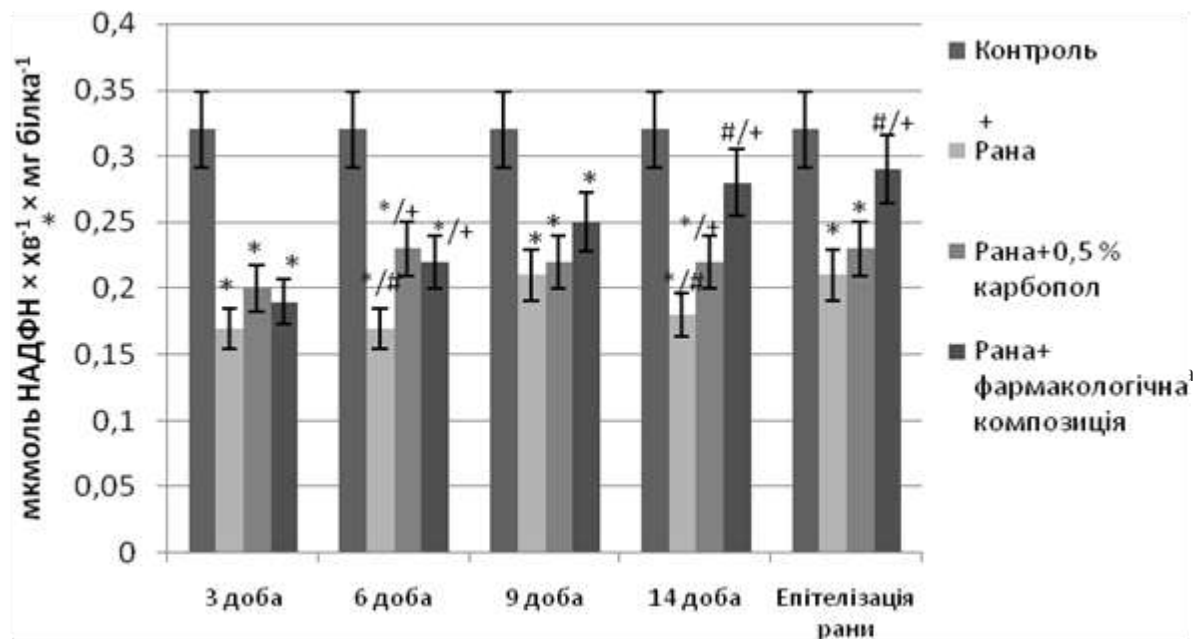


Рис. 6.5. Глутатіонредуктазна активність у сироватці крові щурів з вирізаною площинною раною шкіри ($M \pm m$; $n=7$): *- $p \leq 0,05$ порівняно з контрольними тваринами; +- $p < 0,05$ порівняно з групою тварин з раною; #- $p \leq 0,05$ порівняно з групою тварин, рани яких обробляли карбополем 0,5%

Таким чином, встановлено, що при нанесенні на уражену ділянку шкіри досліджуваної фармакологічної композиції активність ферментів системи глутатіону у сироватці крові знижується в меншому ступені і відновлюється швидше відносно контролю. При порівнянні ефективності застосування карбополу та меланіну, що входить до складу фармакологічної композиції, можна зробити висновок, що саме меланін є домінуючим компонентом який зумовлює фармакологічну дію досліджуваної композиції.

У групі щурів з ранами в сироватці крові вміст відновленого глутатіону знижувався на 3 добу та в день повної епітелізації рани в 4,2 ($p < 0,05$) та 1,4 раза ($p < 0,05$) відповідно, у порівнянні з контрольними тваринами (рис. 6.6).

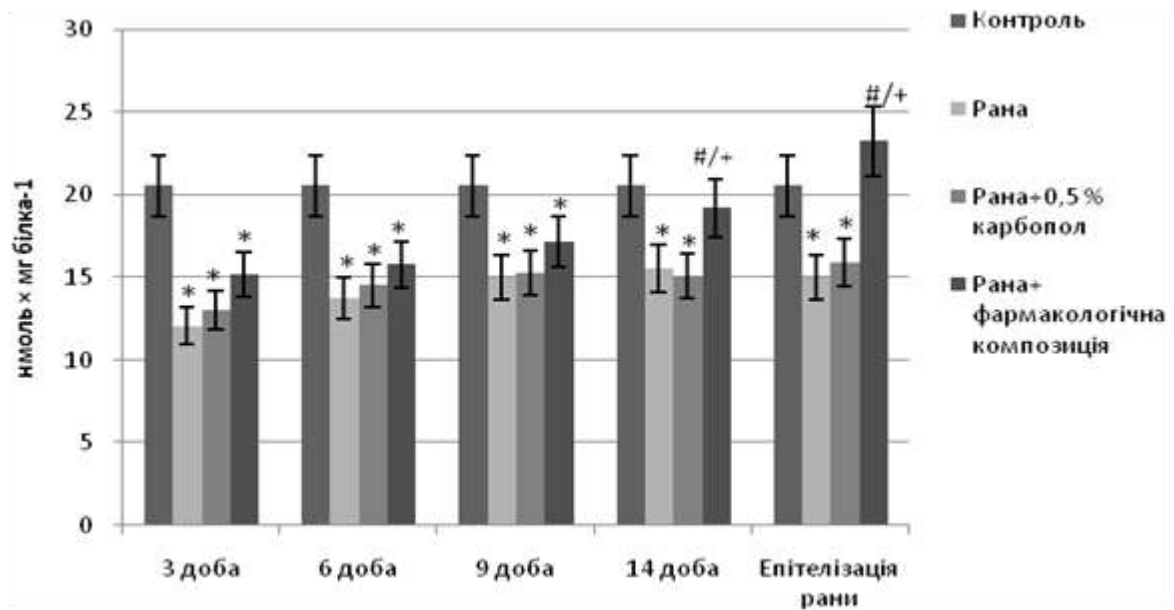


Рис. 6.6. Вміст відновленого глутатіону у сироватці крові щурів з вирізаною площинною раною шкіри ($M \pm m$; $n=7$): * - $p \leq 0,05$ порівняно з контрольними тваринами; +/- $p < 0,05$ порівняно з групою тварин з раною; # - $p \leq 0,05$ порівняно з групою тварин, рани яких обробляли карбополем 0,5%

Вміст досліджуваного показника підвищувався в групі тварин, яким наносили фармакологічну композицію на 3, 14 добу та в день повної епітелізації рани в 1,3 ($p < 0,05$), 1,3 ($p < 0,05$) та 1,6 рази ($p < 0,05$) відповідно, порівняно з контрольною групою тварин (рис. 6.6).

Рівень окисненого глутатіону підвищувався в групі тварин з ранами на 3 добу та в день повної епітелізації рани в 1,5 ($p < 0,05$) та 1,3 рази ($p < 0,05$) відповідно, порівняно з контрольними тваринами. У групі тварин, яким наносили досліджувану композицію концентрація окисненого глутатіону статистично достовірно не відрізнялась від рівня інтактних тварин на усіх етапах ранового процесу, однак знижувалась в 1,3 ($p < 0,05$) та 1,4 рази ($p < 0,05$) на 3 добу та в день повної епітелізації рани, відносно тварин з ранами (рис. 6.7).

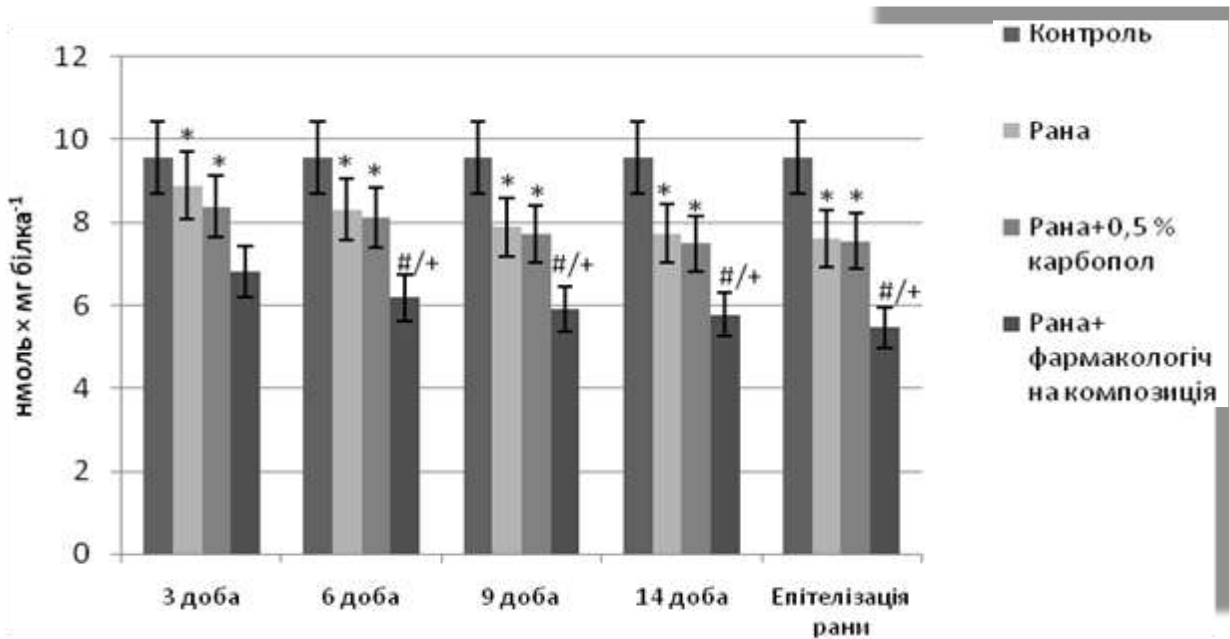


Рис. 6.7. Вміст окисненого глутатіону у сироватці крові щурів з вирізаною площинною раною шкіри ($M \pm m$; $n=7$): * - $p \leq 0,05$ порівняно з контрольними тваринами; +/- $p < 0,05$ порівняно з групою тварин з раною; #- $p \leq 0,05$ порівняно з групою тварин, рани яких обробляли карбополом 0,5%

Отримані нами результати узгоджуються з даними літератури, Santram Lodhi та інші, у своїх дослідках на моделі експериментальних різаних ран спостерігали значне зниження рівня антиоксидантів (СОД, КАТ, і відновленого глутатіону після поранення шкіри [175].

Іншими дослідниками показано, що вплив на шкіру пошкоджуючих чинників (механічне пошкодження, хімічний та термічний опіки) викликає окисний стрес, обумовлений посиленням перекисних процесів. При цьому підвищуються активності основних антиоксидантних ферментів – супероксиддисмутази і ГП. Збільшення активності ГП супроводжується зниженням рівня вмісту відновленого глутатіону, який витрачається в глутатіопероксидазній реакції, а також підвищенням активності каталази, що утилізує перекис водню, який утворився при активації СОД. Зниження активності ГТ, описане роботі [176].

В проведених нами експериментах ми спостерігали зниження активності ГТ та ГР, свідчить про те, що при впливі на шкіру пошкоджуючи чинників, стимулюючих розвиток окисного стресу, відбувається порушення процесу детоксикації продуктів ВРО і їх виведення з організму. Накопичення токсичних продуктів ПОЛ може сприяти окисній модифікації приводити до посилення фрагментації геномної ДНК і індукуванню апоптозу в кератиноцитах [177]

Не менш важливим критерієм білкової модифікації є окиснення їх сульфгідрильних груп, яке може відбуватись як прямим, так і ферментативним шляхом за участю ГП та гідроперекисей ліпідів. Швидкість і характер окиснення сульфгідрильних груп залежать від багатьох чинників: концентрація реагентів, Рн, температура, рКа, просторове розташування SH-груп у білку та їх мікрооточення [178].

Встановлено, що за умов вирізаної площинної рани у сироватці крові щурів вміст сульфгідрильних груп знижується: небілкових SH-груп – в 1,6 ($p < 0,05$) та 1,4 рази ($p < 0,05$) на 3 добу експерименту та в день епітелізації рани, відповідно порівняно з контрольною групою тварин. При використанні фармакологічної композиції на основі меланіну, показано збільшення рівня небілкових SH-груп в 1,7 рази ($p < 0,05$) та 1,2 рази на добу та в день епітелізації рани відповідно щодо щурів з ранами (рис.6.8).

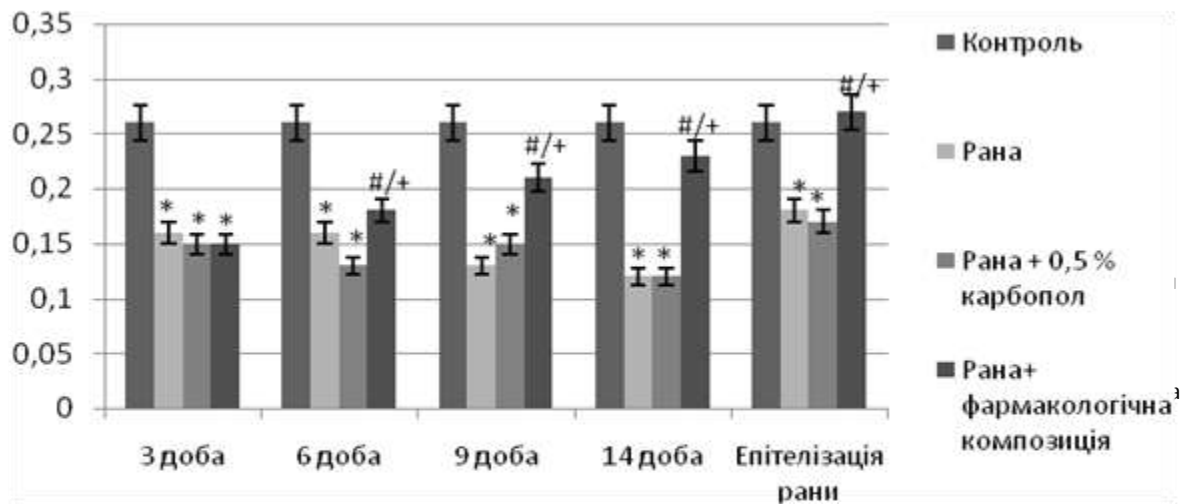


Рис.6.8. Вміст небілкових сульфгідрильних груп у сироватці крові щурів з вирізаною площинною раною шкіри ($M \pm m$; $n=7$): *- $p \leq 0,05$ порівняно з контрольними тваринами; +- $p < 0,05$ порівняно з групою тварин з раною; #- $p \leq 0,05$ порівняно з групою тварин, рани яких обробляли карбополом 0,5%

Також показано зниження вмісту білкових груп в 1,2 ($p < 0,05$) та 1,4 рази ($p < 0,05$) на 3 добу ранового процесу та в день епітелізації рани відповідно порівняно з контрольною групою. При застосуванні фармакологічної композиції на основі меланіну, показано збільшення рівня білкових SH-груп в 1,6 рази ($p < 0,05$) та 1,4 рази ($p < 0,05$) на 6 добу ранового процесу та в день епітелізації рани відповідно щодо щурів з ранами (рис.6.9).

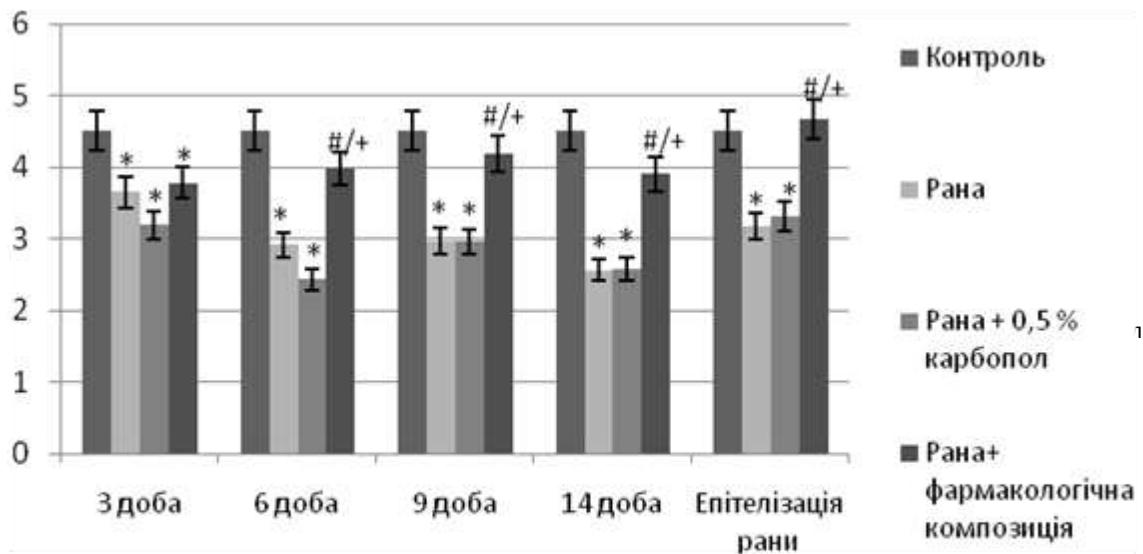


Рис 6.9. Вміст білкових сульфгидрильних груп у сироватці крові щурів з вирізаною площинною раною шкіри ($M \pm m$; $n=7$): *- $p \leq 0,05$ порівняно з контрольними тваринами; +/- $p < 0,05$ порівняно з групою тварин з раною; #- $p \leq 0,05$ порівняно з групою тварин, рани яких обробляли карбополом 0,5%

Вміст загальних SH-груп знижувався в групі щурів з ранами в 1,3 ($p < 0,05$) та 1,4 рази ($p < 0,05$) на 3 добу та в день епітелізації рани, відповідно порівняно з контрольною групою. При використанні фармакологічної композиції на основі меланіну, показано збільшення рівня загальних SH-груп в 1,2 рази ($p < 0,05$) та 3,0 рази на 3 добу та в день епітелізації рани відповідно до щурів з ранами (рис.6.10).

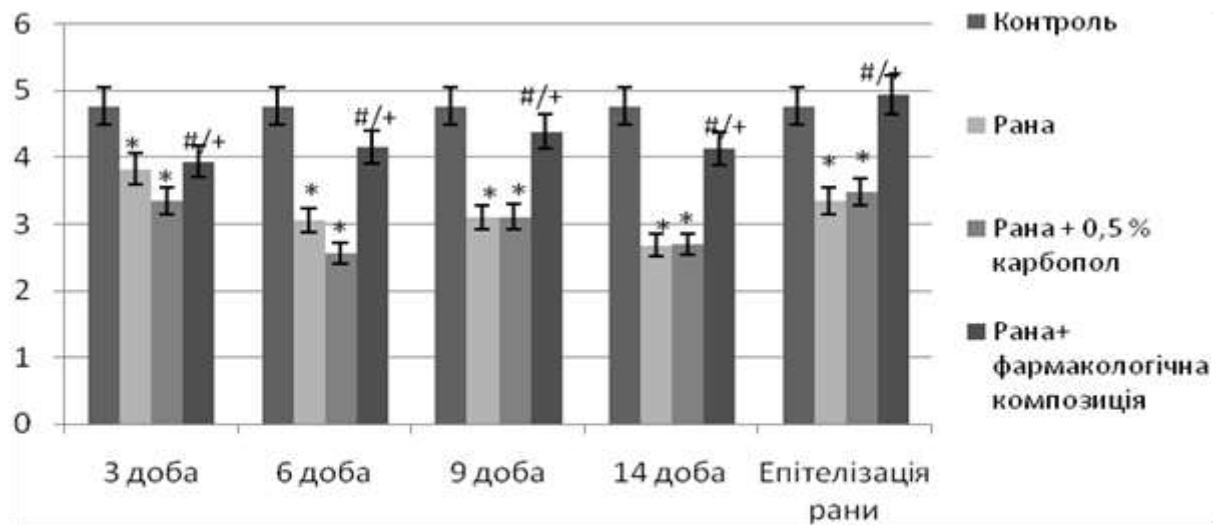


Рис.6.10. Вміст загальних сульфгідрильних груп у сироватці крові щурів з вирізаною площинною раною шкіри ($M \pm m$; $n=7$): *- $p \leq 0,05$ порівняно з контрольними тваринами; +/- $p < 0,05$ порівняно з групою тварин з раною; #- $p \leq 0,05$ порівняно з групою тварин, рани яких обробляли карбополом 0,5%

Встановлене зниження вмісту сульфгідрильних груп у сироватці крові щурів за умов моделювання рани, свідчить про накопичення ковалентних зв'язків за участю цистеїну та метіоніну, а також про окиснення SH-груп.

Згідно отриманих нами даних та результатів попередніх досліджень [179], у щурів з моделлю різаної рани порушується рівновага в системі ПОЛ-АОС в бік активації процесів вільнорадикального окиснення на фоні зниження захисних механізмів організму, що призводить до вивільнення у системний кровообіг продуктів ліпопероксидації та ендотоксинів і сприяє розвитку ендогенної інтоксикації, в результаті чого виникає дисбаланс численних біохімічних процесів, що може впливати на важкість перебігу загоєння ран.

В гомогенаті шкіри щурів з вирізаною площинною раною, показано зростання активності СОД : на 3 добу – в 1,8 раза ($p < 0,05$) та в день епітелізації рани – в 1,3 раза ($p < 0,05$) відносно показників контрольної групи тварин.

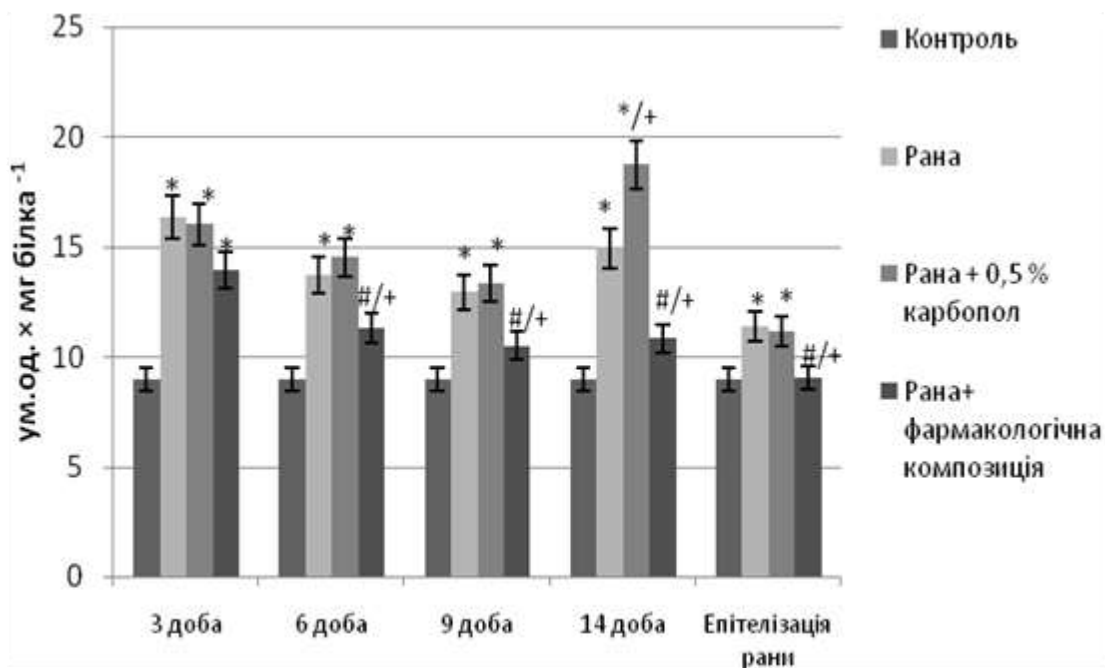


Рис.6.11. Супероксиддисмутазна активність у гомогенаті шкіри щурів з вирізаною площинною раною шкіри ($M \pm m$; $n=7$): $*-p \leq 0,05$ порівняно з контрольними тваринами; $+ - p < 0,05$ порівняно з групою тварин з раною; $\# - p \leq 0,05$ порівняно з групою тварин, рани яких обробляли карбополом 0,5%

У тварин, рани яких обробляли карбополом показники СОД активності статистично достовірно не відрізнялись від щурів з ранами (рис.5.8). Водночас, за умов застосування фармакологічної композиції на основі меланіну, супероксиддисмутазна активність у гомогенаті шкіри щурів знижувалась порівняно тварин з ранами: на 6 добу – в 1,2 раза ($p < 0,05$) та наближалась до контрольних значень в день епітелізації рани (рис.6.11).

Так як шкіра постійно піддається кисневій токсичності СОД викликала великий інтерес з точки зору загоєння ран [180]. СОД1 та СОД2 мРНК виявляють на високих рівнях в ранових пошкодженнях, про що свідчить виявлення РНК за допомогою гібридизації *in situ* [181].

Проте, навпаки активність СОД зменшувалась під час загоєння ран у щурів, також виявлено зниження рівня білка СОД1 в процесі гоєння ран, ці дані узгоджуються із зменшенням сумарної активності СОД в рані після пошкодження шкіри [182]. Тому серед дослідників виникло питання чи необхідна активність СОД для загоєння ран. Тому в їхніх дослідженнях було змодельовано рану на спині у СОД-нокаутованих мишей [183]. В результаті досліджень було показано, що гоєння рани після її відтворення значно уповільнювалось у мишей з дефіцитом СОД1 порівняно з мишами дикого типу у віці 20 тижнів. Однак у більш молодих мишей (5-6 тижнів) не спостерігалось різниці в часі загоєння мишей з дефіцитом СОД1 та мишей дикого типу [183].

Каталаза являє собою добре відомий фермент, який локалізований в пероксисомах та каталізує дисмутацію H_2O_2 на молекулу кисню та води. Не дивлячись на те, що рівень експресії мРНК каталази не змінюється при гоєнні ран [182], рівень білка каталази знижується [183]. Надлишкова експресія каталази порушує загоєння ран у мишей [184].

Нашими дослідженнями показано, що каталазна активність у гомогенаті шкіри щурів з ранами, підвищувалася на 6 добу – у 2,2 раза ($p < 0,05$), але на 14 добу та в день епітелізації рани знижувалась в 1,2 раза ($p < 0,05$) та 1,5 раза ($p < 0,05$) відносно контрольної групи, тоді як на 3 та 9 добу даний показник лишався без змін, а в порівняно з контрольною групою тварин. У групі тварин з ранами, які обробляли карбополом також показано схожі зміни каталазної активності щодо контрольної групи тварин та не встановлено статистично достовірної різниці порівняно тварин з ранами. При використанні фармакологічної композиції, каталазна активність у гомогенаті шкіри щурів зростала: на 3 добу – в 1,7 раза ($p < 0,05$), в день епітелізації рани цей показник наближався до значень контрольної групи тварин (рис.6.12).

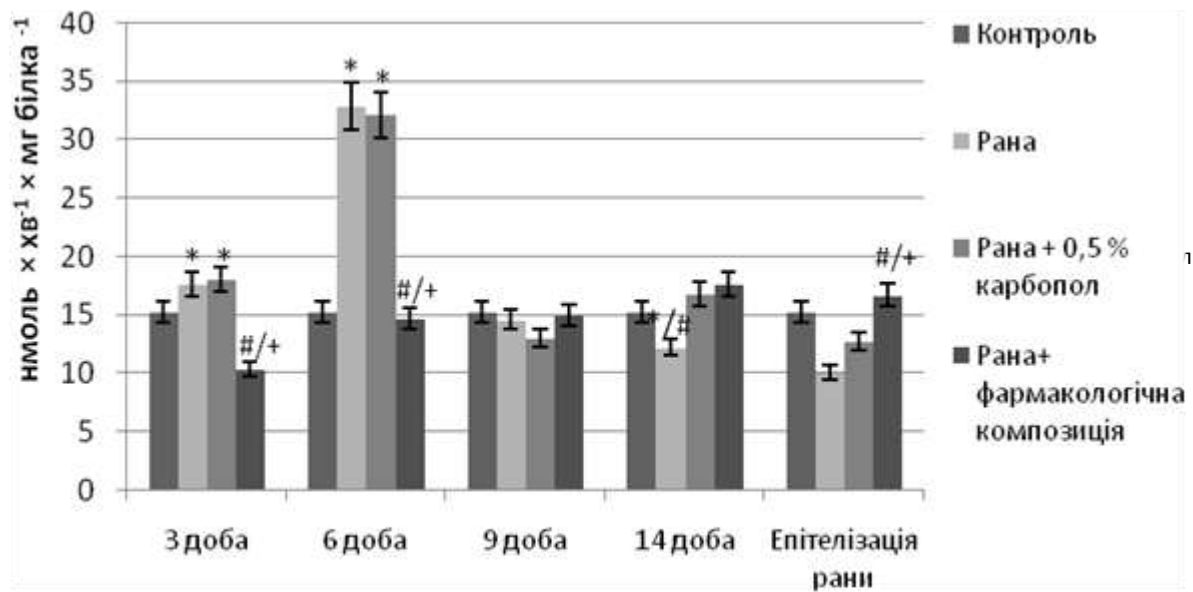


Рис 6.12. Каталазна активність у гомогенаті шкіри щурів з вирізаною площинною раною шкіри ($M \pm m$; $n=7$): * - $p \leq 0,05$ порівняно з контрольними тваринами; +- $p < 0,05$ порівняно з групою тварин з раною; #- $p \leq 0,05$ порівняно з групою тварин, рани яких обробляли карбополом 0,5%

Запалення є важливою реакцією на захист від шкідливих чинників тому є важливим при загоєнні ран. Проте, ускладнений перебіг запалення може призвести до хронічної рани, з додатковим пошкодженням тканини.

Дослідниками показано, що рівень антиоксидантів знижується разом з підвищенням рівня маркерів перекисного окиснення ліпідів у крові хворих на псоріаз [185; 186]. Крім того, рівень каталази у хворих на псоріаз був підвищеним [187] також були підвищенні показники активності СОД, рівень пероксиредоксину (Prdx) та ГП при псоріатичних ураженнях шкіри [185].

При дослідженні ферментів глутатіонової системи у шкірі тварин показано, що активність ГП групі тварин з різними ранами зростала в 1,8 ($p < 0,05$) на 3 добу, але в подальшому знижувалась в порівнянні з контрольною групою тварин. В групі щурів, яким наносили фармакологічну композицію, цей

показник був підвищеним в 1,7($p < 0,05$) відносно контрольної групи тварин та статистично достовірно не відрізнявся від групи щурів з ранами, проте підвищувався починаючи з 9 добив групі тварин, де рани обробляли фармакологічною композицією в 1,4($p < 0,05$), 1,6 раза ($p < 0,05$) та 1,6 раза ($p < 0,05$) на 14 добу та в день повної епітелізації рани, в порівнянні з групою тварини з різаними ранами. При використанні карбополу не було виявлено статично достовірних відносно групи тварин з ранами (рис.6.13).

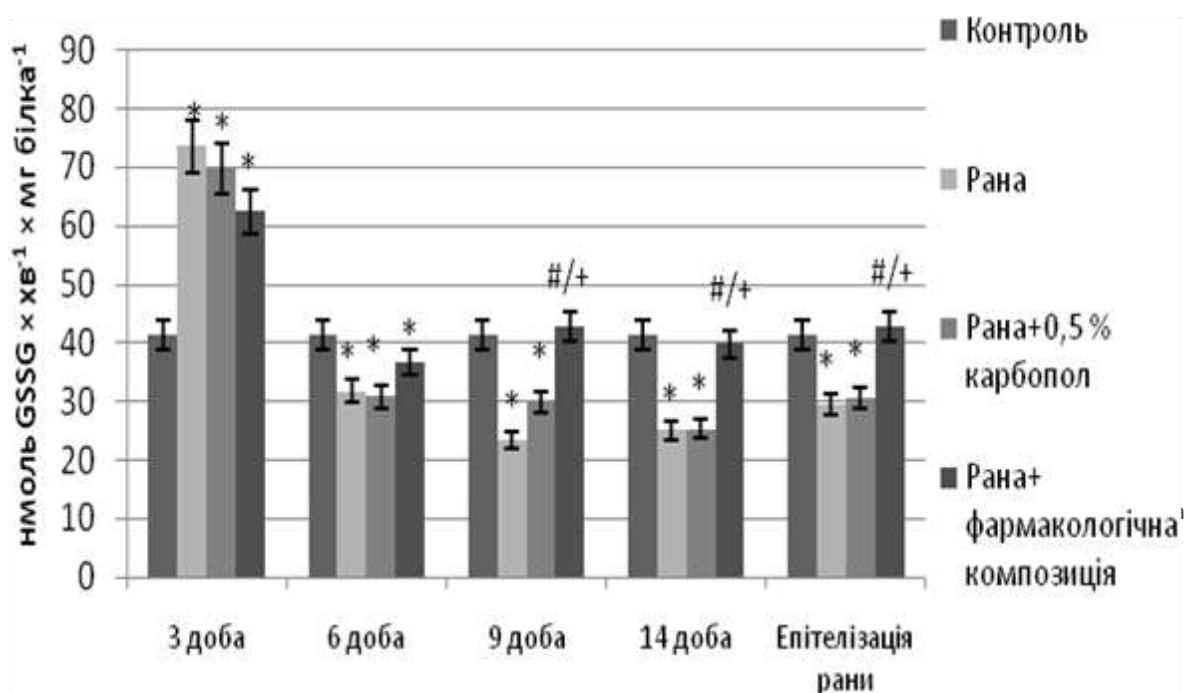


Рис. 6.13. Глутатіонпероксидазна активність (ГП) у гомогенаті шкіри щурів з вирізаною площинною раною ($M \pm m$; $n=7$): *- $p \leq 0,05$ порівняно з контрольними тваринами; +- $p < 0,05$ порівняно з групою тварин з раною; #- $p \leq 0,05$ порівняно з групою тварин, рани яких обробляли карбополом 0,5%

Протягом усього експерименту спостерігались різнонаправлені зміни ГТв

гомогенаті шкіри тварин з ранами на 3, 6, 9 добу показано зростання досліджуваного показника в 1,7 ($p < 0,05$), 1,5 ($p < 0,05$), 1,3 ($p < 0,05$) раза, проте на 14 добу та в день повної епітелізації рани досліджуваний показник знижувався в 1,6 ($p < 0,05$), та 1,3 раза ($p < 0,05$) стосовно контрольної групи тварин. Показано збільшення досліджуваного показника в групі тварин яким рани обробляли фармакологічною композицією на 14 добу та в день епітелізації рани в 1,5 ($p < 0,05$) та 1,4 раза ($p < 0,05$) відповідно, відносно значень тварин з ранами (рис. 6.14).

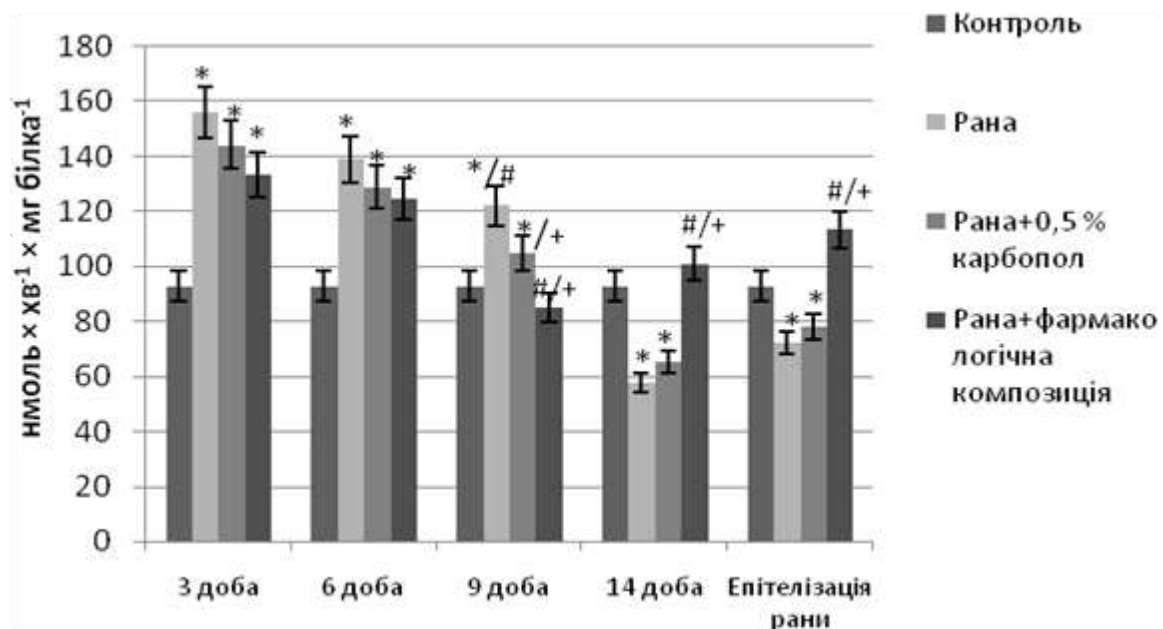


Рис.6.14. Глутатіонтрансферазна активність (ГТ) у гомогенаті шкіри щурів з вирізаною площинною раною ($M \pm m$; $n=7$): * - $p \leq 0,05$ порівняно з контрольними тваринами; + - $p < 0,05$ порівняно з групою тварин з раною; # - $p \leq 0,05$ порівняно з групою тварин, рани яких обробляли карбополом 0,5%

При пошкодженні шкіри активність ГР знижувалась на 3 добу та в день повної епітелізації рани в 2,6 ($p < 0,05$) та 2,0 раза ($p < 0,05$) порівняно з контрольною групою тварин. За умов нанесення досліджуваної композиції на основі меланіну, даний показник зростав на 6 добу експерименту та в день

епітелізації рани в 2,7 ($p < 0,05$) та 1,4 рази відповідно, в порівнянні з групою тварин з ранами (рис. 6.15).

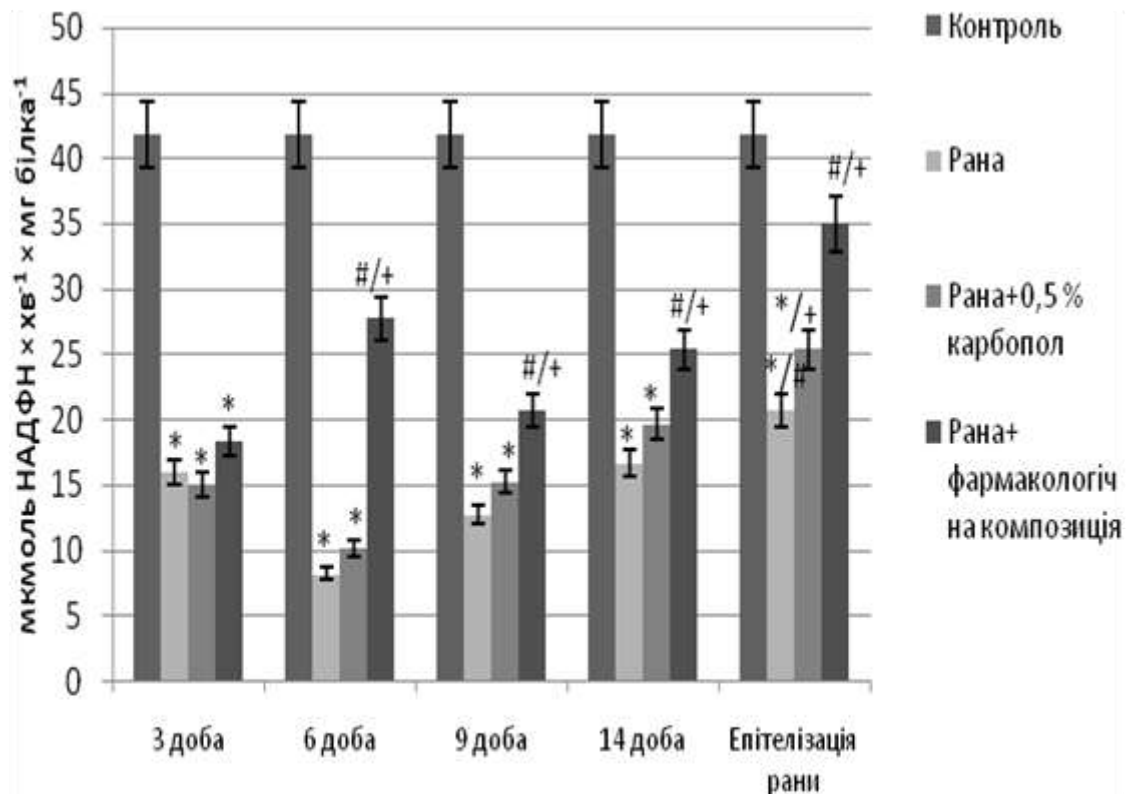


Рис.6.15. Глутатіонредуктазнаактивність у гомогенаті шкіри щурів з вирізаною площинною раною ($M \pm m$; $n=7$): *- $p \leq 0,05$ порівняно з контрольними тваринами; +/- $p < 0,05$ порівняно з групою тварин з раною; #- $p \leq 0,05$ порівняно з групою тварин, рани яких обробляли карбополом 0,5%

Вміст відновленого глутатіону знижувався у групі щурів з ранами в 1,6 ($p < 0,05$) та 1,4 ($p < 0,05$) рази на 3 добу та в день епітелізації рани, відносно значень контрольних тварин. При нанесенні на рану фармакологічної композиції показано зростання даного показника лише на 6 та 14 добу в 1,2 рази ($p < 0,05$) відносно тварин з ранами, в день епітелізацій рани досліджуваний показник повертався до рівня контрольної групи тварин (рис. 6.16).

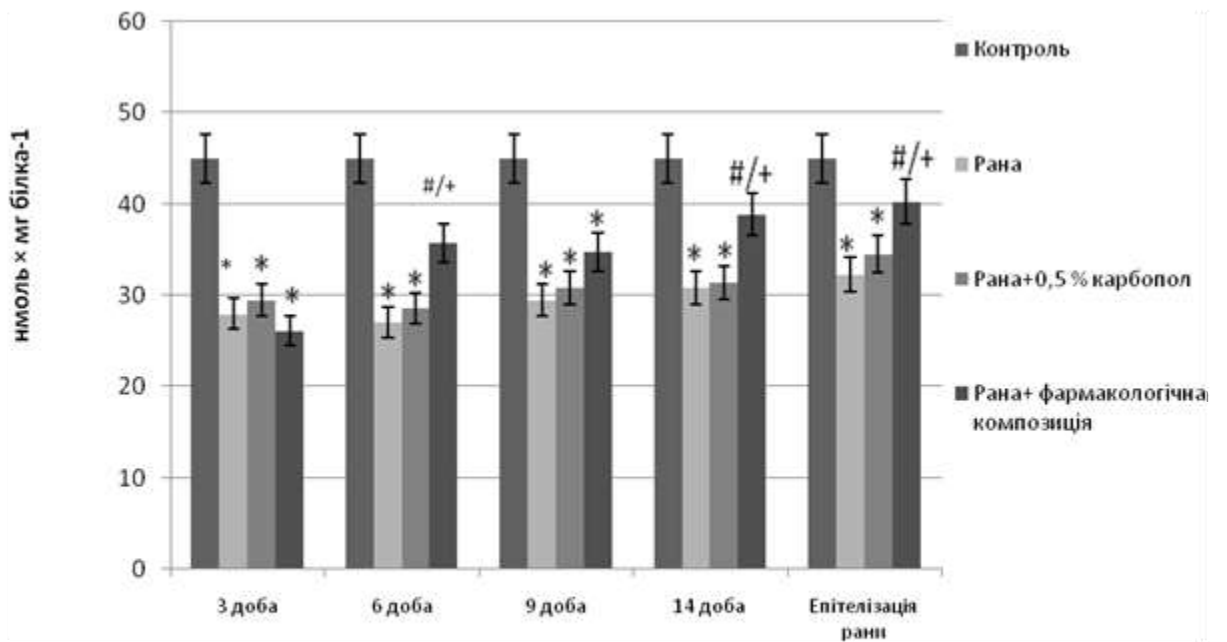


Рис. 6.16. Вміст відновленого глутатіону у гомогенаті шкіри щурів з вирізаною площинною раною ($M \pm m$; $n=7$): * $-p \leq 0,05$ порівняно з контрольними тваринами; + $- p < 0,05$ порівняно з групою тварин з раною; # $- p \leq 0,05$ порівняно з групою тварин, рани яких обробляли карбополом 0,5%

Рівень окисненого глутатіону підвищувався в групі тварин з ранами на 3 добу та в день повної епітелізації рани в 2,0 ($p < 0,05$) та 1,4 раза ($p < 0,05$) відповідно, порівняно з контрольними тваринами. У групі тварин, яким наносили досліджувану композицію концентрація окисненого глутатіону знижувалась в 1,3 ($p < 0,05$) та 1,5 раза ($p < 0,05$) на 3 добу та в день повної епітелізації рани, відносно тварин з ранами.

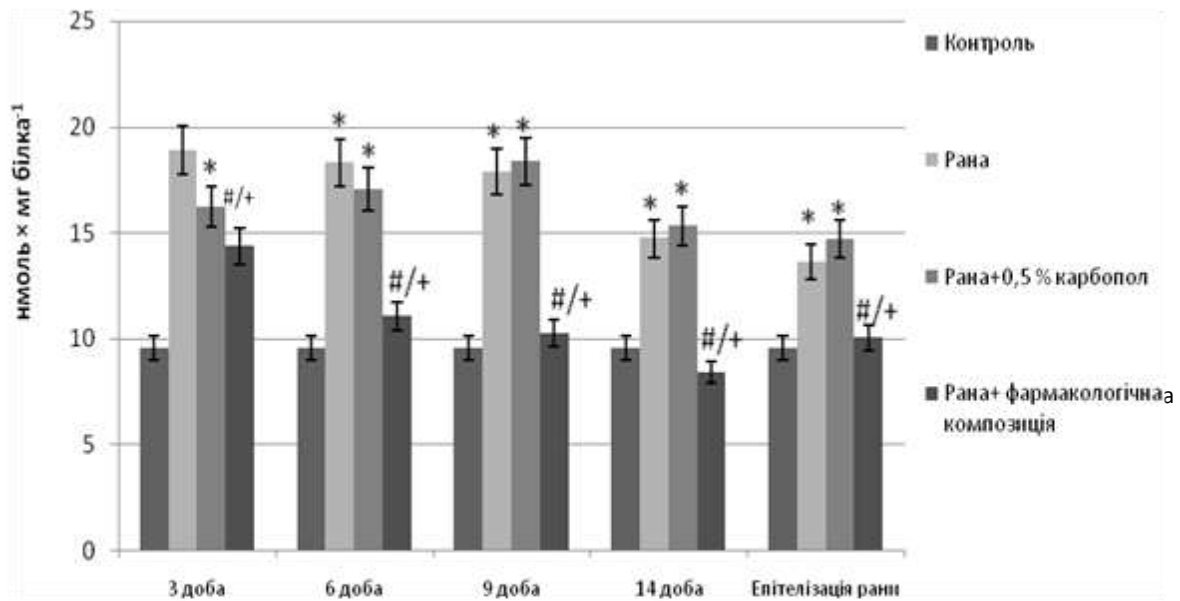


Рис.6.17. Вміст окисненого глутатіону у гомогенаті шкіри щурів з вирізаною площинною раною ($M \pm m$; $n=7$): *- $p \leq 0,05$ порівняно з контрольними тваринами; +/- $p < 0,05$ порівняно з групою тварин з раною; #- $p \leq 0,05$ порівняно з групою тварин, рани яких обробляли карбополом 0,5%

Отримані результати узгоджуються з даними інших дослідників, що при запальних захворюваннях шкіри, зростають активності ГП, ГТ та знижується активність СОД, що супроводжується зниженням активності АОС [188-190]. Відбувається підвищення продукція АФК, що переважає їх інактивацію, як результат пошкоджуються клітини та порушуються процеси репарації.

До глутатіонзалежних антиоксидантних ферментів, котрі утилізують не тільки АФК, але й продукти пероксидації органічних біомолекул, як ми вже згадували належать ГП та ГТ. Діючи разом вони забезпечують захист від

пошкоджуючої дії АФК та вільних радикалів, доповнюючи антиоксидантну активність один одного.

Встановлено, що за умов вирізаної площинної рани у гомогенаті шкіри щурів вміст сульфгідрильних груп знижується: небілкових SH-груп – в 2,2 ($p < 0,05$), 2,0 ($p < 0,05$), 2,0 ($p < 0,05$), 1,6 рази ($p < 0,05$) та та 1,4 ($p < 0,05$) рази на 3, 6, 9, 14 добу ранового процесу та в день епітелізації рани відповідно порівняно з контрольною групою. При нанесенні на рану карбополу, не було показано статистично достовірних змін щодо групи тварин з ранами. При використанні фармакологічної композиції на основі меланіну, показано збільшення рівня небілкових SH-груп в 1,2 рази ($p < 0,05$), 1,7 ($p < 0,05$), 1,7 ($p < 0,05$), 1,5 ($p < 0,05$) та 1,2 ($p < 0,05$) рази на 3, 6, 9, 14 добу та в день епітелізації рани щодо щурів з ранами, тварин з ранами (рис. 6.18).

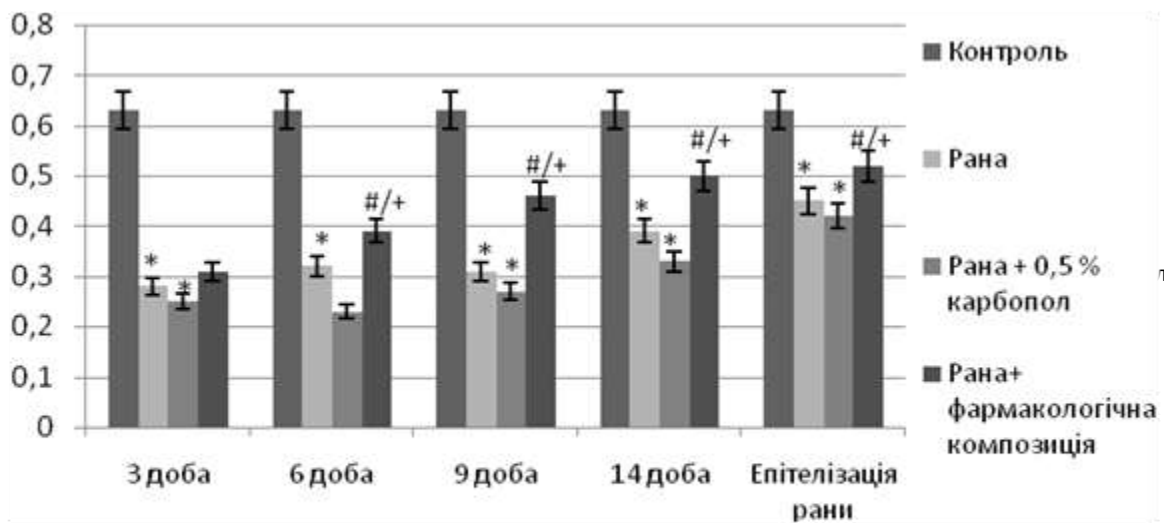


Рис. 6.18. Вміст небілкових сульфгідрильних груп у гомогенаті шкіри щурів з вирізаною площинною ранною шкіри ($M \pm m$; $n=7$): * - $p \leq 0,05$ порівняно з контрольними тваринами; + - $p < 0,05$ порівняно з групою тварин з ранною; # - $p \leq 0,05$ порівняно з групою тварин, рани яких обробляли карбополом 0,5%

Також показано зниження вмісту білкових груп в 1,8 ($p < 0,05$), 1,4 ($p < 0,05$) та 1,6 рази ($p < 0,05$) на 9,14 добу та в день епітелізації рани відповідно порівняно з контрольною групою тварин. При використанні фармакологічної композиції на основі меланіну, показано збільшення рівня білкових SH-груп в 1,7 ($p < 0,05$), 1,5 ($p < 0,05$) та 1,3 ($p < 0,05$) рази на 9, 14 добу та в день епітелізації рани відповідно щодо щурів з ранами (рис. 6.19).

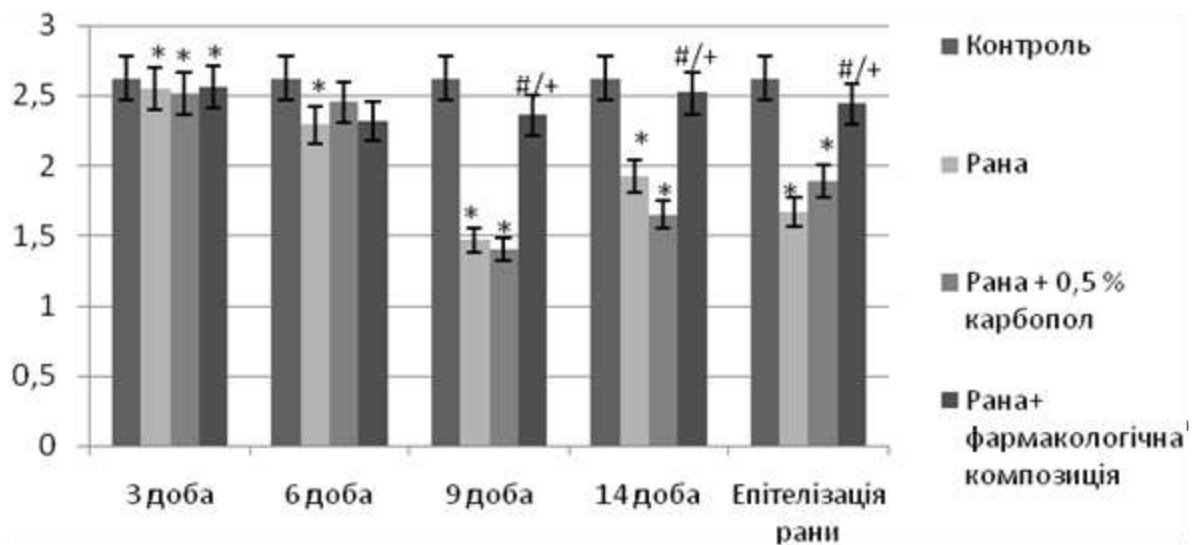


Рис. 6.19. Вміст білкових сульфгдрильних груп у гомогенаті шкіри щурів з вирізаною площинною раною шкіри ($M \pm m$; $n=7$): * - $p \leq 0,05$ порівняно з контрольними тваринами; +/- $p < 0,05$ порівняно з групою тварин з раною; # - $p \leq 0,05$ порівняно з групою тварин, рани яких обробляли карбополем 0,5%

Вміст загальних SH-груп знижувався в групі щурів з ранами в 1,2 ($p < 0,05$), 1,8 ($p < 0,05$), 1,4 ($p < 0,05$) та 1,5 рази ($p < 0,05$) на 6, 9, 14 добу та в день епітелізації рани відповідно порівняно з контрольною групою. При нанесенні на рану фармакологічної композиції на основі меланіну, показано збільшення рівня небілкових SH-груп в 1,7 ($p < 0,05$), 1,5 ($p < 0,05$) та 1,3 ($p < 0,05$) рази на 6,

9, 14 добу ранового процесу та в день епітелізації рани відповідно щодо щурів з ранами(рис. 6.20).

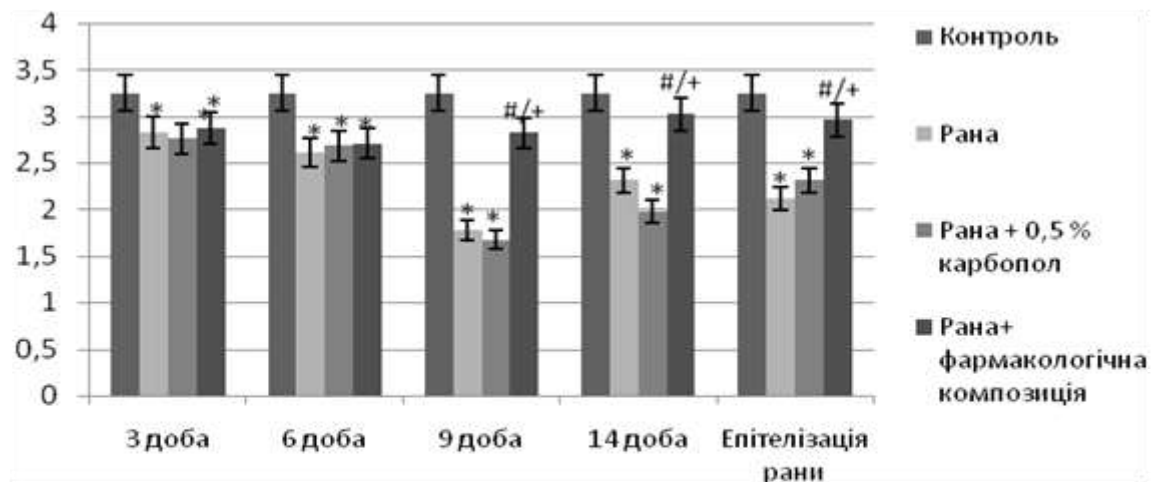


Рис 6.20. Вміст загальних сульфгідрильних груп у гомогенаті шкіри щурів з вирізаною площинною раною шкіри ($M \pm m$; $n=7$): * $-p \leq 0,05$ порівняно з контрольними тваринами; + $- p < 0,05$ порівняно з групою тварин з раною; # $- p \leq 0,05$ порівняно з групою тварин, рани яких обробляли карбополом 0,5%

Отже, вирізана площинна рана характеризується суттєвими змінами активності ферментів антиоксидантного захисту, а створена нами фармакологічна композиція на основі меланіну зменшує активацію вільнорадикальних процесів та підвищує антиоксидантний захист, забезпечуючи стабілізацію клітинних мембран.

Таким чином, вивчаючи біохімічні особливості перебігу загоєння вирізаних площинних ран, можна дійти до висновку, що динаміка змін показників в активності системи антиоксидантного захисту на різних етапах ранового процесу свідчить про більш ефективне застосування фармакологічної композиції на основі меланіну при епітелізації рани.

6.2. Активність ферментів антиоксидантного захисту при моделюванні хімічного опіку шкіри

АФК беруть участь в низкій дегенеративних захворювань, таких як атеросклероз, рак, цироз та діабет, також загоєння ран [190]. Антиоксиданти посилюють загоєння інфікованих та неінфікованих ран, зменшуючи пошкодження викликані АФК [191].

Одним із чинників, необхідних для загоєння ран, є редокс-гомеостаз. Це може бути досягнуто шляхом контролю балансу між утворенням АФК та антиоксидантними ферментами [192]. Роль АФК у фазі запалення добре відома, коли клітини запалення мігрують у рану і секретують АФК, тим самим атакують збудників, сприяють ангіогенезу та повторній епітелізації [193;194]. Крім того, антиоксидантні ферменти відіграють важливу роль у детоксикації АФК в шкірі, щоб уникнути окисного стресу та максимізувати загоєння рани.

В сироватці крові щурів з хімічним опіком, показано зниження активності СОД : на 3 добу – в 3,2 рази ($p < 0,05$), на 6 добу – в 1,8 рази ($p < 0,05$), на 9 добу – в 1,9 рази ($p < 0,05$), на 14 добу – у 1,7 рази ($p < 0,05$) та в день епітелізації рани – в 1,7 рази ($p < 0,05$) відносно показників контрольної групи тварин. Статистично достовірних змін не було встановлено у щурів рани яких обробляли карбополом щодо щурів з ранами. Проте за умов застосування фармакологічної композиції на основі меланіну, супероксиддисмутазна активність у сироватці крові щурів зростала порівняно тварин з ранами : на 3 добу – в 1,7 рази ($p < 0,05$), на 6 добу – в 1,4 рази ($p < 0,05$), на 9 добу – в 1,4 рази ($p < 0,05$), на 14 добу – в 1,8 рази ($p < 0,05$) та під час епітелізації рани – в 1,7 рази ($p < 0,05$).

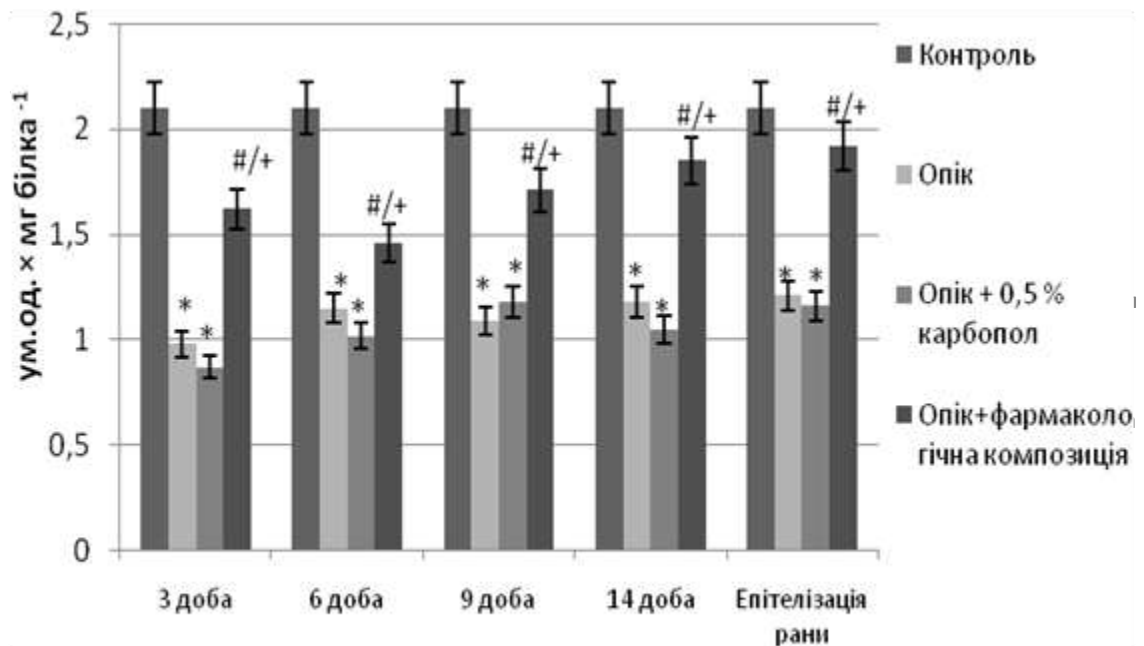


Рис 6.21. Супероксиддисмутна активність у сироватці крові щурів з хімічним опіком шкіри, ($M \pm m$; $n=7$): *- $p \leq 0,05$ порівняно з контрольними тваринами; +- $p < 0,05$ порівняно з групою тварин з раною; #- $p \leq 0,05$ порівняно з групою тварин, рани яких обробляли карбополом 0,5%

Ці результати збігаються з дослідженням інших авторів, де рани оброблені Р. Масгосагра, показали значно знижений рівень МДА, TNF- α , що свідчить про те, що активність КАТ активно підвищується у відповідь на окисний стрес [195].

У експериментах інших дослідників показано зниження активностіСОД у гомогенатах шкіри з раниконтрольної групи, обробленої засобом для лікування ран, пояснюється збільшенням продукування АФК, що може знизити антиоксидантну активність ферменту [196].

Показано,що каталазна активність у сироватці крові щурів з опіками, підвищувалася на перших етапах ранового процесу: на 3 добу – в5,0 раз($p < 0,05$),

на 6 добу – в 4,8 раза ($p < 0,05$), на 9 добу – в 4,2 раза ($p < 0,05$), на 14 добу – в 3,0 раза ($p < 0,05$) та в день епітелізації рани – в 2,6 раза ($p < 0,05$) відносно контрольної групи тварин. У групі тварин з карбополом, каталазна активність у сироватці крові щурів статистично достовірно не відрізнялась відносно тварин з ранами. У групі тварин, яким наносили фармакологічну композицію, каталазна активність у сироватці крові знижувалась на 3, 6, 9, 14 добу ранового процесу та при епітелізації рани в 1,4 ($p < 0,05$), 1,4 ($p < 0,05$), 1,2 ($p < 0,05$), 1,4 раза ($p < 0,05$) та 1,6 ($p < 0,05$) раза відповідно, порівняно групи тварин з ранами (рис. 6.22).

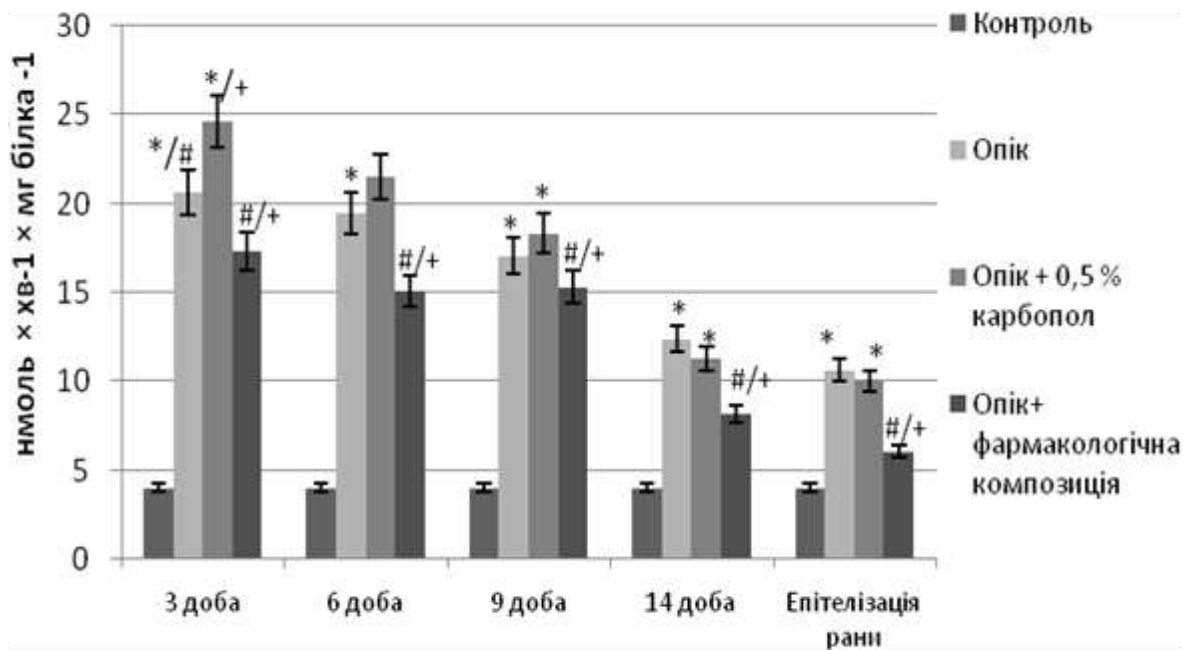


Рис 6.22. Каталазна активність у сироватці крові щурів з хімічним опіком шкіри, ($M \pm m$; $n=7$): *- $p \leq 0,05$ порівняно з контрольними тваринами; +/- $p < 0,05$ порівняно з групою тварин з раною; #- $p \leq 0,05$ порівняно з групою тварин, рани яких обробляли карбополом 0,5%

Також було показано зміну рівнів антиоксидантних ферментів під час загоєння ран у хворих на цукровий діабет і у людей старечого віку. Антиоксиданти відіграють важливу роль як первинний захист від пошкодження тканин шкіри. АФК вважаються специфічними вторинними месенджерами в сигнальних каскадах в ангиогенезі [197; 198].

Важливу роль в патогенезі шкірних уражень, псоріазу, відіграють вільнорадикальні процеси, а зсув балансу в бік окиснюваних процесів призводить до розвитку оксидативного стресу, що виявляється в надлишковому утворенні АФК і недостатньому утворенні ферментів антиоксидантного захисту. Захист від пошкоджуючої дії активних форм кисню забезпечують антиоксидантні ферменти: СОД, КАТ, ферменти системи глутатіону, основна частина яких зосереджена в плазмі і еритроцитах. Важливим компонентом антиоксидантної системи є глутатіон залежна ланка: ГП, ГТ, ГР.

Тому ми дослідили активність ферментів глутатіонової системи в сироватці крові щурів з хімічним опіком шкіри. В результаті проведеного експерименту показано зміни в активності ГП, а саме підвищення в дослідній групі з ранами в 2,4 ($p < 0,05$), 2,1 ($p < 0,05$), 2,2 ($p < 0,05$), 2,0 ($p < 0,05$) та 2,7 ($p < 0,05$) рази 3, 6, 9, 14 добу та в день повної епітелізації рани відповідно, в порівнянні з контрольною групою тварин. В групі щурів яким наносили карбопол не виявлено статистично достовірних змін щодо щурів з ранами. В групі тварин, де рани обробляли фармакологічною композицією спостерігалось статистично достовірне зниження досліджуваного показника в 1,4 ($p < 0,05$), 1,8 рази ($p < 0,05$) та в 3,1 рази ($p < 0,05$) на 9, 14 добу та в день повної епітелізації рани, в порівнянні з групою тварини з хімічним опіком (рис.6.23).

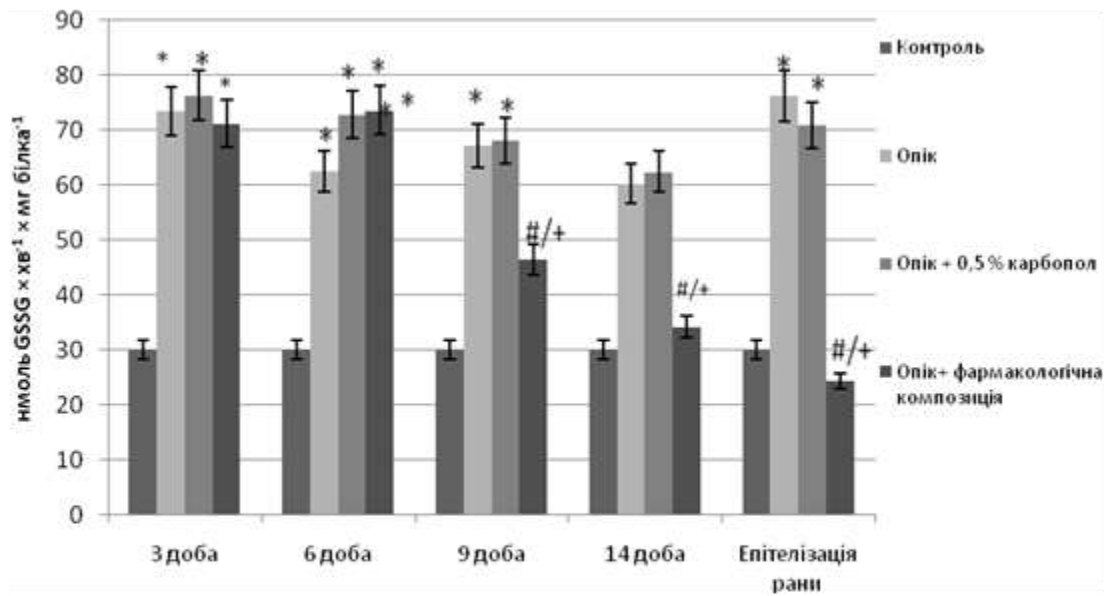


Рис 6.23. Глутатіонпероксидазнаактивність у сироватці крові щурів зхімічним опіком шкіри ($M \pm m$; $n=7$): *- $p \leq 0,05$ порівняно з контрольними тваринами; +/- $p < 0,05$ порівняно з групою тварин з раною; #- $p \leq 0,05$ порівняно з групою тварин, рани яких обробляли карбополом 0,5%

За умов моделювання хімічного опіку шкіри без його лікування спостерігалось підвищення ГТ в сироватці крові на 3, 6, 9, 14 добу та в день повної епітелізації рани в 2,5 ($p < 0,05$), 2,8 ($p < 0,05$), 2,3 ($p < 0,05$), 3,0 ($p < 0,05$), та 3,3 раза ($p < 0,05$) порівняно з контрольною групою тварин. Схожі зміни спостерігали в групі щурів рани яких обробляли карбополом, статистично достовірної різниці між групою щурів з ранами не було виявлено. В той же час показано зниження активності ГТ в групі тварин з фармакологічною композицією на 3,9, 14 добу та в день повної епітелізації рани в 1,5($p < 0,05$), 1,2($p < 0,05$), 1,9($p < 0,05$) та 2,7 раза ($p < 0,05$) відповідно, в порівнянні тварин з ранами (рис. 6.23).

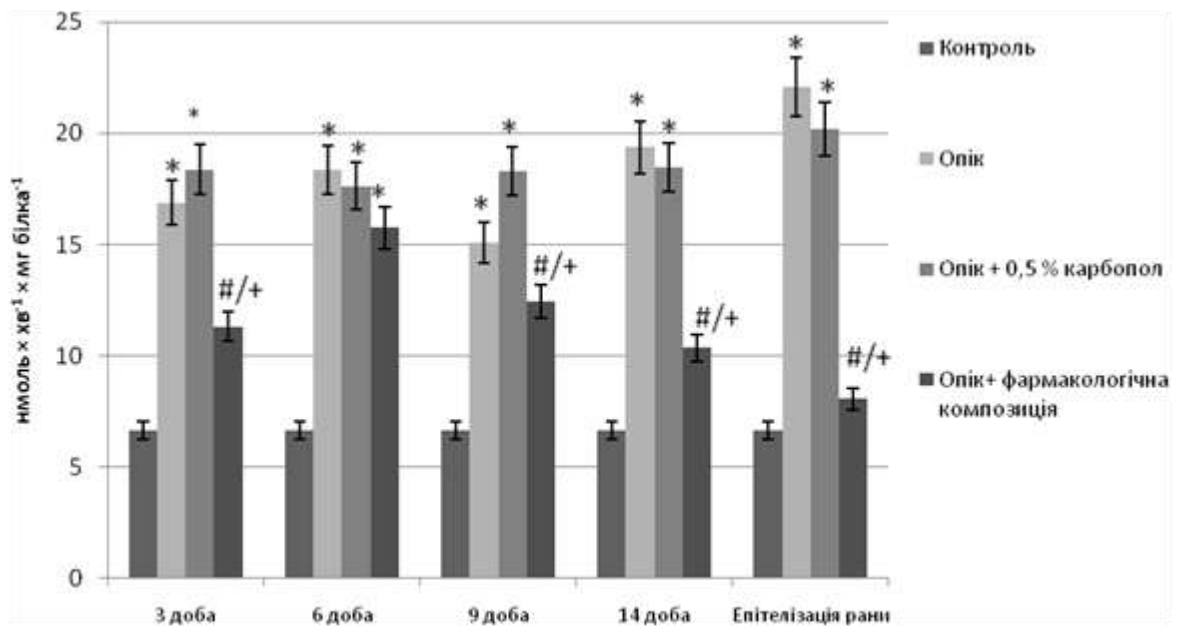


Рис. 6.24. Глутатіонтрансферазнаактивність у сироватці крові щурів зхімічним опіком шкіри ($M \pm m$; $n=7$): * $-p \leq 0,05$ порівняно з контрольними тваринами; + $-p < 0,05$ порівняно з групою тварин з ранною; # $- p \leq 0,05$ порівняно з групою тварин, рани яких обробляли карбополом 0,5%

При дослідженні ГР-ої активності показано її зниження на на 3, 6, 9, 14 доби та в день повної епітелізації рани у щурів з хімічним опіком шкіри в 3,0 ($p < 0,05$), 2,6 ($p < 0,05$), 2,0 ($p < 0,05$), 2,3($p < 0,05$) та 1,8 раза ($p < 0,05$) порівняно з контрольною групою тварин. Подібні зміни спостерігались в групі щурів рани яких змащували карбополом, але не були статистично достовірними порівняно з групою тварин у яких моделювали хімічний опік шкіри. Щурам яким наносили досліджувану композицію на основі меланіну, даний показник підвищувався на 9, 14 добу експерименту та в день повної епітелізації в 1,2 ($p < 0,05$), 1,7 ($p < 0,05$) та 1,4 раза ($p < 0,05$) відповідно, в порівнянні тварин з хімічним опіком (рис. 6.25).

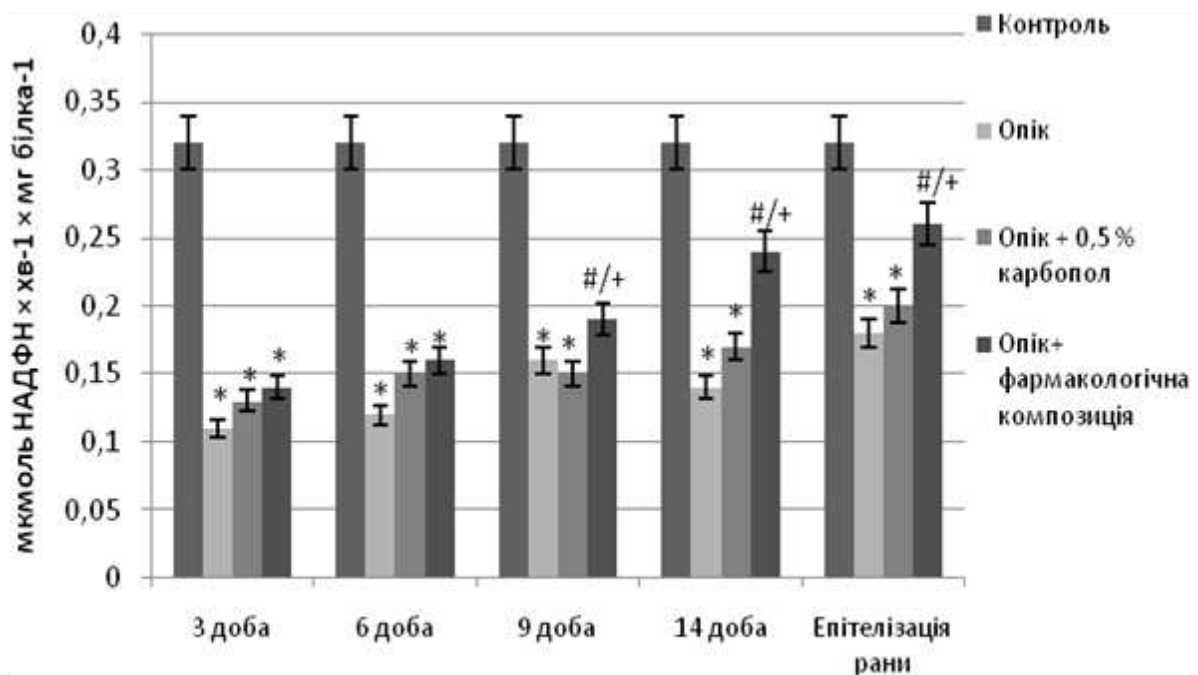


Рис 6.25. Глутатіонредуктазнаактивність у сироватці крові щурів з хімічним опіком шкіри ($M \pm m$; $n=7$): * $-p \leq 0,05$ порівняно з контрольними тваринами; + $- p < 0,05$ порівняно з групою тварин з раною; # $- p \leq 0,05$ порівняно з групою тварин, рани яких обробляли карбополом 0,5%

Вміст відновленого глутатіону знижувався після травмування шкіри в сироватці крові щурів в 3,0 ($p < 0,05$), 2,6 ($p < 0,05$), 2,2 ($p < 0,05$), 1,5 ($p < 0,05$) та 1,4 ($p < 0,05$) рази на 3, 6, 9, 14 добу та в день епітелізації рани відносно значень контрольних тварин. Однак вміст досліджуваного показника підвищувався в групі тварин, яким наносили фармакологічну композицію на 6, 9, 14 добу та в день повної епітелізації рани в 1,2 ($p < 0,05$), 1,6 ($p < 0,05$), 1,3 ($p < 0,05$) та 1,3 рази ($p < 0,05$) відповідно, порівняно з тваринами у яких моделювали опік шкіри. При дослідженні впливу карбополу вміст відновленого глутатіону не було виявлено статистично достовірних змін від групи тварин з опіками (рис. 6.26).

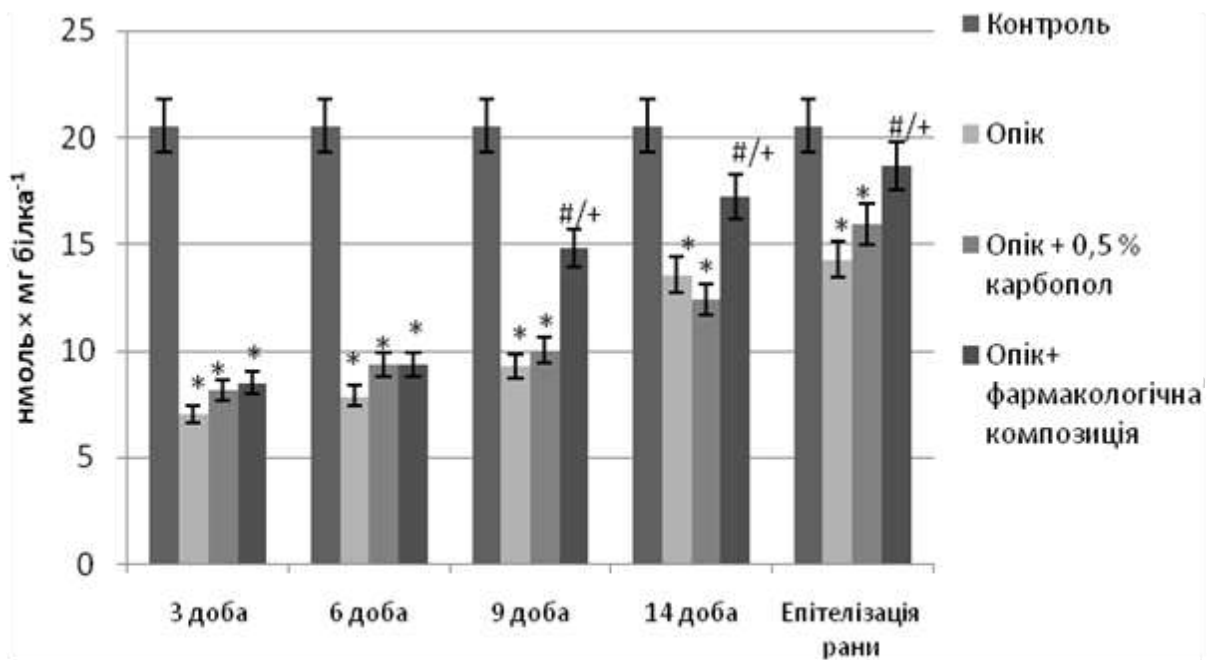


Рис. 6.26. Вміст відновленого глутатіону у сироватці крові щурівзхімічним опіком шкіри ($M \pm m$; $n=7$): * $-p \leq 0,05$ порівняно з контрольними тваринами; + $- p < 0,05$ порівняно з групою тварин з раною; # $- p \leq 0,05$ порівняно з групою тварин, рани яких обробляли карбополом 0,5%

Рівень окисненого глутатіону підвищувався в групі тварин з ранами на 3, 6, 9, 14 добу та в день повної епітелізації рани в 2,0 ($p < 0,05$), 2,1 ($p < 0,05$), 1,8 ($p < 0,05$), 1,6 ($p < 0,05$) та 1,6 рази ($p < 0,05$) відповідно, порівняно з контрольними тваринами. У групі тварин, яким наносили досліджувану композицію концентрація окисненого глутатіону знижувалась в 1,2 ($p < 0,05$), 1,3 ($p < 0,05$), 1,4 рази ($p < 0,05$) на 9, 14 добу та в день повної епітелізації рани, відносно тварин з опіком (рис. 6.27).

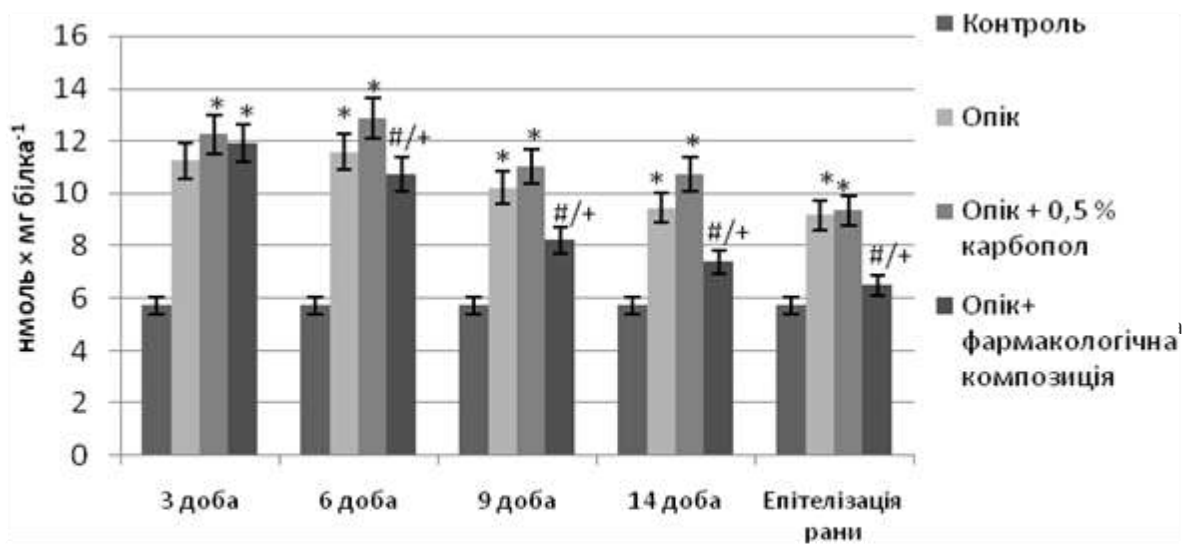


Рис.6.27. Вміст окисненого глутатіону у сироватці крові щурівзхімічним опіком шкіри ($M \pm m$; $n=7$): *- $p \leq 0,05$ порівняно з контрольними тваринами; +- $p < 0,05$ порівняно з групою тварин з раною; #- $p \leq 0,05$ порівняно з групою тварин, рани яких обробляли карбополом 0,5%

Встановлено, що за умов хімічного опіка шкіри у сироватці крові щурів вміст сульфгідрильних груп знижується: небілкових SH-груп – в 2,0 ($p < 0,05$), 1,8 ($p < 0,05$), 1,6 ($p < 0,05$), 1,5 ($p < 0,05$) та 1,5 раза ($p < 0,05$) відповідно порівняно з контрольною групою. При нанесенні на рану карбополу, не було показано статистично достовірних змін щодо групи тварин з опіками. При використанні фармакологічної композиції на основі меланіну, показано збільшення рівня небілкових SH-груп в 1,2 раза ($p < 0,05$) на 14 добу щодо щурів з ранами, на 3,6, 9 добу та в день епітелізації рани не встановлено статистично достовірних змін у вмісті небілкових SH-груп у порівнянні групи тварин з опіками (рис.6.28).

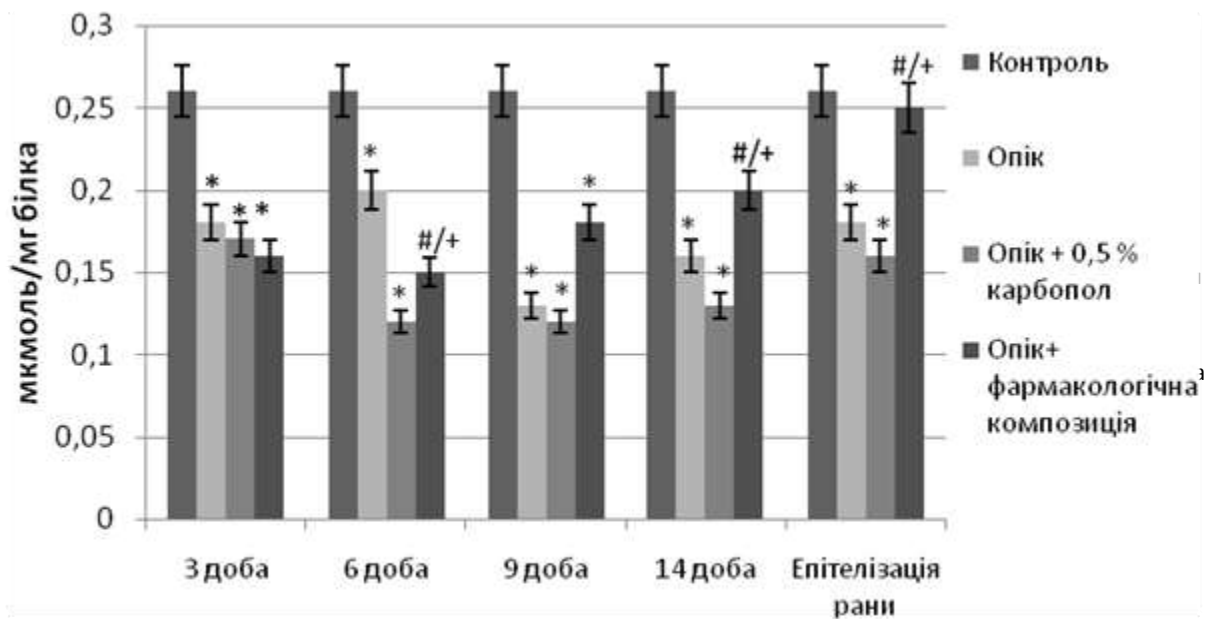


Рис 6.28. Вміст небілкових сульфгідрильних груп у сироватці крові щурів з хімічним опіком шкіри ($M \pm m$; $n=7$): * - $p \leq 0,05$ порівняно з контрольними тваринами; +/- $p < 0,05$ порівняно з групою тварин з раною; # - $p \leq 0,05$ порівняно з групою тварин, рани яких обробляли карбополом 0,5%

Також показано зниження вмісту білкових груп в 3,2 ($p < 0,05$), 4,2 ($p < 0,05$), 4,0 ($p < 0,05$), 3,2 ($p < 0,05$) та 1,7 рази ($p < 0,05$) відповідно порівняно з контрольною групою. При використанні фармакологічної композиції на основі меланіну, показано збільшення рівня білкових SH-груп в 1,3 рази ($p < 0,05$), 2,8 ($p < 0,05$), 2,4 ($p < 0,05$) та 1,4 ($p < 0,05$) рази на 3, 6, 9, 14 добу та в день епітелізації рани відповідно щодо щурів з опіками (рис.6.29).

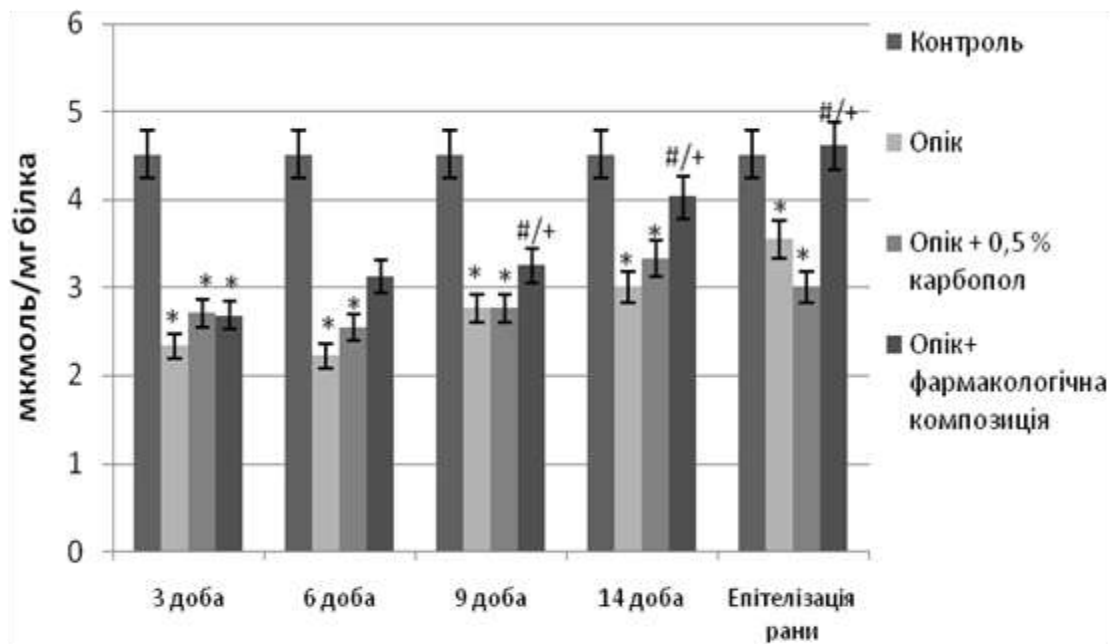


Рис 6.29. Вміст білкових сульфгідрильних груп у сироватці крові щурів з хімічним опіком шкіри ($M \pm m$; $n=7$): * - $p \leq 0,05$ порівняно з контрольними тваринами; + - $p < 0,05$ порівняно з групою тварин з раною; # - $p \leq 0,05$ порівняно з групою тварин, рани яких обробляли карбополом 0,5%

Вміст загальних SH-груп знижувався в групі щурів з ранами в 3,0 ($p < 0,05$), 3,3 ($p < 0,05$), 3,0 ($p < 0,05$), 2,6 ($p < 0,05$) та 1,7 раза ($p < 0,05$) відповідно порівняно з контрольною групою. При нанесенні на рану фармакологічної композиції на основі меланіну, показано збільшення рівня небілкових SH-груп в 1,5 ($p < 0,05$), 2,0 ($p < 0,05$), 2,0 ($p < 0,05$) та 1,3 ($p < 0,05$) раза на 6, 9, 14 добу ранового процесу та в день епітелізації рани відповідно щодо щурів з опіками (рис.6.30).

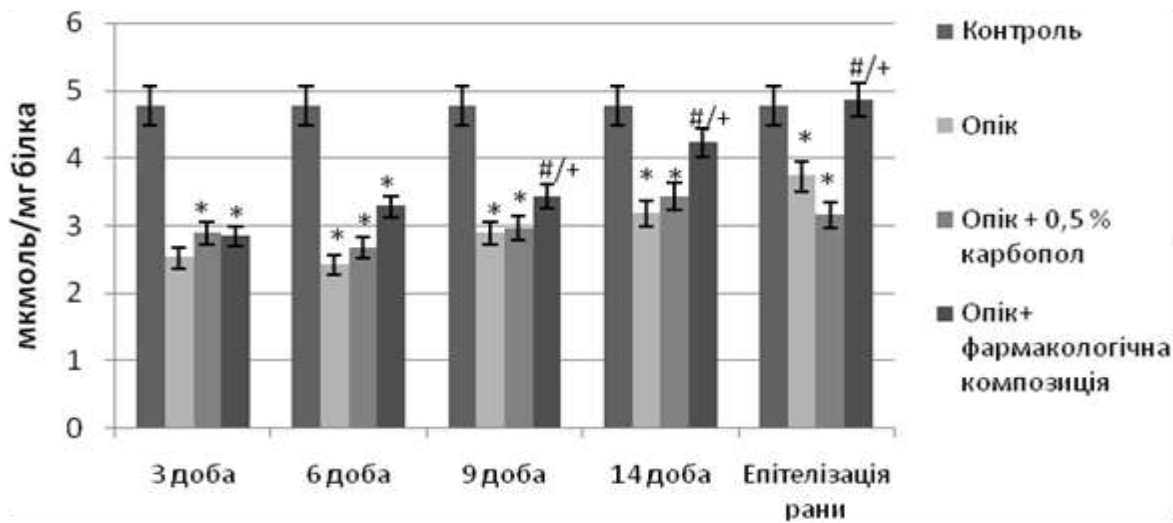


Рис 6.30. Вміст загальних сульфгідрильних груп у сироватці крові щурівзхімічним опіком шкіри ($M \pm m$; $n=7$): * $-p \leq 0,05$ порівняно з контрольними тваринами; + $- p < 0,05$ порівняно з групою тварин з раною; # $- p \leq 0,05$ порівняно з групою тварин, рани яких обробляли карбополом 0,5%

Підвищення в крові супероксиддисмутази, каталази, ГЛП, ГЛТв перші фази ранового процесу є адаптивною реакцією АОС організму на збільшення утворення АФК та посилення процесів вільнорадикального окиснення.

Актуальною проблемою сучасної медицини є лікування ранових процесів, які незалежно від етіології характеризуються наявним больовим синдромом, патогенною мікрофлорою, гнійним ексудатом, надлишковою гідратації і т.д. [199]. Рановий процес, як і будь-який патологічний стан, що супроводжується пошкодженням тканини, призводить до активації вільнорадикальних процесів [200]. Активація нейтрофілів і тканинних макрофагів сприяє накопиченню в області рани АФК, що, з одного боку, призводить до ураження клітинних мембран патогенними мікроорганізмами, а з іншого викликає розвиток ендотоксикозу. В рановій ділянці система АОЗ порушується, що може привести до пошкодження клітин, не тільки в зоні

ранового дефекту, але і вприлеглий тканині, що в свою чергу затримує перебіг ранового процесу [201].

В гомогенаті шкіри щурів з хімічним опіком, показано зниження активності СОД : на 3 добу – в 1,8 раза($p < 0,05$), на 6 добу – в 1,7 раза($p < 0,05$), на 9 добу – в 1,5 раза ($p < 0,05$), на 14 добу – у 1,4 раза($p < 0,05$) відносно показників контрольної групи тварин. Статистично достовірних змін не було встановлено у щурів рани яких обробляли карбополом щодо щурів з ранами. Проте за умов застосування фармакологічної композиції на основі меланіну, супероксиддисмутазна активність у сироватці крові щурів зростала порівняно тварин з ранами : на 3 добу –в 1,6 раза($p < 0,05$), на 6 добу – в 1,8 раза($p < 0,05$), на 9 добу – в 1,7 раза($p < 0,05$), на 14 добу – в 1,3 раза($p < 0,05$) та під час епітелізації рани – в 1,6 раза($p < 0,05$) (рис. 6.29).

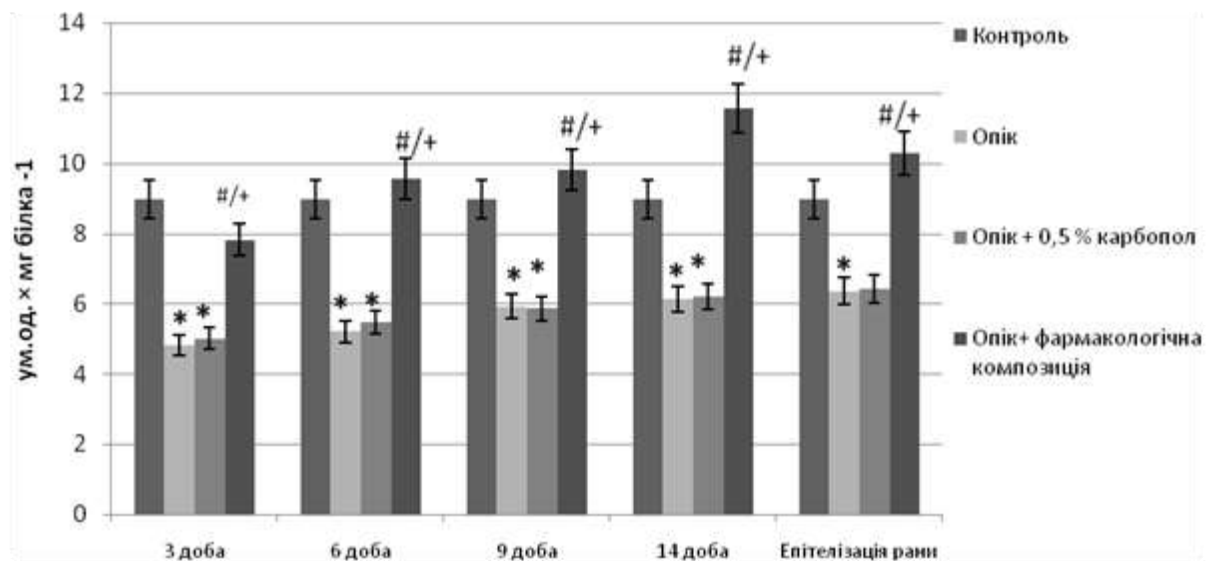


Рис. 6.31. Супероксиддисмутазна активність у гомогенаті шкіри щурів з хімічним опіком шкіри, ($M \pm m$; $n=7$): $*-p \leq 0,05$ порівняно з

контрольними тваринами; +- $p < 0,05$ порівняно з групою тварин з раною; #- $p \leq 0,05$ порівняно з групою тварин, рани яких обробляли карбополом 0,5%

Показано, що каталазна активність у гомогенаті шкіри щурів з опіками, підвищувалася на перших етапах ранового процесу: на 3 добу – в 1,2 раза ($p < 0,05$), на 6 добу – в 1,9 раза ($p < 0,05$), на 9 добу – в 1,6 раза ($p < 0,05$), на 14 добу – в 1,7 раза ($p < 0,05$) та в день епітелізації рани – в 1,4 раза ($p < 0,05$) відносно контрольної групи тварин. У групі тварин з карбополом, каталазна активність у сироватці крові щурів статистично достовірно не відрізнялась відносно тварин з ранами. У групі тварин, яким наносили фармакологічну композицію, каталазна активність у сироватці крові знижувалась на 6, 9, 14 добу ранового процесу та при епітелізації рани в 1,5 ($p < 0,05$), 1,8 ($p < 0,05$), 1,8 ($p < 0,05$) відповідно, однак зростала на 3 добу ранового процесу в 1,4 раза ($p < 0,05$) порівняно групи тварин з ранами (рис. 6.32).

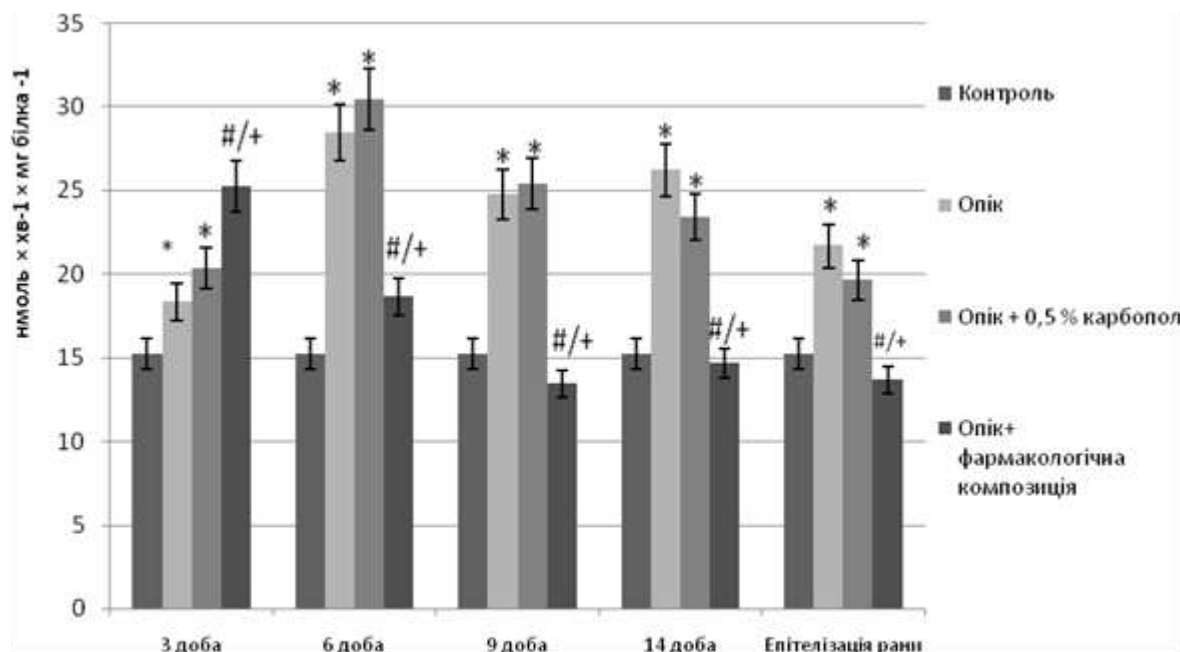


Рис. 6.32. Каталазна активність у гомогенаті шкіри щурів з хімічним опіком шкіри, ($M \pm m$; $n=7$): $*-p \leq 0,05$ порівняно з контрольними тваринами; $+ - p < 0,05$ порівняно з групою тварин з раною; $\#- p \leq 0,05$ порівняно з групою тварин, рани яких обробляли карбополом 0,5%

Показано зміни в активності ГП, а саме підвищення в дослідній групі з ранами на 3 добу в 1,6($p < 0,05$) та зниження в 2,7($p < 0,05$)раза на 9 добу, в порівнянні з контрольною групою тварин. В групі щурів яким наносили карбопол не виявлено статистично достовірних змін щодо щурів з ранами. В групі тварин, де рани обробляли фармакологічною композицією спостерігалось статистично достовірне зростання досліджуваного показника в 1,4($p < 0,05$), 1,4 раза ($p < 0,05$) та 1,2 раза ($p < 0,05$)на 9, 14 добу та в день повної епітелізації рани, в порівнянні з групою тварини з хімічним опіком (рис.6.33).

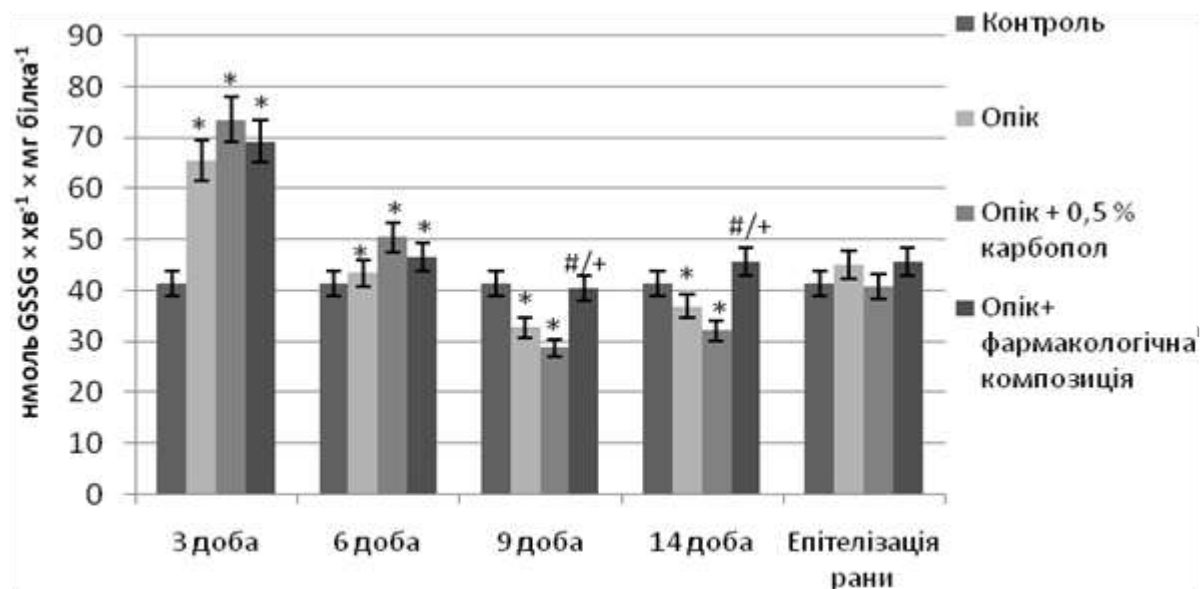


Рис 6.33. Глутатіонпероксидазна активність у гомогенаті шкіри щурів з хімічним опіком шкіри ($M \pm m$; $n=7$): $*-p \leq 0,05$ порівняно з контрольними

тваринами; +- $p < 0,05$ порівняно з групою тварин з раною; #- $p \leq 0,05$ порівняно з групою тварин, рани яких обробляли карбополом 0,5%

За умов моделювання хімічного опіку шкіри без його лікування спостерігалось підвищення ГТ в гомогенаті шкіри на 3, 6, 9, 14 добу та в день повної епітелізації рани в 1,4 ($p < 0,05$), 1,8 ($p < 0,05$), 1,4 ($p < 0,05$), 1,5 ($p < 0,05$), та 1,4 раза ($p < 0,05$) порівняно з контрольною групою тварин. Схожі зміни спостерігали в групі щурів рани яких обробляли карбополом, статистично достовірної різниці між групою щурів з ранами не було виявлено. В той же час показано зниження активності ГТ в групі тварин з фармакологічною композицією на 6,9, добу та в день повної епітелізації рани в 1,2 ($p < 0,05$), 1,3 ($p < 0,05$), та 1,2 раза ($p < 0,05$) відповідно, в порівнянні тварин з ранами (рис. 6.34).

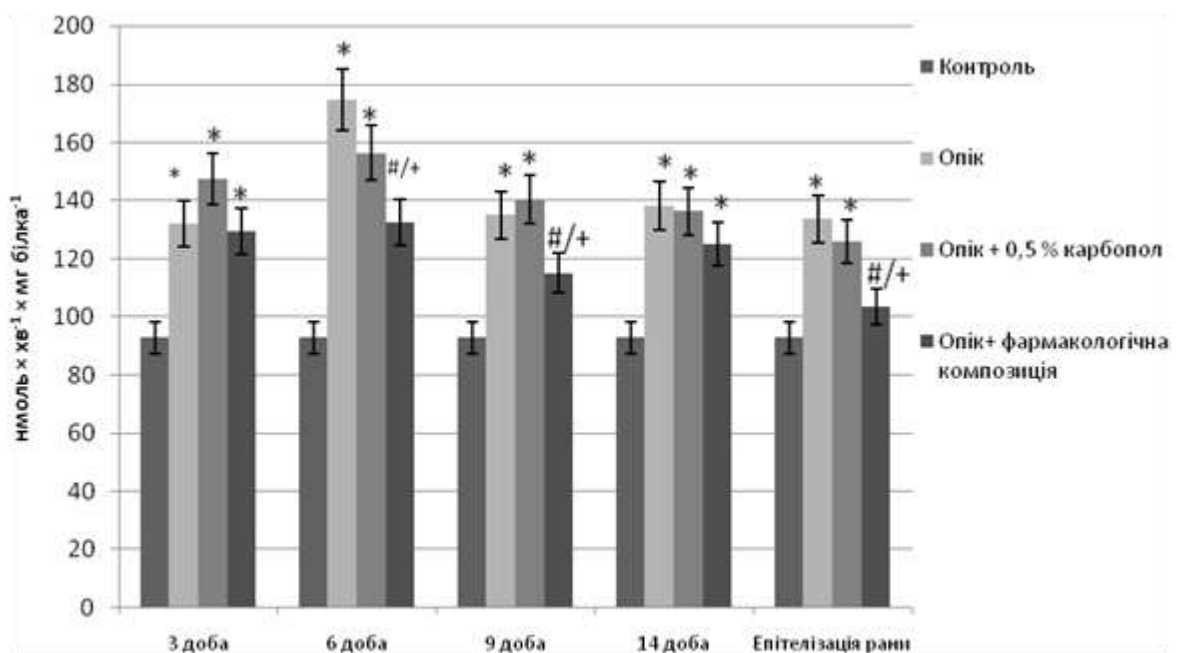


Рис. 6.34. Глутатіонтрансферазна активність у гомогенаті шкіри щурів з хімічним опіком шкіри ($M \pm m$; $n=7$): *- $p \leq 0,05$ порівняно з контрольними

тваринами; +- $p < 0,05$ порівняно з групою тварин з раною; #- $p \leq 0,05$ порівняно з групою тварин, рани яких обробляли карбополом 0,5%

При дослідженні ГР-ої активності показано її зниження на на 3, 6, 9, 14 доби у щурів з хімічним опіком шкіри в 1,7 ($p < 0,05$), 1,7 ($p < 0,05$), 1,8 ($p < 0,05$) разів порівняно з контрольною групою тварин. Подібні зміни спостерігались в групі щурів рани яких змащували карбополом, але не були статистично достовірними порівняно з групою тварин у яких моделювали хімічний опік шкіри. Щурам яким наносили досліджувану композицію на основі меланіну, даний показник підвищувався на 6 та 9 добу експерименту в 1,4 ($p < 0,05$) та 1,7 ($p < 0,05$) разів відповідно, в порівнянні тварин з хімічним опіком (рис.6.35).

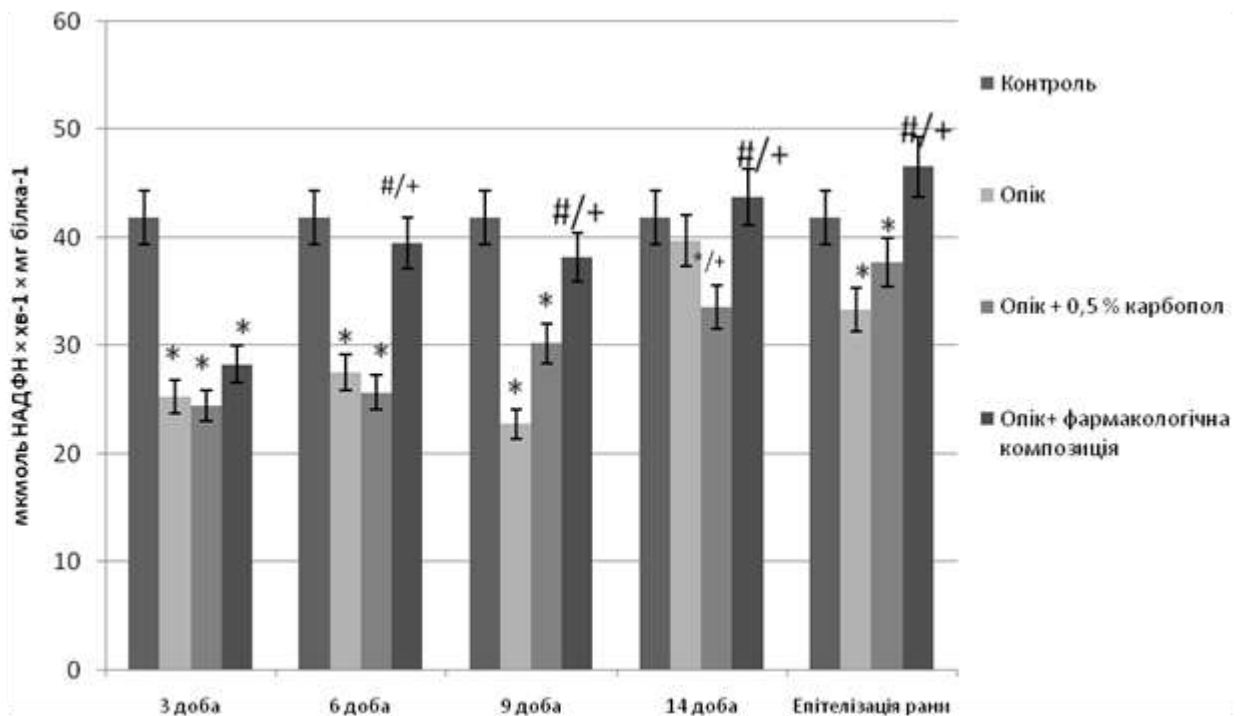


Рис. 6.35. Глутатіонредуктазнаактивність у гомогенаті шкіри щурів зхімічним опіком шкіри ($M \pm m$; $n=7$): $*$ - $p \leq 0,05$ порівняно з контрольними тваринами; $+/-$ $p < 0,05$ порівняно з групою тварин з раною; $\#$ - $p \leq 0,05$ порівняно з групою тварин, рани яких обробляли карбополом 0,5%

Вміст відновленого глутатіону знижувався після травмування шкіри в гомогенаті шкіри щурів в 2,6 ($p < 0,05$), 2,3 ($p < 0,05$), 2,0 ($p < 0,05$), 1,8 ($p < 0,05$) та 1,4 ($p < 0,05$)раза на 3, 6, 9, 14 добу та в день епітелізації рани відносно значень контрольних тварин. Однак вміст досліджуваного показника підвищувався в групі тварин, яким наносили фармакологічну композицію на 3, 6, 9, 14 добу та в день повної епітелізації рани в 1,2 ($p < 0,05$), 1,5 ($p < 0,05$), 1,4 ($p < 0,05$), 1,5 ($p < 0,05$)та 1,2 раза ($p < 0,05$) відповідно, порівняно з тваринами у яких моделювали опік шкіри. При дослідженні впливу карбополу вміст відновленого глутатіону не було виявлено статистично достовірних змінне від групи тварин з опіками (рис. 6.36).

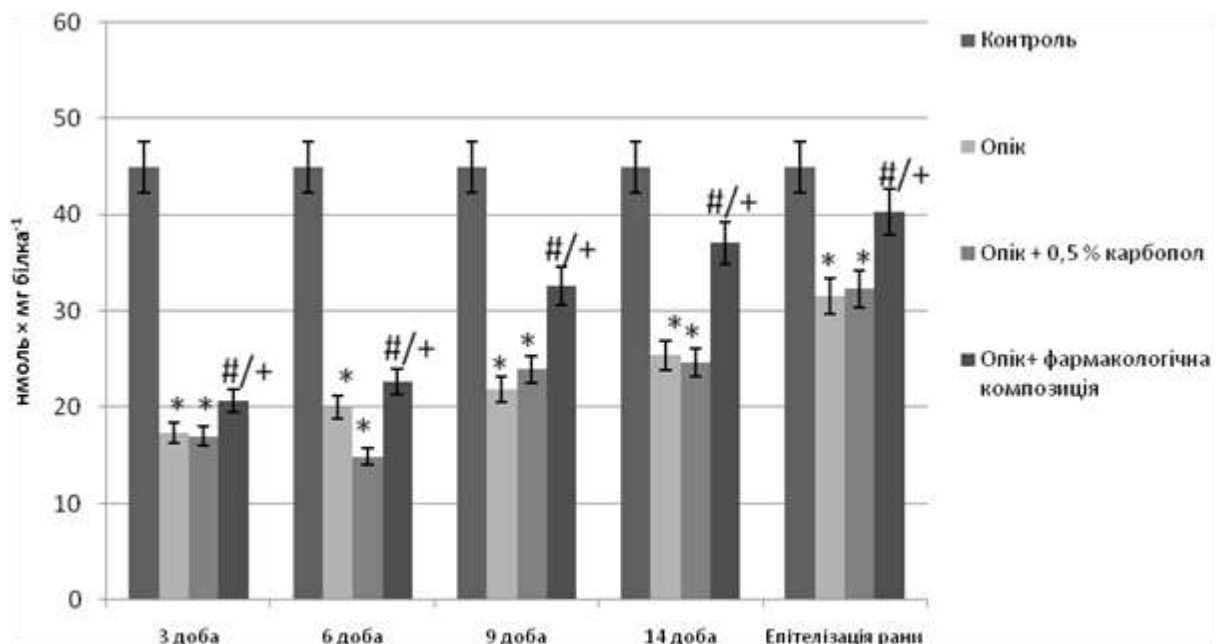


Рис. 6.36. Вміст відновленого глутатіону у гомогенаті шкіри щурівзхімічним опіком шкіри ($M \pm m$; $n=7$): * $-p \leq 0,05$ порівняно з контрольними тваринами; + $- p < 0,05$ порівняно з групою тварин з раною; # $- p \leq 0,05$ порівняно з групою тварин, рани яких обробляли карбополом 0,5%

Рівень окисненого глутатіону зростав в групі тварин з ранами на 3, 6, 9, 14 добу та в день повної епітелізації рани в 2,6 ($p < 0,05$), 3,1 ($p < 0,05$), 2,4 ($p < 0,05$), 1,9 ($p < 0,05$) та 1,5 рази ($p < 0,05$) відповідно, порівняно з контрольними тваринами. У групі тварин, яким наносили досліджувану композицію концентрація окисненого глутатіону знижувалась в 1,4 ($p < 0,05$), 1,5 ($p < 0,05$), 1,5 рази ($p < 0,05$) та 1,5 ($p < 0,05$) на 6, 9, 14 добу та в день повної епітелізації рани, відносно тварин з опіком (рис. 6.37).

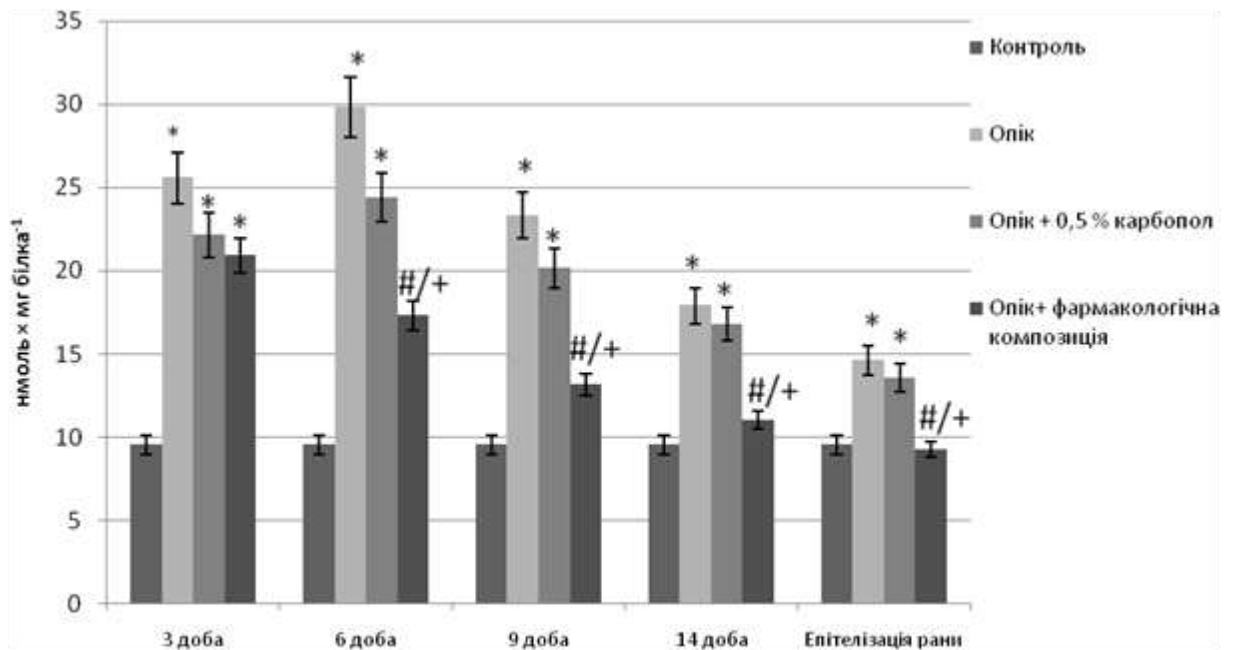


Рис. 6.37. Вміст окисненого глутатіону у гомогенаті шкіри щурів з хімічним опіком шкіри ($M \pm m$; $n=7$): * $-p \leq 0,05$ порівняно з контрольними тваринами; + $- p < 0,05$ порівняно з групою тварин з раною; # $- p \leq 0,05$ порівняно з групою тварин, рани яких обробляли карбополом 0,5%

Встановлено, що за умов вирізаної площинної рани у гомогенаті шкіри щурів вміст сульфгідрильних груп знижується: небілкових SH-груп – в 2,0 ($p < 0,05$), 1,8 ($p < 0,05$), 1,6 ($p < 0,05$), 1,5 ($p < 0,05$) та 1,5 рази ($p < 0,05$) відповідно порівняно з контрольною групою. При нанесенні на рану карбополу, не було показано статистично достовірних змін щодо групи тварин з опіками. При використанні фармакологічної композиції на основі меланіну, показано збільшення рівня небілкових SH-груп в 1,2 рази ($p < 0,05$) на 14 добу щодо щурів з ранами, на 3,6, 9 добу та в день епітелізації рани не встановлено статистично достовірних змін у вмісті небілкових SH-груп у порівнянні групи тварин з опіками (рис.6.38).

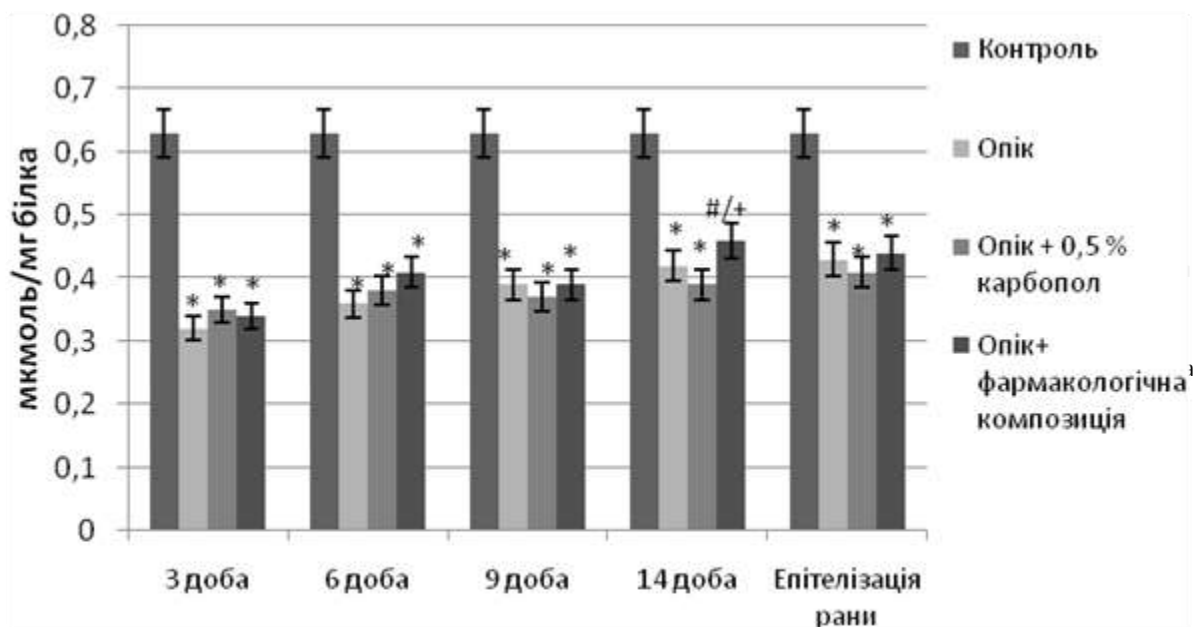


Рис. 6.38. Вміст небілкових сульфгідрильних груп у гомогенаті шкіри щурів з хімічним опіком шкіри ($M \pm m$; $n=7$): * $-p \leq 0,05$ порівняно з контрольними

тваринами; +- $p < 0,05$ порівняно з групою тварин з раною; #- $p \leq 0,05$ порівняно з групою тварин, рани яких обробляли карбополом 0,5%

Також показано зниження вмісту білкових груп в 3,2 ($p < 0,05$), 4,2 ($p < 0,05$), 4,0 ($p < 0,05$), 3,2 ($p < 0,05$) та 1,7 рази ($p < 0,05$) відповідно порівняно з контрольною групою. При використанні фармакологічної композиції на основі меланіну, показано збільшення рівня білкових SH-груп в 1,3 рази ($p < 0,05$), 2,8 ($p < 0,05$), 2,4 ($p < 0,05$) та 1,4 ($p < 0,05$) рази на 3, 6, 9, 14 добу та в день епітелізації рани відповідно щодо щурів з опіками (рис.6.39).

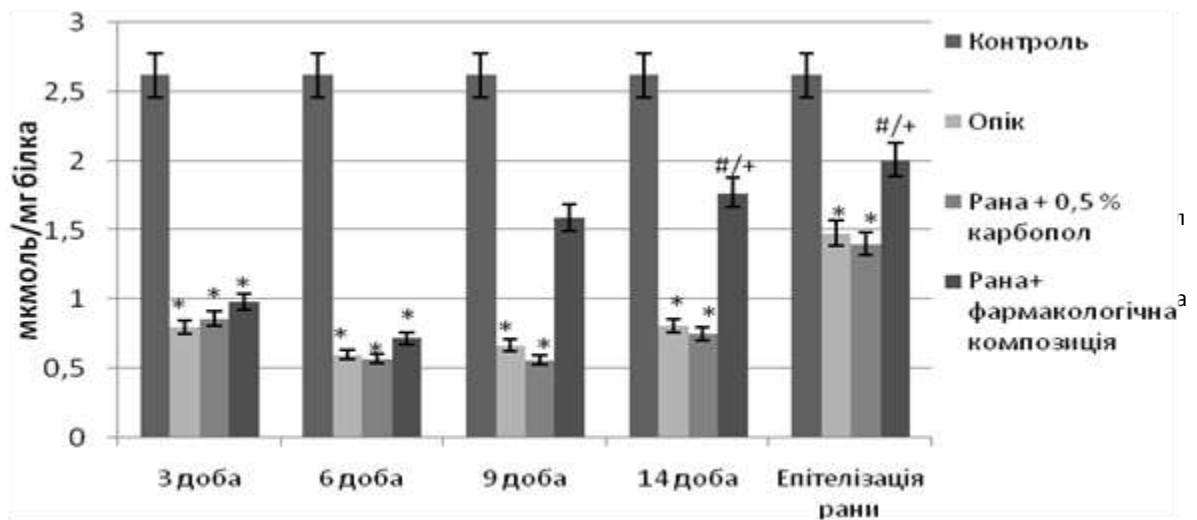


Рис 6.39. Вміст білкових сульфгідрильних груп у гомогенаті шкіри щурів з хімічним опіком шкіри ($M \pm m$; $n=7$): *- $p \leq 0,05$ порівняно з контрольними тваринами; +- $p < 0,05$ порівняно з групою тварин з раною; #- $p \leq 0,05$ порівняно з групою тварин, рани яких обробляли карбополом 0,5%

Вміст загальних SH-груп знижувався в групі щурів з ранами в 3,0 ($p < 0,05$), 3,3 ($p < 0,05$), 3,0 ($p < 0,05$), 2,6 ($p < 0,05$) та 1,7 рази ($p < 0,05$) відповідно порівняно з контрольною групою. При нанесенні на рану фармакологічної композиції на основі меланіну, показано збільшення рівня небілкових SH-груп в 1,5 ($p < 0,05$), 2,0 ($p < 0,05$), 2,0 ($p < 0,05$) та 1,3 ($p < 0,05$) рази на 6, 9, 14 добу

ранового процесу та в день епітелізації рани відповідно щодо щурів з опіками (рис.6.40).

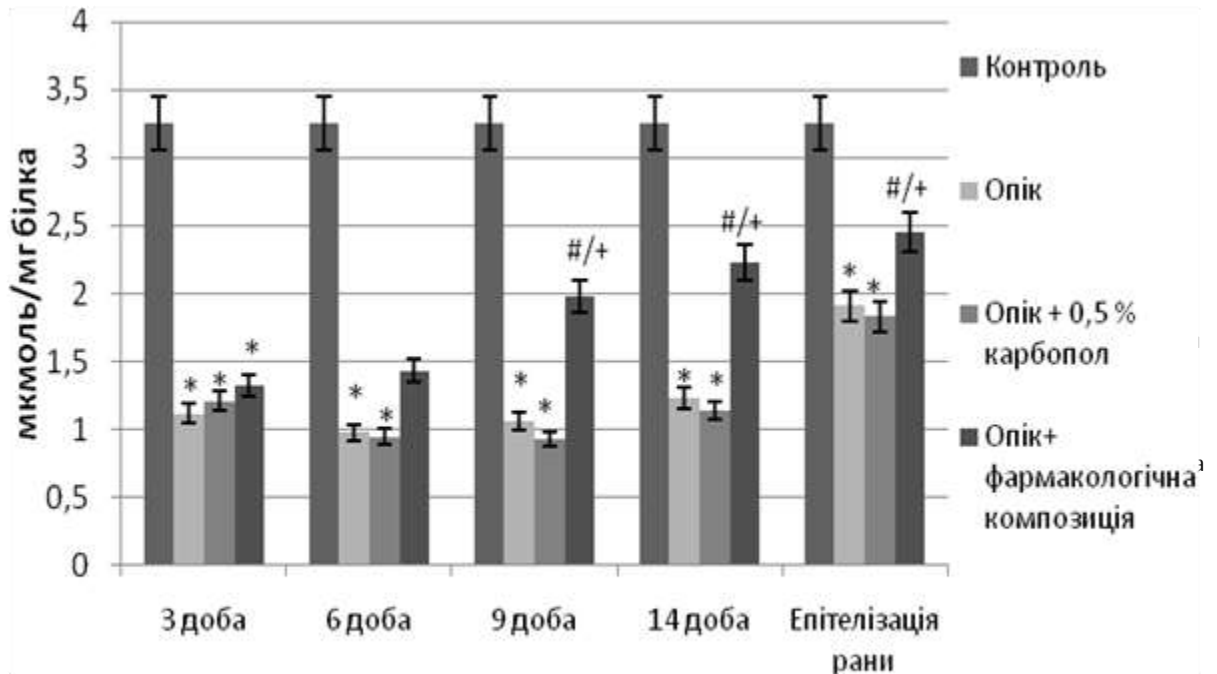


Рис.6.40. Вміст загальних сульфгідрильних груп у гомогенаті шкіри щурів з хімічним опіком шкіри ($M \pm m$; $n=7$): * - $p \leq 0,05$ порівняно з контрольними тваринами; + - $p < 0,05$ порівняно з групою тварин з раною; # - $p \leq 0,05$ порівняно з групою тварин, рани яких обробляли карбополом 0,5%

Як відомо, антиоксиданти прискорюють загоєння ран. Зниження рівнів ферментів антиоксидантного захисту спочатку спостерігалось при травмі шкіри, яке повільно відновлюється після повного загоєння. Механізм генерації вільних радикалів та процес їх усунення уповільнюється при затримці загоєння ран, тому припускають, що вільні радикали кисню є головним чинником у порушенні загоєння ран.

Отже, проведені дослідження свідчать про значну активацію вільнорадикальних процесів на початкових фазах хімічного опіку шкіри, які поступово знижуються під час загоєння рани, також відбувається інгібування

механізмів АОЗ, як результат виникає прооксидантно-оксидантний дисбаланс та розвивається окисний стрес.

РОЗДІЛ 7

ОЦІНКА РІВНІВ ЕКСПРЕСІЇ ГЕНІВ У ШКІРІ, ЗАЛУЧЕНИХ У РЕЕПІТЕЛІЗАЦІЮ

7.1. Експресія генів *Tgfb1*, *Ptgs2* в динаміці загоєння ран та при використанні фармакологічної композиції на основі меланіну

Відомо, що загоєння ран на шкірі дорослого починається з гострої запальної фази і закінчується утворенням шраму. На відміну від цього, в ембріонів на початку їх розвитку (перший і другий триместр) рани заживають майже ідеально: швидко без запалення й утворення рубців [202]. Також рановий процес різної етіології часто супроводжується ускладненнями рубцево-дистрофічного походження в зоні розташування рани — гіпертрофічні та келоїдні рубці, рубцеві обмеження (контрактури) рухів, рубцеві грижі та діастази на тлі атрофії м'язів, трофічні виразки та інколи пухлини [203].

Відмінності у цих двох зазначених типах ранозагоєння свідчать про наявність факторів, що сприяють генерації рубцевої тканини. У той же час, існує кореляція між факторами, експресія котрих була на відносно низькому рівні під час загоєння ембріональної ранової поверхні, та пригніченням дії цих факторів у ранах дорослих задля зменшення утворення рубців. Доведено, що одним із таких факторів є трансформуючий фактор росту β (TGF- β_1), який кодується геном *Tgfb1* [204, 205]. Цей цитокін спричинює множинні впливи на різні типи клітин, приймаючи участь у регуляції росту клітин, їх диференціації, апоптозі, імунної відповіді та ремоделюванні екстрацелюлярного матриксу, зокрема за рахунок SMAD шляху, CTGF (CCN2) медіатора, протеоглікана декоріна, зв'язуючого білка p311 тощо [206, 207]. Так, було показано, що при введенні TGF- β_1 в ембріональні тканини відбувалося утворення рубцевої

тканини; виявлено залучення *Tgfb1* до фіброзу [208, 209], так само як і пригнічення утворення шрамів при зниженні експресії та синтезу цього фактору.

Відомо, що головною умовою загоєння ран без рубців є відсутність запального процесу, при якому відбувається зниження протизапального інтерлейкіна - ІЛ-10 на тлі вивільнення прозапальних цитокінів, зокрема ІЛ-2, ІЛ-6, ІЛ-8, фактора некрозу пухлин α (TNF α) тощо, як і інших медіаторів запалення [210, 211].

Метаболіти і ферменти каскаду арахідонової кислоти, у тому числі фермент - циклооксигеназа-2, COX-2 (кодується геном - *Ptgs2*) і його продукт - простагландин E₂ (PGE₂), як відомо, є важливими медіаторами запальної реакції. Зокрема показано швидку зміну рівня експресії *Ptgs2* у відповідь на такий запальний стимул, як пошкодження шкіри внаслідок поранень та опіків [212, 213]. У той же час було показано затримку загоєння й утворення рубців при введенні COX-2 в ембріональні рани [214].

У результаті проведених нами експериментальних досліджень було показано, що рівень експресії гена *Tgfb1* в групі тварин із різними ранами був вищим у 5,2, 6,7, 5 і 3 рази ($p \leq 0,0001$) на 3, 6, 9 і 14 добу загоєння відповідно в порівнянні з контролем (рис. 7.1). Рівні експресії цього гена в другій та третій групі щурів достовірно не відрізнялися.

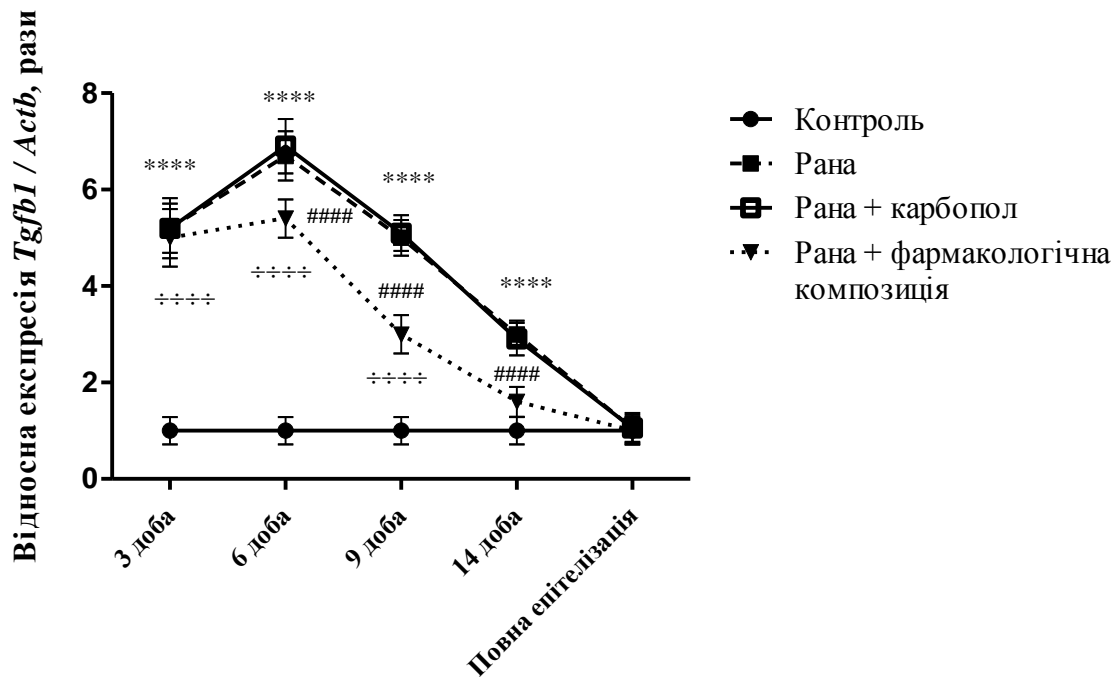


Рис. 7.1. Рівень експресії мРНК гена *Tgfb1* у динаміці загоєння різаних ран та при введенні меланіну. 1 – контроль; 2 – рана; 3 – рана + 0,5 % карбопол; 4 – рана + 0,1 % меланін, розчинений в 0,5 % карбополі; **** – $p \leq 0,0001$ рани відносно контролю; #### - $p \leq 0,0001$ рани з нанесеним меланіном відносно тварин із ранами; ÷÷÷÷ - $p \leq 0,0001$ рани з нанесеним меланіном порівняно з контролем.

Однак у щурів, яким на рани наносили меланін, цей показник був в 1,2, 1,7 і 1,9 рази ($p \leq 0,0001$) нижчим на 6, 9 і 14 добу відповідно, ніж у тварин із нелікованими ранами, та був менш підвищеним відносно контролю: у5, 5,4 і 3 рази($p \leq 0,0001$) на 3, 6 и 9 добу загоєння відповідно, і вже на 14 добу повертався до контролю. Рівень мРНК зазначеного гена був на рівні контрольних значень у другій, третій та четвертій групах тварин при повному закритті рани. Зокрема, нами було показано, що повне закриття рани на моделі повношарових вирізаних площин у тварин без лікування відбувалось на $23,2 \pm 1,0$ день, у той же час у щурів, рани котрих обробляли меланіном, раніше - на $21,0 \pm 0,5$ день [Taburets OV, 2016].

Нами було виявлено більші значення експресії гена *Tgfb1* при гнійно-некротичних ранах у порівнянні з повношаровими вирізаними ранами. Так, у групі тварин із ураженнями без лікування цей показник був вищим у 6,1, 7,2, 7 і 4 рази ($p \leq 0,0001$) на 3, 6, 9 і 14 добу загоєння відповідно в порівнянні з контролем (рис. 7.2.).

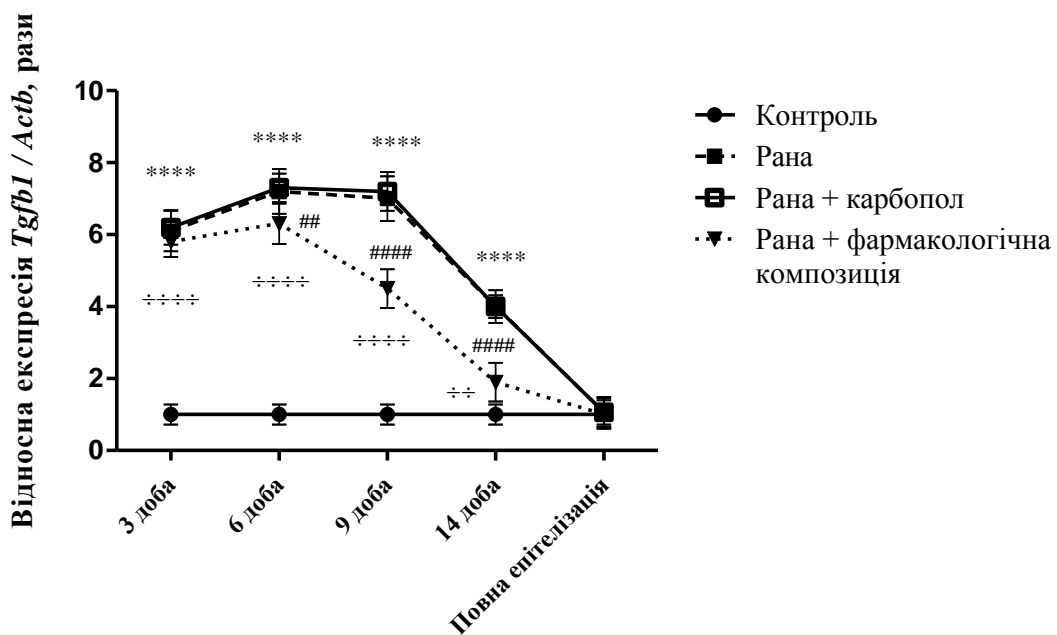


Рис. 7.2. Рівень експресії мРНК гена *Tgfb1* у динаміці загоєння гнійно-некротичних ран та при введенні меланіну. 1 – контроль; 2 – рана; 3 – рана + 0,5 % карбопол; 4 – рана + 0,1 % меланін, розчинений в 0,5 % карбополі; **** – $p \leq 0,0001$ рани відносно контролю; #####, ## – $p \leq 0,0001$, $\leq 0,01$ рани з нанесеним меланіном відносно тварин із ранами; ÷÷÷÷÷, ÷÷ – $p \leq 0,0001$, $\leq 0,01$ рани з нанесеним меланіном порівняно з контролем.

Рівні експресії цього гена у другій та третій групі щурів достовірно не відрізнялися. Проте у тварин, яким на рани наносили меланін, цей показник був в 1,1, ($p \leq 0,01$), 1,6 і 2,1 рази ($p \leq 0,0001$) нижчим на 6, 9 і 14

добу відповідно, ніж у тварин другої групи, та виявився менш підвищеним відносно контролю: у 5,8, 6,3, 4,5 ($p \leq 0,0001$) і 1,9 рази ($p \leq 0,01$) на 3, 6, 9 і 14 добу загоєння відповідно. Рівень мРНК зазначеного гена був на рівні контрольних значень у другій, третій та четвертій групах тварин при повному закритті рани. Зокрема, нами було показано, що повне закриття рани в групі щурів із гнійно-некротичними ранами без лікування відбувалось на $38,1 \pm 0,5$ день, у той же час у щурів, рани яких обробляли меланіном, - на $36,0 \pm 0,7$ день [Taburets OV, 2016].

У результаті подальших експериментальних досліджень було показано, що рівень експресії гена *Ptgs2* в групі тварин з різаними ранами був вищим у 3,7, 4,2, 3,5 і 2,2 рази ($p \leq 0,0001$) на 3, 6, 9 і 14 добу загоєння відповідно в порівнянні з контролем (рис. 5.4). Рівні експресії цього гена у другій та третій групі щурів достовірно не відрізнялися.

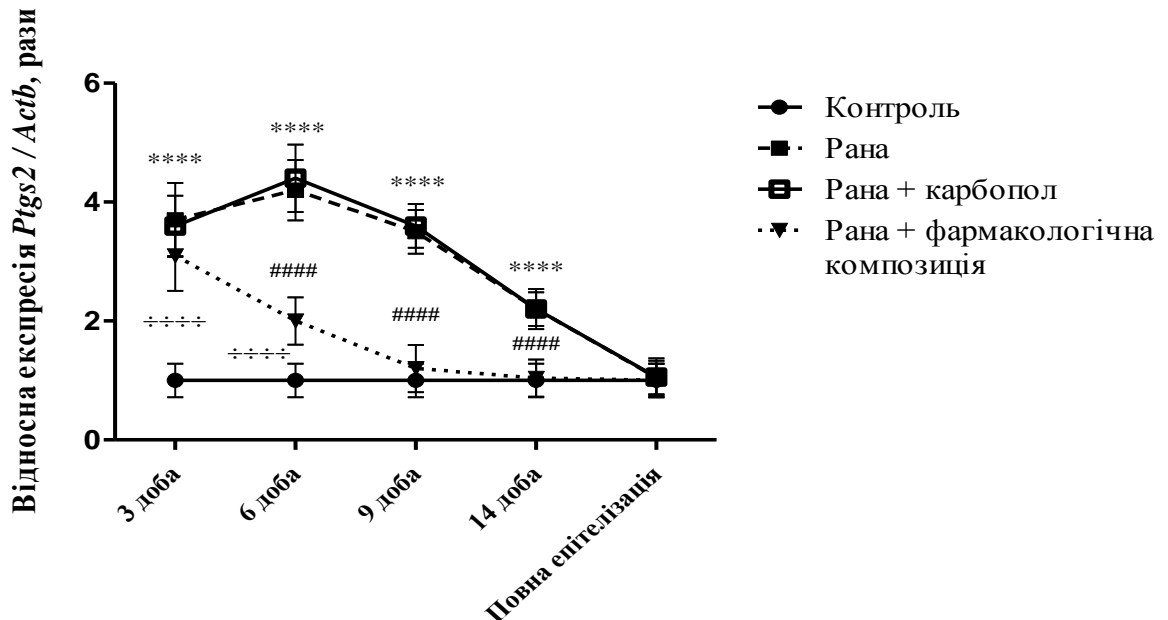


Рис. 7.3. Рівень експресії мРНК гена *Ptgs2* в динаміці загоєння різаних ран та при введенні меланіну. 1 – контроль; 2 – рана; 3 – рана + 0,5 % карбопол; 4 – рана + 0,1 % меланін, розчинений в 0,5 % карбополі; **** – $p \leq 0,0001$ рани відносно контролю; ##### - $p \leq 0,0001$ рани з нанесеним

меланіном відносно тварин із ранами; ÷÷÷÷ - $p \leq 0,0001$ рани з нанесеним меланіном порівняно з контролем.

У той же час, у щурів, яким на рани наносили меланін, цей показник був у 2,1, 2,9 і 2,1 раза ($p \leq 0,0001$) нижчим на 6, 9 і 14 добу відповідно, ніж у тварин з нелікованими ранами, та був менш підвищеним відносно контролю: у 3,1 і 2 раза ($p \leq 0,0001$) на 3 і 6 добу загоєння відповідно, і вже на 9 добу повертався до контролю. Рівень мРНК зазначеного гена був на рівні контрольних значень у другій, третій та четвертій групах тварин при повному закритті рани.

При гнійно-некротичних ранах нами було виявлено більші значення експресії гена *Ptgs2* (як і для *Tgfb1*) у порівнянні з повношаровими вирізаними ранами. Так, у групі тварин із ранами без лікування цей показник був вищим у 4, 4,5, 4,6 і 2,8 раза ($p \leq 0,0001$) на 3, 6, 9 і 14 добу загоєння відповідно у порівнянні з контролем (рис. 7.3.).

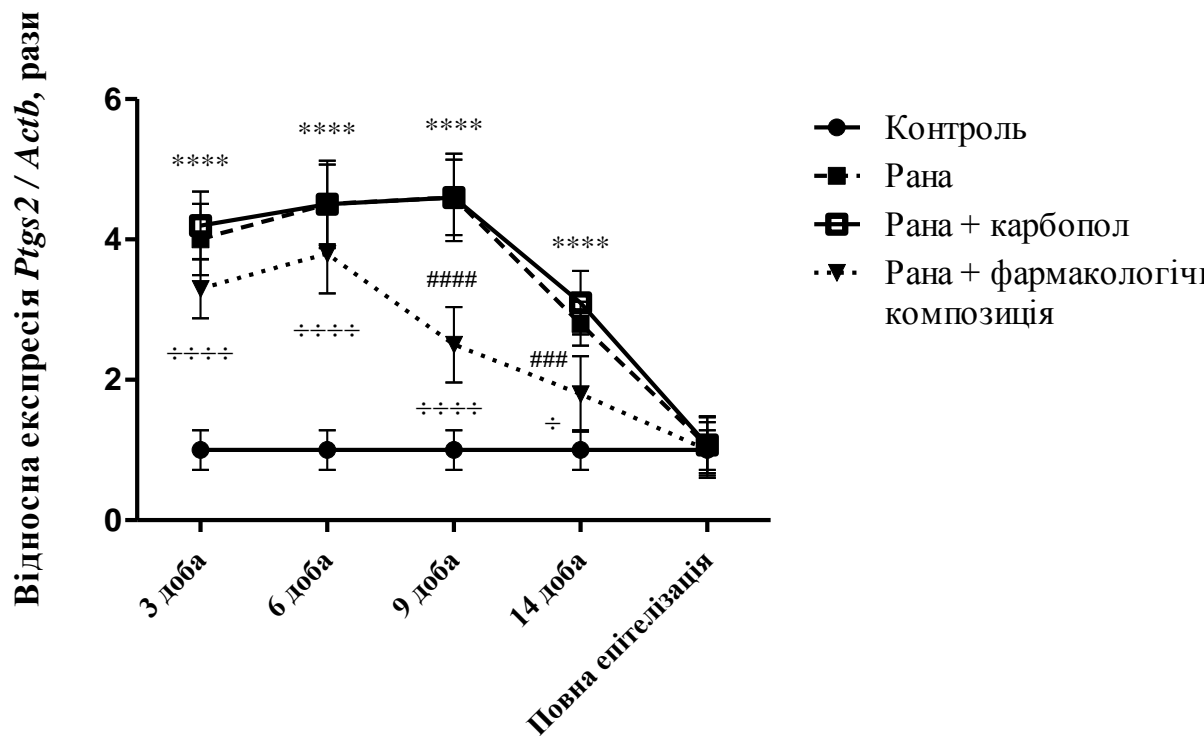


Рис. 7.4. Рівень експресії мРНК гена *Ptgs2* в динаміці загоєння гнійно-некротичних ран та при введенні меланіну. 1 – контроль; 2 – рана; 3 – рана + 0,5 % карбопол; 4 – рана + 0,1 % меланін, розчинений в 0,5 % карбополі; **** – $p \leq 0,0001$ рани відносно контролю; #####, ### – $p \leq 0,0001, \leq 0,001$ рани з нанесеним меланіном відносно тварин із ранами; ÷÷÷÷÷, ÷ – $p \leq 0,0001, \leq 0,05$ рани з нанесеним меланіном порівняно з контролем.

Рівні експресії зазначеного гена в другій та третій групі щурів достовірно не відрізнялися як і при попередній моделі пошкоджень шкіри. У тварин, яким на рани наносили меланін, цей показник був в 1,8, ($p \leq 0,0001$) і 1,6 рази ($p \leq 0,001$) нижчим на 9 і 14 добу відповідно, ніж у тварин другої групи, та виявився менш підвищеним відносно контролю: у 3,3, 3,8, 2,5 ($p \leq 0,0001$) і 1,8 рази ($p \leq 0,05$) на 3, 6, 9 і 14 добу загоєння відповідно. Рівень мРНК зазначеного гена був на рівні контрольних значень у другій,

третьої та четвертій групах тварин при повному закритті рани.

Так, встановлене у нашому дослідженні зростання рівня мРНК гена *Tgfb1* при різаних і гнійно-некротичних експериментальних ранах щурів свідчить як про запалення, так і, відповідно, про формування рубців, які було виявлено нами після загоєння нелікованих ран. Адже при повношарових площинних вирізаних ранах значно пошкоджуються потенційні джерела меланоцитів, у той час як при гнійно-некротичних ранах потужна запальна реакція призводить також до порушення пігментації та утворення рубців [215]. Окрім цього, зазначений ген при пораненнях стимулює не лише ангиогенез, проліферацію фібробластів, синтез колагену і ремоделювання нового позаклітинного матриксу, але і розвиток запального процесу [216]. Так, на тлі гіперекспресії *Tgfb1* було виявлено підвищення експресії та фосфорилування як рецептора TGF- β_1 – T β RI, так і рецептора Smads-2 і/чи 3, задіяного в SMAD шлях при розвитку гіпертрофічних рубців [217, 218].

Ми виявили відсутність грубого рубцювання при загоюванні як повношарових площинних вирізаних ран, так і гнійно-некротичних ранових поверхонь після опіків, викликаних розчином кальцієвої солі, за умов застосування меланіну. За умов лікування ран меланіном ми спостерігали зниження рівня експресії *Tgfb1*, що узгоджується з іншими роботами, в яких при інгібуванні *Tgfb1* спостерігалось зменшення запалення, і загоєння ран відбувалося також із меншим ступенем рубцювання [219, 220].

Окрім зростання рівня експресії *Tgfb1*, передбачається існування інших механізмів в основі патогенезу утворення рубців, зокрема гіпертрофічних: збільшення ангиогенезу, змінені рівні матричних металопротеїназ, інших факторів росту і як наслідок - надмірне запалення; так і уповільнений апоптоз фіброзних міофібробластів внаслідок, наприклад, генетичних змін p53 тощо [221].

Нами було виявлено зростання рівня мРНК гена *Ptgs2* як при різаних, так і гнійно-некротичних ранах щурів, що також свідчило про розвиток запального процесу, підтверджувалось виявленими нами рубцями в щурів без лікування та узгоджувалось з іншими дослідженнями [222]. Адже зазначений ген, як і його продукт, PGE₂, - рушійні медіатори запалення, що модулюють різноманітні процеси в шкірі: затримку загоєння, формування рубців тощо. Так, було показано, що при введенні в ембріональні тканини PGE₂ підсилював гостре запалення при ранозагоєнні за рахунок подальшого активування прозапальних клітин і стимулював утворення шрамів, збільшуючи проліферацію фібробластів і синтез колагену [223, 224]. Припускають, що активовані фібробласти модулюють підвищення експресії *Ptgs2*, а PGE₂, у свою чергу, за допомогою EP₁ рецептора тощо чинить мітогенну дію на фібробласти, стимулює їх міграцію і / або проліферацію, синтез колагену, призводячи до утворення шрамів на шкірі [225]. У той же час активування експресії *Ptgs2*, можливо, може призвести до підсилення профібріотичного TGF-β₁ – сигнального шляху [225].

За умов лікування ран меланіном ми також спостерігали зниження рівня експресії *Ptgs2* (як і для *Tgfb1*), що узгоджується з іншими роботами, в яких при зниженні експресії *Ptgs2* спостерігалось зменшення запалення, і загоєння ран відбувалося також із меншим ступенем рубцювання [226].

На сьогоднішній день, як і раніше, не знайдено специфічного лікування як для запобігання, так і зменшення будь-яких форм рубцювання. Численні клінічні дослідження, сучасні методи лікування й запропоновані профілактичні процедури в більшості не стандартизовані й вимагають подальшого аналізу, і, у першу чергу, розуміння механізмів, що лежать в основі утворення гіпертрофічних рубців, задля подальшого пошуку терапевтичних агентів [220].

У ряді досліджень було запропоновано використання антитіл проти

TGF- β задля гальмування фіброзу і запобігання утворення звичайних шрамів після загоєння, так і гіпертрофічних рубців [221]. Однак при цьому спостерігали утворення хронічних або не загоєних ран [228]. Використання різноманітних природніх інгібіторів TGF- β : декоріна, біглікана тощо блокувало фіброз, проте не впливало на потужну TGF- β – опосередковану імунну реакцію [230]. Тому надалі триває пошук агентів для інгібування як TGF- β_1 , так і COX-2 – опосередкованих запальних шляхів задля зменшення запального процесу і формування рубців [231, 232].

Встановлені нами зміни експресії генів *Tgfb1* і *Ptgs2* при загоюванні повношарових площинних вирізаних ран та гнійно-некротичних ран свідчать про розвиток патологічних процесів, зокрема запалення, що підтверджується утворенням рубців у порівнянні з тваринами, рани котрих обробляли меланіном. Таким чином, можна зробити припущення про вплив меланіну на зменшення експресії зазначених генів, і відповідно, синтез простагландину E_2 та TGF- β_1 , що є необхідними передумовами для швидкого загоювання ран без виражених рубців [233, 234].

Іншими авторами було виявлено протилежну дію меланіну в культурі клітин: при сприянні різних факторів меланоцити стимулювали проліферацію фібробластів, посилювали синтез колагену й позаклітинного матриксу і навпаки - активували TGF- β_1 сигнальний шляху, і відповідно, сприяли розвитку патологічного рубцювання [235, 236]. Але в нашому дослідженні вперше було показано не лише нижчі рівні експресії *Tgfb1* і *Ptgs2* у динаміці ранозагоєння, але й відсутність рубців саме при використанні меланіну, що узгоджується з його доведеною цитопротекторною дією на слизову оболонку шлунка тощо [218, 219].

Щодо можливих механізмів впливу меланіну як поліфенольної сполуки на експресію проаналізованих генів під час загоєння ушкоджень шкіри різної етіології, перш за все, слід зазначити його виражену цитопротекторну дію: він знижує активність процесів перекисного

окиснення ліпідів, збільшує активність ферментів антиоксидантної системи, запобігаючи пошкодженню ДНК; впливає на продукцію цитокинів: TNF- α , IL-6, VEGF тощо за рахунок, наприклад, впливу на експресію ядерних рецепторів PPAR [231]; посилює експресію eNOS та виділення протизапальних цитокинів задля зниження інтенсивності запалення й утворення рубців при ранозагоєнні [244, 245]. Більш детальне з'ясування специфічних молекулярних механізмів впливу меланіну на процес ранозагоєння на різних ранових моделях потребує подальших досліджень.

7.2. Експресія генів *Tlr2* та *Tjp1* в динаміці загоєння ран та при використанні фармакологічної композиції на основі меланіну

Toll-подібні рецептори (англ. Toll-liked receptors) — клас клітинних рецепторів з одним трансмембранним доменом, які відіграють одну із ключових ролей у природженому імунітеті: вони розпізнають консервативні структури мікроорганізмів, активують проти них клітинну гілку імунітету та, як нещодавно було показано, регулюють бар'єрну функцію шкіри [233,234]. Ген *Tlr2* (кодує Toll-подібний рецептор 2) експресується в ентероцитах, колоноцитах, клітинах неспецифічного імунітету (макрофаги, мастоцити тощо), кератиноцитах, сальних залозах тощо. Продукт цього гена - TLR2 відіграє ключову роль у розпізнаванні компонентів клітинної стінки грам-позитивних бактерій (наприклад, (*Staphilococcus aureus*)) та підтриманні толерантності до власної мікрофлори [235]. Показано підвищення експресії TLR2 внаслідок дисбіотичних змін за умов розвитку ентеропатій тощо та зниження рівня експресії й функції TLR2 на моноцитах і макрофагах при atopічному дерматиті, як у людини, так і в тварин [236, 238]. Також було виявлено, що

TLR2 сигналізація підвищувала цілісність щільних контактів у мишей і на моделі пошкоджено шкіри людини, що було частково опосередковано посиленою експресією генів ключових білків щільних. Щільні контакти (англ. Tight junctions) - замикаючі міжклітинні контакти, властиві клітинам хребетних тварин, у складі яких мембрани сусідніх клітин максимально зближені і «зшиті» спеціалізованими білками клаудинами та оклюдинами. Поширені в епітеліальних тканинах, де складають найбільш апікальну частину (лат. Zonula occludens). Щільні контакти забезпечують різноманітні функції: контроль за переміщенням іонів, води і молекул через міжклітинні контакти для забезпечення фізичного ущільнення епітелію та клітинної полярності, регулювання сигнальної трансдукції, транскрипції, клітинної проліферації й диференціації тощо [239, 240]. Білок цитоплазматичної пластинки - ZO-1 (Zonula occludens-1, кодується геном *Tjp1*) разом із своїм партнером - оклюдином формує один із відповідних комплексів білок-асоційованих щільних контактів (ZO). Якщо ці білки щільних контактів руйнуються під впливом патогенів, фізичних пошкоджень або за рахунок нестачі кальцію, відбувається порушення бар'єрної функції шкіри, що, у свою чергу, може привести до розвитку ряду патологій шкіри [240].

Нами було виявлено, що рівень експресії гена *Tlr2* в групі тварин із різаними ранами був вищим у 3,8, 4,1, 3,5 і 2,3 рази ($p \leq 0,0001$) на 3, 6, 9 і 14 добу загоєння відповідно в порівнянні з контролем (рис. 7.2). Рівні експресії цього гена в другій та третій групі щурів достовірно не відрізнялися.

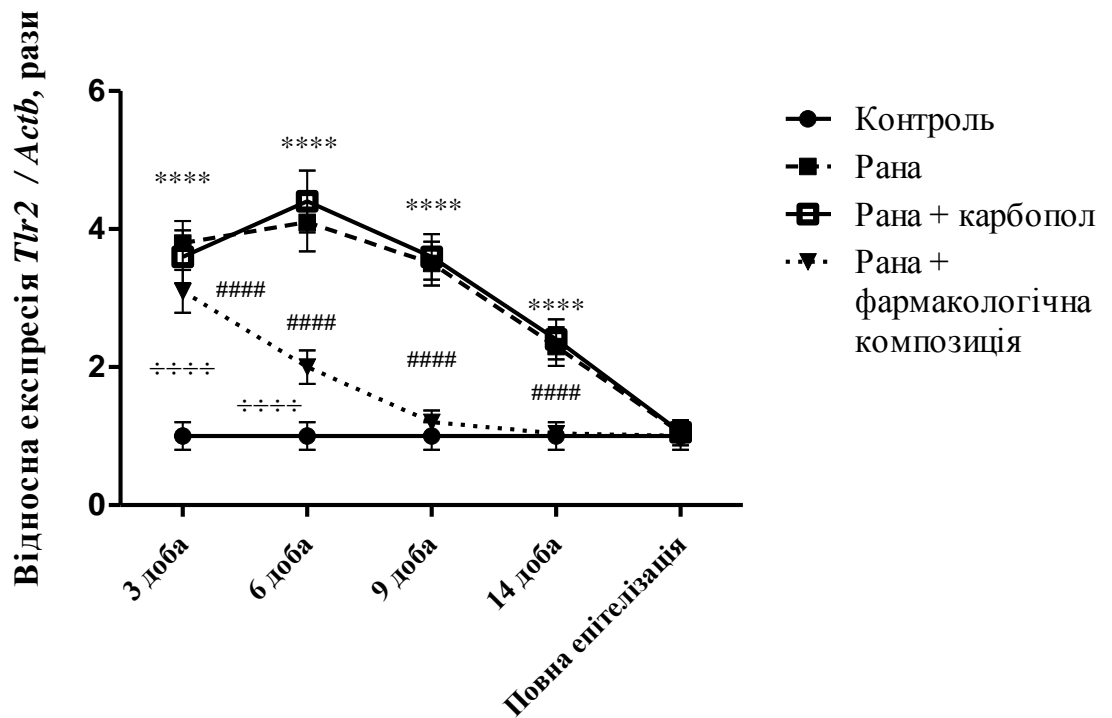


Рис. 7.5. Рівень експресії мРНК гена *Tlr2* у динаміці загоєння різаних ран та при введенні меланіну. 1 – контроль; 2 – рана; 3 – рана + карбопол; 4 – рана + фармакологічна композиція; **** – $p \leq 0,0001$ рани відносно контролю; #### – $p \leq 0,0001$ рани з нанесеною фармакологічною композицією відносно тварин із ранами; ÷÷÷÷ – $p \leq 0,0001$ рани з нанесеною фармакологічною композицією порівняно з контролем.

У той же час, у щурів, яким на рани наносили фармакологічну композицію, цей показник був в 1,2 ($p \leq 0,05$), 2,1, 2,9 і 2,2 раза ($p \leq 0,0001$) нижчим на 3, 6, 9 і 14 добу відповідно, ніж у тварин з нелікованими ранами, та був менш підвищеним відносно контролю: у 3,1 і 2 раза ($p \leq 0,0001$) на 3 і 6 добу загоєння відповідно, і вже на 9 добу повертався до контрольних значень. Рівень мРНК зазначеного гена був на рівні контролю у другій, третій та четвертій групах тварин при повному закритті рани.

Нами було виявлено більші значення експресії гена *Tlr2* при гнійно-

некротичних ранах у порівняння з повношаровими вирізаними ранами. Так, у групі тварин з ураженнями без лікування цей показник був вищим у 6, 7,3, 6,8 і 4 рази ($p \leq 0,0001$) на 3, 6, 9 і 14 добу загоєння відповідно в порівнянні з контролем (рис. 7.3).

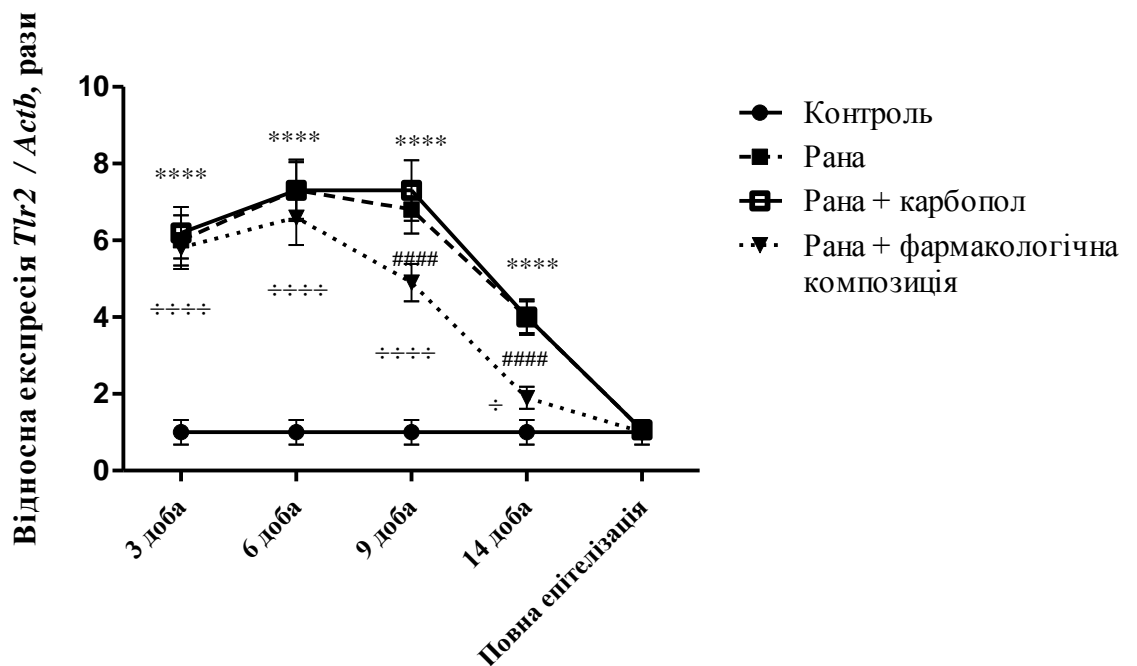


Рис. 7.6. Рівень експресії мРНК гена *Tlr2* у динаміці загоєння гнійно-некротичних ран та приведенні меланіну. 1 – контроль; 2 – рана; 3 – рана + карбопол; 4 – рана + фармакологічна композиція; **** – $p \leq 0,0001$ рани відносно контролю; ##### – $p \leq 0,0001$ рани з нанесеною фармакологічною композицією відносно тварин із ранами; ÷÷÷÷ – $p \leq 0,0001$, ÷ $p \leq 0,05$ рани з нанесеною фармакологічною композицією порівняно з контролем.

Рівні експресії цього гена у другій та третій групі щурів достовірно не відрізнялися. Проте у тварин, яким на рани наносили фармакологічну

композицію, цей показник був в 1,4 і 2,1 раза ($p \leq 0,0001$) нижчим на 9 і 14 добу відповідно, ніж у тварин другої групи, та виявився менш підвищеним відносно контролю: в 1,9 раза ($p \leq 0,05$) на 14 добу загоєння. Рівень мРНК зазначеного гена був на рівні контрольних значень у другій, третій та четвертій групах тварин при повному закритті рани.

У результаті подальших експериментальних досліджень було показано, що рівень експресії гена *Tjp1* в групі тварин з різаними ранами був нижчим у 5, 4,4, 3,7 і 3 раза ($p \leq 0,0001$) на 3, 6, 9 і 14 добу загоєння відповідно в порівнянні з контролем (рис. 7.4). Рівні експресії цього гена у другій та третій групі щурів достовірно не відрізнялися.

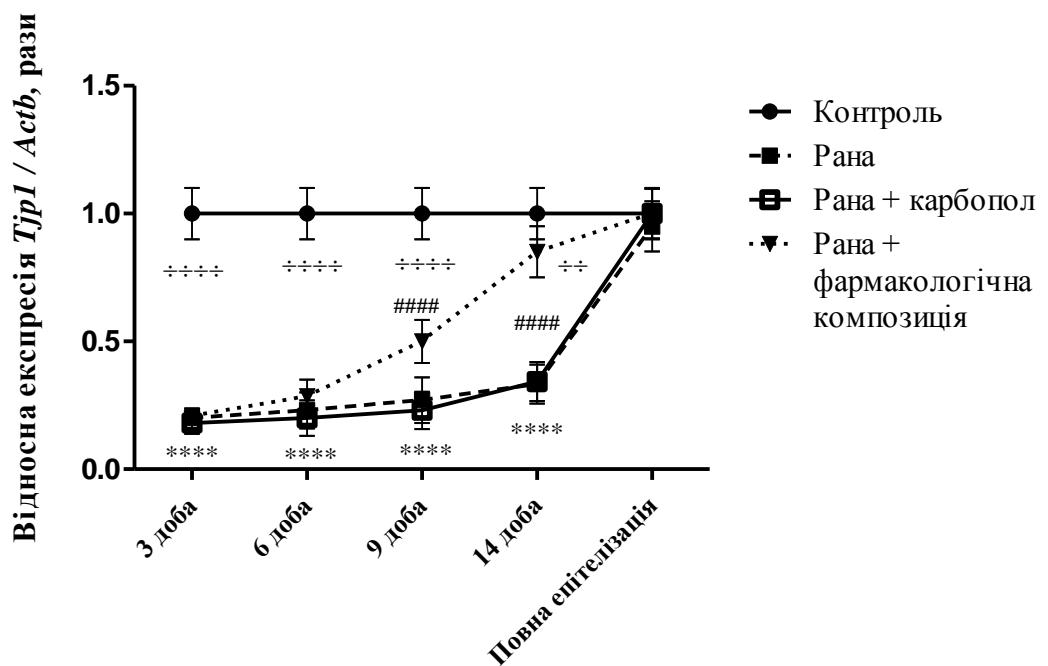


Рис. 7.7. Рівень експресії мРНК гена *Tjp1* у динаміці загоєння різаних ран та при введенні меланіну. 1 – контроль; 2 – рана; 3 – рана + карбопол; 4 – рана + фармакологічна композиція; **** – $p \leq 0,0001$ рани відносно контролю; ##### - $p \leq 0,0001$ рани з нанесеною фармакологічною композицією відносно тварин із ранами; ÷÷÷÷ - $p \leq 0,0001$, ÷÷ $p \leq 0,01$ рани з нанесеною фармакологічною композицією порівняно з контролем.

Однак у щурів, яким на рани наносили фармакологічну композицію, цей показник був в 1,9 ($p \leq 0,0001$) і 2,6 раза ($p \leq 0,0001$) вищим на 9 і 14 добу відповідно, ніж у тварин із нелікованими ранами, та менше знижувався відносно контролю: у 4,8, 3,5, 2 ($p \leq 0,0001$) і 1,2 раза ($p \leq 0,01$) на 3, 6, 9 і 14 добу загоєння відповідно. Рівень мРНК зазначеного гена був на рівні контролю у другій, третій та четвертій групах тварин при повній епітелізації рани.

При гнійно-некротичних ранах рівень експресії гена *Tjp1* був у 5,2, 3,8, 3,2 і 2,4 раза ($p \leq 0,0001$) нижчим на 3, 6, 9 і 14 добу загоєння відповідно у порівнянні з контролем (рис. 7.5).

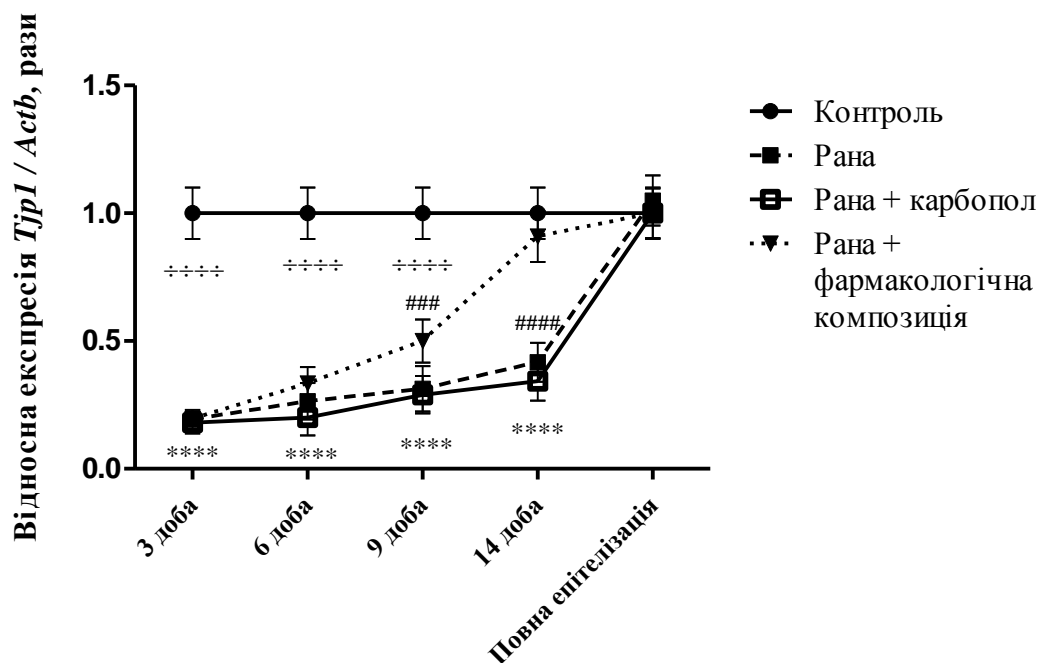


Рис. 7.8. Рівень експресії мРНК гена *Tjp1* у динаміці загоєння гнійно-некротичних ран та при введенні меланіну. 1 – контроль; 2 – рана; 3 – рана + карбопол; 4 – рана + фармакологічна композиція; **** – $p \leq 0,0001$ рани відносно контролю; ##### - $p \leq 0,0001$, ### - $p \leq 0,001$ рани з нанесеною фармакологічною композицією відносно тварин із ранами; ÷÷÷÷ - $p \leq$

0,0001рани з нанесеною фармакологічною композицієюпорівняно з контролем.

Рівні експресії зазначеного гена в другій та третій групі щурів достовірно не відрізнялися як і при попередній моделі пошкоджень шкіри. У тварин, якимна рани наносили фармакологічну композицію, цей показник був в 1,6, ($p \leq 0,001$) і 2,2 раза ($p \leq 0,0001$) вищим на 9 і 14 добу відповідно, ніж у тварин другої групи, та виявився менш зниженим відносно контролю: у 5,1, 3 і 2 раза ($p \leq 0,0001$) на 3, 6 і 9 добу загоєння відповідно, і на 14 добу повертався до контрольних значень. Рівень мРНК *Tjp1* був на рівні контрольних значень у другій, третій та четвертій групах тварин при повному закритті рани.

Епідермальні щільні контакти, які складаються з трансмембранних білків, – це динамічні структури, що зменшують чи збільшують щільність у відповідь як на ендогенні сигнали з епітеліальних і субепітеліальних компартментів, так і на дію екзогенних агентів: бактерій та алергенів. Зміни в експресії будь-якого гена, що кодує білок щільних контактів, мають значний вплив на цілісність щільних контактів в цілому [254, 257]. Так, нами було виявлено зниження рівня мРНК гена *Tjp1*, що кодує білок цитоплазматичної пластинкиZO-1, як при різаних, так і гнійно-некротичних ранах щурів.Зокрема на 3 добу раневого процесу вище зазначене зменшення експресії було більшим для гнійно-некротичних уражень, однак у подальшому: на 6 – 14 добу гнійно-некротичні рани мали більший рівень експресії *Tjp1*, ніж різані рани. Подібні результати було отримано в пацієнтів з atopічним дерматитом, на тваринних моделях повношарових вирізаних площинних ран і в культурі неонатальних первинних кератиноцитів людини [254]. Так було виявлено, що відновлення щільних контактів у кератиноцитах було індуковано впливом рецептора вродженого імунітету TLR2. Так, миші, нокаутні за геном *Tlr2*

(Tlr2^{-/-}), при експериментальних моделях поранень мали уповільнене й неповне відновлення бар'єрної функції шкіри. При цьому, на механічній епідермальній моделі поранень у людини (зняття верхнього шару шкіри на липку стрічку (англ. tape-stripping)) було показано, що деякі білки теплового шоку та гіалуронова кислота були лігандами рецептора TLR2 [255]. Також експресія Tlr2 була активована синантропними бактеріями мишей. І під дією агоністів TLR2 відбулось відновлення синтезу білків щільних контактів [Куо І-Н, 2013]. Нами було виявлено підвищення рівня мРНК гена Tlr2 як при різаних, так і гнійно-некротичних ранах щурів, зокрема більшою мірою при моделі гнійно-некротичних уражень шкіри.

TLR давня та еволюційно консервативна родина рецепторів, які відіграють критичну роль у вродженому імунітеті та запальних процесах [256]. TLR розпізнають консервативні патоген-асоційовані молекулярні патерни (PAMPs), які властиві великій групі мікроорганізмів, і відіграють роль у індукції вродженої та набутої імунної відповіді [257]. На сьогодні вже встановлений зв'язок між TLR і PPAR γ -шляхами. Взаємодія ліпополісахаридів клітинних оболонок бактерій із TLR-рецепторами спричинює активацію внутрішньоклітинного сигнального каскаду, опосередкованого ядерними рецепторами PPAR γ , протизапальна роль яких показана численними дослідженнями [258].

Отже, на основі отриманих результатів і літературних даних ми можемо припустити, що підвищена експресія Tlr2 в сусідніх клітинах епідермісу (у клітинному шарі нижче щільних контактів) при руйнуванні шкірного бар'єру є необхідною для виконання наступних функцій. По-перше, це швидке реагування на патогенні мікроорганізми, що проліферують у місці дефекту рани. Друга функція полягає в сприянні ранньому формуванню щільних контактів у кератиноцитах, які утворюють моношар над дермальною основою рани. Раннє утворення таких щільних контактів запобігає подальшому витоку сироватки і тим самим обмежує

кількість поживних речовин і молекул адгезії, які сприятимуть надмірному росту мікроорганізмів. І, крім того, це також зведе до мінімуму втрату води, попереджаючи зневоднення рани [259]. У свою чергу, синтез відповідних щільних контактів також буде необхідним для пригнічення TLR2 – опосередкованого запалення, котре може бути шкідливим на пізніх стадіях загоєння ран. Потрібні подальші дослідження для виявлення механізмів, за допомогою яких TLR2 сприяє відновленню бар'єрної функції щільних контактів. Запропоновано, що інтерлейкін 1 та ФНП- α можуть бути важливими медіаторами при TLR2-опосередкованій репарації шкірного бар'єру. Тоді як деякі мікроРНК навпаки пригнічують синтез TLR2, як, ймовірно, і його функцію [259].

У роботі ми спостерігали менше зниження рівня експресії гена *Tjp1*, зниження рівня експресії *Tlr2* в динаміці загоєння ран саме за умов лікування ран фармакологічною композицією на основі меланіну. Зокрема, при загоюванні гнійно-некротичних ран за цих саме умов було виявлено менше зниження експресії *Tlr2* і більш швидке повернення рівня експресії гена *Tjp1* до контрольного рівня, притаманного шкірі без будь-яких уражень.

Таким чином, зменшення експресії *Tlr2* за умов використання фармакологічної композиції можна пояснити потужною бактерицидною дією меланіну на патологічну мікрофлору: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, виявлену в наших попередніх дослідженнях [129]. Це свідчить про те, що репаративна активність TLR2 задля прискорення відновлення епідермального бар'єру та обмеження росту патогенних мікроорганізмів може бути на меншому рівні при загоюванні ран різної етіології саме за умов їх лікування фармакологічною композицією.

АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Нині збільшення виробничого та побутового травматизму тісно пов'язано зі впливом на організм людини негативних чинників у результаті бойових поранень та травм мирного населення, техногенних катастроф, що супроводжується виникненням механічних пошкоджень, які призводять до порушення цілісності покривних тканин – утворенню шкірних ран [12,13]. Не дивлячись на широкий арсенал дерматотропних препаратів, які використовуються для лікування ранового процесу, створення ефективного вітчизняного дерматотропного препарату є актуальною проблемою сьогодення.

Нашу увагу привернула поліфенольна сполука – меланін, продуцентом якого є чорні дріжджоподібні гриби *Pseudonadsoniella brunea*, висіяні зі зразків вертикальних скель острова Галіндез (Українська антарктична станція «Академік Вернадський»). Раніше було встановлено, що меланін, виділений з дріжджоподібних грибів *Nadsoniella nigra* штам Х1, захищав слизову оболонку шлунка від оксидативних уражень, викликаних методом нервово-м'язового напруження за Сельє [10,11]. Тому доцільно було дослідити дії меланіну у складі фармакологічної композиції для лікування уражень шкіри та отримати дані його дерматотропних властивостей.

Для дослідження дерматотропних властивостей меланіну нами було змодельовано вирізанну площинну рану та хімічний опік у щурів викликаний кальцієвою сіллю.

Створена нами суміш, що вміщує меланін та карбопол, є новою біологічно-активною фармакологічною композицією, в основі якої лежать поліфеноли природного походження, що мають низьку токсичність, не акумулюються в організмі, мають високий рівень біотрансформації [120].

Встановлено, що фармакологічна композиція, до складу якої входить 0,1 % меланін розчинений в 0,5% карбополі справляє бактерицидну дію на тест-культури *Staphylococcus aureus* і *Pseudomonas aeruginosa* та фунгістатичну дію на тест-культуру дріжджових грибів роду *Candida*.

Встановлений нами саногенний ефект композиції на основі меланіну спонукає до подальших експериментально-клінічних досліджень нових дерпатотропних препаратів на основі меланіну для лікування інфекційно-механічних пошкоджень м'яких тканин.

На всіх термінах спостереження площа ран під дією фармакологічної композиції на основі меланіну була достовірно меншою у порівнянні з ранами без нанесення композиції. Найбільші темпи загоєння вирізаної площинної рани під впливом фармакологічної композиції на основі меланіну спостерігали на 6-9 добу, при гнійно-некротичних ранах на 12-14 добу. Повна епітелізація ран обох видів під впливом фармакологічної композиції наступала швидше на 4 доби при вирізання площинній рані та на 9 діб при гнійно-некротичній рані.

Наступним етапом нашого дослідження було дослідити інтенсивність вільнорадикальних процесів у шкірі та сироватці крові щурів з ранами, а саме інтенсивність накопичення супероксиданіон радикалу та пероксиду водню.

Встановлено, що зростання вмісту супероксидного аніон-радикалу та пероксиду водню за умов загоювання як повношарових площинних вирізаних ран, так і гнійно-некротичних ранових поверхонь після опіків, викликаних розчином кальцієвої солі відбувається за рахунок його генерації у мітохондріальних та мікросомальних електронтранспортних ланцюгах клітин епітелію. Показано зниження вмісту пероксиду водню та супероксидного аніон радикалу при використанні фармакологічної композиції, за рахунок її антиоксидантних властивостей, відбувалось знешкодження АФК.

При дослідженні інтенсивності процесів перекисного окиснення ліпідів при вирізанній площинній рані та хімічному опіку шкіри, показано, що використання фармакологічної композиції на основі меланіну для місцевого лікування уражень шкіри, покращує процеси загоєння рани, поступово знижуючи рівень продуктів ПОЛ починаючи з 6-добы ранового процесу при корекції різаної рани, та з 9-14 доби при хімічному опіку шкіри. Тому використання дерматотропних препаратів з антиоксидантними властивостями для місцевого лікування, створює сприятливі умови для регенерації пошкоджених тканин та знижує прояви окисног стресу. Так як особливість будови меланінових пігментів, схожа на молекулярні сита та іонообмнні смоли, завдяки стабільному вільнорадикальному стану і здатності до оберненого окислювально-відновлювального потенціалу, меланіни забезпечують захист організму в екстремальних умовах, за яких в клітині генеруються АФК.

Динаміка показників рівня ПОЛ та АОС свідчить про продовження або зниження запальної реакції [156]. Тому, поряд з оцінкою інтенсивності процесів ПОЛ, одним із завдань дослідження стало вивчення ферментів АОС в гомогенаті шкіри з ранового вогнища і сироватки крові при фармакотерапії пошкоджень шкіри фармакологічною композицією на основі меланіну. Активність ферменту першої лінії захисту клітин від вільних радикалів – СОД під впливом фармакологічної композиції на основі меланіну підвищувалась, починаючи з 6-добы експерименту, активність КАТ знижувалась та в подальшому поверталась до рівня контрольних значень. Отже, при травмуванні шкіри спостерігається підвищення активності ферментів АОС, що свідчить про мобілізацію захисних механізмів, меланін який входить до складу фармакологічної композиції відновлює рівень атиоксидантного захисту організму, нормалізує активність антирадикальних ферментів. Ми виявили відсутність грубого рубцювання при загоюванні як повношарових

площинних вирізаних ран, так і гнійно-некротичних ранових поверхонь після опіків, викликаних розчином кальцієвої солі, за умов застосування меланіну. За умов лікування ран фармакологічною композицією на основі меланіну ми спостерігали зниження рівня експресії *Tgfb1*, що узгоджується з іншими роботами, в яких при інгібуванні *Tgfb1* спостерігалось зменшення запалення, і загоєння ран відбувалося також із меншим ступенем рубцювання [133]. За умов лікування ран меланіном ми також спостерігали зниження рівня експресії *Ptgs2* (як і для *Tgfb1*), що узгоджується з іншими роботами, в яких при зниженні експресії *Ptgs2* спостерігалось зменшення запалення, і загоєння ран відбувалося також із меншим ступенем рубцювання [211].

Таким чином, можна зробити припущення про вплив меланіну на зменшення експресії зазначених генів, і відповідно, синтез простагландину E_2 та $TGF-\beta_1$, що є необхідними передумовами для швидкого загоювання ран без виражених рубців

У роботі ми спостерігали менше зниження рівня експресії гена *Tjp1*, зниження рівня експресії *Tlr2* в динаміці загоєння ран саме за умов лікування ран фармакологічною композицією на основі меланіну. Зокрема, при загоюванні гнійно-некротичних ран за цих саме умов було виявлено менше зниження експресії *Tlr2* і більш швидке повернення рівня експресії гена *Tjp1* до контрольного рівня, притаманного шкірі без будь-яких уражень.

Таким чином, зменшення експресії *Tlr2* за умов використання фармакологічної композиції можна пояснити потужною бактерицидною дією меланіну на патологічну мікрофлору: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, виявлену в наших попередніх дослідженнях [129]. Це свідчить про те, що репаративна активність TLR2 задля прискорення відновлення епідермального бар'єру та обмеження росту патогенних мікроорганізмів може бути на меншому рівні при

загоєння ран різної етіології саме за умов їх лікування фармакологічною композицією.

При дослідженні фізико-хімічних властивостей шкіри, показано, що загоєння ран відбувається без рубцювання, що підтверджується меншим відсотком вмісту колагену в шкірі лікованих тварин порівняно з нелікованими.

Встановлено, що композиція володіє антиоксидантними, протизапальними, репаративними властивостями та знижує ризик рубцювання тканини, що є відкритою проблемою в медицині. Отримані дані можуть свідчити про доцільність застосування нової фармакологічної композиції на основі меланіну для лікування гнійно-запальних процесів.

ВИСНОВКИ

Результати, представлені у дисертаційній роботі, поглиблюють існуючі погляди на гоєння вирізанних площинних та гнійно-некротичних ран шкіри під впливом меланіну, та висвітлюють перспективний напрямок майбутніх досліджень, а саме, створення нових дерматотропних препаратів на основі поліфенольних сполук, здатних нормалізувати процеси перекисного окиснення в організмі, пришвидшувати гоєння ран та запобігати утворенню грубоих рубців.

1. Встановлено, що фармакологічна композиція, до складу якої входить 0,1 % меланін, розчинений в 0,5% карбополі, справляє бактерицидну дію на тест-культури *Staphylococcus aureus* і *Pseudomonas aeruginosa* та фунгістатичну дію на тест-культуру дріжджових грибів роду *Candida*, що при нанесенні фармакологічної композиції на рану запобігатиме її вторинному інфікуванню.

2. На основі проведеної оцінки планіметричних та морфологічних параметрів стану шкіри щурів на всіх термінах спостереження під дією фармакологічної композиції на основі меланіну, встановлено, що площа вирізанних площинних та гнійно-некротичних ран і тривалість їх гоєння були достовірно меншими у порівнянні з ранами без нанесення композиції.

3. За використання нової фармакологічної композиції загоєння ран у щурів відбувалося без утворення грубого келоїдного рубця, що підтверджено зменшенням вмісту колагену і виплавленої желатини в шкірі та температури її зварювання, а також зростанням вмісту вологи в рановій поверхні шкіри у порівнянні з тваринами з ранами без обробки ранової поверхні.

4. Вирізані площинні і гнійно-некротичні рани шкіри супроводжувалися розвитком оксидативного стресу та зміною активності ферментів антиоксидантної системи в організмі щурів, в результаті чого в гомогенаті шкіри і сироватці крові зростав вміст супероксид аніон радикалу, пероксиду водню, продуктів перекисного окиснення ліпідів, зменшувався вміст білкових,

небілкових і загальних сульфгідрильних груп. При цьому супероксиддисмутазна активність знижувалась, а каталазна – зростала на тлі виснаження глутатіонової системи антиоксидантного захисту. Застосування фармакологічної композиції з меланіном відновлювало показники оксидативного стресу та активність ферментів антиоксидантного захисту до рівня контролю.

5. Показано, що гоєння повношарових площинних вирізаних та гнійно-некротичних ран шкіри супроводжується підвищенням рівнів експресії мРНК генів *Ptgs2*, *Tgfb1* та *Tlr2* і зменшенням рівня експресії мРНК гену *Tjp1*. Застосування фармакологічної композиції на основі меланіну знижувало рівні експресії мРНК генів *Ptgs2*, *Tgfb1* і *Tlr2* та збільшувало рівень експресії мРНК гену *Tjp1*, що є необхідною передумовою для швидкого загоювання ран без виражених рубців.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Colwell AS, Phan TT, Kong W, et al. Hypertrophic scar fibroblasts have increased connective tissue growth factor expression after transforming growth factor-beta stimulation. *Plast Reconstr Surg.* 2005;116:1387–90.
2. Sen CK. Wound healing essentials: let there be oxygen. *Wound Repair Regen.* 2009;17:1–18.
3. Byung Y.J. Occupational Injuries and Deaths in Domestic Waste Collecting Process. *Factors and Ergonomics in Manufacturing and Service Industries.* 2016;26:608–614.
4. Borowy I. Road traffic injuries: social change and development. *Med Hist.* 2013;57:108–138.
5. White ES, Mantovani AR. Inflammation, wound repair, and fibrosis: reassessing the spectrum of tissue injury and resolution. *J Pathol.* 2013;229:141–144.
6. Leoni G, Neumann A, Sumagin R. Wound repair. role of immune–epithelial interactions. *Mucosal Immunol.* 2015;8:959–968.
7. Reish RG, Eriksson E. Scars: A review of emerging and currently available therapies. *Plast. Reconstr. Surg.* 2008;122:1068–1078.
8. Barrett S. Wound-bed preparation: a vital step in the healing process. *British journal of nursing.* 2017;26(12):24-31.
9. Кондратюк ТО. Особливості росту темнопігментованого дріжджоподібного гриба *Pseudonadsoniella brunnea* (Meripilaceae, Basidiomycota) на різноманітних живильних середовищах. *Український ботанічний журнал.* 2015;72(5):478-483.
10. Чижанська НВ, Кухарський ВМ, Цирюк ОІ. Нові дані про механізми цитопротективної дії меланіну. *Гастроентерологія. Міжвідомчий збірник.* 2007;39:145 – 150.

11. Голишкін ДВ, Фалалєєва ТМ, Непорада КС. та ін. Вплив меланіну на стан слизової оболонки шлунка та реакцію гіпоталамо-гіпофізарно-наднирковозалозної осі за умов дії гострого стресу. *Фізіологічний журнал*. 2015;61(2):66 – 73.
12. GuoS. Factors affecting wound healing. *Journal Dent. Res.*2010;89(3):219 – 229.
13. Valério DA, Georgetti SR, Magro DA. Quercetin reduces inflammatory pain: inhibition of oxidative stress and cytokine production. *J Nat Prod.*2009;72(11):1975–1979.
14. Maioli NA, Zarpelon AC, Mizokami SS. The superoxide anion donor, potassium superoxide, induces pain and inflammation in mice through production of reactive oxygen species and cyclooxygenase-2. *Braz J Med Biol Res.*2015;48(4):321–31.
15. Hordijk P. L. Regulation of NADPH oxidases: the role of Rac proteins. *Circ Res.* 2006;98(4):453–62.
16. Anamika M, Shukla A. Antioxidant status in delayed healing type of wounds. *Int J Exp.* 2000;81:257-263.
17. Kowaltowski AJ, Souza-Pinto de NC, Kowaltowski AJ, Castilho RF, Vercesi AE. Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med.* 2009;47(4):333–43.
18. Davies MJ. Myeloperoxidase-derived oxidation: mechanisms of biological damage and its prevention. *J Clin Biochem Nutr.*2011;48(1):8–19.
19. Furtmüller PG, Klinke A, Nussbaum C. et al. Myeloperoxidase attracts neutrophils by physical forces. *Blood.* 2011;117:1350–1358.
20. Abdel-Salam Bahaa, Ebaid Hossam. Expression of CD11b and CD18 on polymorphonuclear neutrophils stimulated with interleukin-2. *Central-European journal of immunology.* 2014;39(2):209-15.
21. Kurahashi T, Fujii J. Roles of antioxidative enzymes in wound healing. *J Dev Biol.* 2015;3:57–70.

22. Bryan N, Ahswini H, Bryan N et al. Reactive oxygen species (ROS)—a family of fate deciding molecules pivotal in constructive inflammation and wound healing. *Eur Cell Mater.* 2012;24:249–65.
23. Held P, Winooski VT, Held P. An introduction to reactive oxygen species—measurement of ROS in cells. *BioTek Instruments. Biotech Instruments.* 2010;13:86-91.
24. Dhar A, Young MR, Colburn NH. The role of AP-1, NF- κ B and ROS/NOS in skin carcinogenesis: the JB6 model is predictive. *Mol Cell Biochem.* 2002;234:185–93
25. Strand KR, Sun C, Li T et al. Oxidative stress protection and the repair response to hydrogen peroxide in the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus* and in related species. *Arch Microbiol.* 2010;192(6):447–59.
26. Spooner R, Yilmaz O. The role of reactive-oxygen-species in microbial persistence and inflammation. *Int J Mol Sci.* 2011;12 (1):334–52.
27. Varkey M, Ding J, Varkey M, Tredget E. Advances in Skin Substitutes—Potential of Tissue Engineered Skin for Facilitating Anti-Fibrotic Healing. *J. Funct. Biomater.* 2015;6:547–563.
28. Woodley DT et al. Keratinocyte Migration and a Hypothetical New Role for Extracellular Heat Shock Protein 90 Alpha in Orchestrating Skin Wound Healing. *Adv Wound Care.* 2015;4(4):203-212.
29. Sterling JP. Management of the Burn Wound. *Trauma and thermal injury.* 2010;7:1-10.
30. Velnar T. The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms. *J Int Med Res.* 2009;37(5):1528-1542.
31. Bylund J, Björnsdóttir H, Sundqvist M, Karlsson A, Dahlgren C. Measurement of respiratory burst products, released or retained, during activation of professional phagocytes. In: *Neutrophil methods and protocols.* Springer. 2014;1124:321–38.

32. Смолиенко ВН, Анисимова ЛВ, Смолиенко ВН, Притуло ОА, Кубышкин А В. Роль процессов протеолиза в развитии трофических язв при варикозной болезни. *Актуальні проблеми транспортної медицини: навколишнє середовище; професійне здоров'я; патологія*. 2013; 2(2):57-60.
33. Kolluru GK, BirS C, KevilCG, KolluruGK. Endothelial dysfunction and diabetes: effects on angiogenesis, vascular remodeling, and wound healing. *Int J Vasc Med*. 2012;2012:1–30.
34. Bylund J, BjörnsdottirH, Sundqvist M, KarlssonA, Dahlgren C. Measurement of respiratory burst products, released or retained, during activation of professional phagocytes. In: *Neutrophil methods and protocols*. Springer. 2014;1124:321–38.
35. Steiling H, MunzB, WernerS, Brauchle M. Different types of ROS-scavenging enzymes are expressed during cutaneous wound repair. *Exp Cell Res*. 1999;247:484–94.
36. Stone JR, CollinsT. The role of hydrogen peroxide in endothelial proliferative responses. *Endothelium*. 2002;9:231–8.
37. ShiMM, GodleskiJJ, PaulauskisJD. Regulation of macrophage inflammatory protein-1alpha mRNA by oxidative stress. *J Biol Chem*. 2002;271:5878–83.
38. ChoM, HuntTK, HussainMZ. Hydrogen peroxide stimulates macrophage vascular endothelial growth factor release. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;280:2357–63.
39. Loo AE, HoR, Halliwell B. Mechanism of hydrogen peroxide-induced keratinocyte migration in a scratch-wound model. *Free Radic Biol Med*. 2011;51:884–92.
40. Niethammer PA, C. Grabher, AT. Look, Mitchison TJ. Tissue-scale gradient of hydrogen peroxide mediates rapid wound detection in zebrafish. *Nature*. 2009;459:996–9.
41. Bhattacharyya S, Tobacman JK. Hypoxia reduces arylsulfatase B activity and silencing arylsulfatase B replicates and mediates the effects of hypoxia. *PLoS One*. 2012;7:332–350.

42. Дубинина ЕЕ. Биологическая роль супероксидного анион-радикала и супероксиддисмутазы в тканях организма. Успехи совр. биол. 2001;73(1):5–13.
43. Shuqin Y et al. Silk fibroin chondroitin sulfate hyaluronic acid ternary scaffolds for dermal tissue reconstruction. *Acta Biomaterialia*. 2013; 9(6):6771–82.
44. Yamada S, Sugahara K, Özbek S. Evolution of glycosaminoglycans. *Commun Integr Biol*. 2011;4(2):150–158.
45. Prosdoci M., Bevilacqua C. Exogenous hyaluronic acid and wound healing: an updated vision. *Panminerva Med*. 2012;54(2):129–35.
46. Yates C., Hebda P., Wells A. Skin wound healing and scarring: fetal wounds and regenerative restitution. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2012; 96(4):325–33.
47. Matthew PC., Vera LM., O'Toole E. A. Metalloproteinases and Wound Healing *Advances in Wound Care*. 2015;4:225–234.
48. Reish RG. Eriksson E. Scars: a review of emerging and currently available therapies. *Plast Reconstr Surg*. 2008;122 (4):1068–78.
49. Van Doren SR. Matrix metalloproteinase interactions with collagen and elastin *Matrix Biol*. 2015:224–231.
50. Akbari H. et al. The healing effect of nettle extract on second degree burn wounds. *World journal of plastic surgery*. 2015;4(1):23-28.
51. Винник ВС. Современные методы лечения гнойных ран. Сибирское медицинское образование. 2013;1:18-24.
52. Королёва ОВ. Характеристика грибного меланина и гуминоподобных веществ, синтезируемых *carrena maxima*. *Прикладная биохимия и микробиология*. 2007; 43(1):69-76.
53. Воронков ОС. Перспективи використання діагностичних та лікувальних препаратів бактеріофагів. *Вісник Дніпропетровського Університету. Біологія. Медицина*. 2012; 3(2):20-25.
54. Ebadi M. Desk reference of clinical pharmacology. Taylor & Francis Group, LLC. 2008;791.

55. Байтингер ВФ. Пайтян КГ. Морфофункциональные особенности патологических кожных рубцов: состояние вопроса. Вопросы реконструктивной и пластической хирургии. 2013;1(44):28-34.
56. Гилмана АГ., Хардман Дж., Лимберд Л. Клиническая фармакология по Гудману и Гилману. М. Практика. 2006:448.
57. Agudelo M., Vesga O. Therapeutic Equivalence Requires Pharmaceutical, Pharmacokinetic, and Pharmacodynamic Identities: True Bioequivalence of a Generic Product of Intravenous Metronidazole. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2012;56(5):2659-65.
58. Sibbald RG., Krasner DL., Woo KY. Pressure ulcer staging revisited: superficial skin changes & Deep Pressure Ulcer Framework. *Adv Skin Wound Care*. 2011;24(12):571-80.
59. Логачев ВК. Стратегия применения мягких лекарственных форм для местного лечения гнойных ран. *Вісник фармації*. 2002;2(30):50-51.
60. Салманов АГ. Значення мікробної контамінації рани в розвитку інфекції в області хірургічного втручання. *Український журнал екстремальної медицини імені Г.О. Можаєва*. 2008;9(1):6-8.
61. Бесчастнов ВВ., Марамохин ВН. Новый способ активного лечения гнойных ран мягких тканей. *Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки*. 2010;3: 59-67.
62. Привольнев ВВ., Каракулина ЕВ. Основные принципы местного лечения ран и раневой инфекции. *Клин. Микробиол. Антимикроб. Химиотер*. 2011; 13(3);214-222.
63. Agrawal M. Natural polyphenols based new therapeutic avenues for advanced biomedical applications. *Drug metabolism reviews*. 2015;47(4):1-11.
64. Hosnuter M. The protective effects of epigallocatechin gallate against distant organ damage after severe skin burns – experimental study using a rat model of thermal trauma. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*. 2015;24(3): 409-417.

65. Casadevall A. Fungal melanins differ in planar stacking distances. *PLoS ONE*. 2012;7(2):1-6.
66. Solano F. Melanins: skin pigments and much more – types, structural models, biological functions, and formation routes. *New Journal of Science*. 2014;2014: 1-28.
67. Горовой ЛФ., Сенюк ОФ., Курченко В.П. Биотехнологическое получение грибных биополимеров, ценных для медицинского применения. Перспективы и проблемы развития биотехнологии в рамках единого экономического пространства стран содружества. Материалы международной научно-практической конференции. 2005: 52-53.
68. Kunwar. Melanin, a promising radioprotector: mechanisms of actions in a mice model. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2012;264(2012):202-211.
69. Friedman M. Melanin-coated nanoparticles for protection of bone marrow during radiation therapy of cancer. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2010;78(5):1494-1502.
70. Пермякова Н. Химическая структура, растворимость, спектральные и электрохимические свойства эумеланина. Биологически активные вещества и материалы: фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения: материалы междисциплинарной научной конференции. 2013:95.
71. Esmeralda Cuevas-Juárez. Antioxidant and α -glucosidase inhibitory properties of soluble melanins from the fruits of *Vitex mollis* Kunth, *Randia echinocarpa* Sessé et Mociño and *Crescentia alata* Kunth. *Journal of Functional Foods*. 2014;9(1):78-88.
72. Pagels WR. Immunochemical evidence for the involvement of prostaglandin H synthase in hydroperoxide-dependent oxidations by ram seminal vesicle microsomes. *J. Biol. Chem.* 1983;258(10):6517-6525.
73. Xie JL. Expression of Smad protein by normal skin fibroblasts and hypertrophic scar fibroblasts in response to transforming growth factor beta 1. *Dermatol Surg.* 2008;34: 1216-1224.

74. Островский МА., Донцов АЕ. Физиологические функции меланина в организме. Физиология человека. 1985;11(4):670.
75. Agar N., Young AR. Melanogenesis: a photoprotective response to DNA damage. Mutation research. 2005;571:121-132.
76. Исаченко БЛ. Исследования надъ бактеріями Севернаго Ледовитаго Океана. 1914:297.
77. Исаченко БЛ. Избранные труды. 1951;1:408.
78. Лях СП. Патент 2069696. Продуцент противоопухолевого меланинсодержащего препарата «Астромеланин». 1996.
79. El-Obeid A., Al-Harbi S., Al-Jomah N., Hassib A. Herbal melanin modulates tumor necrosis factor (TNF-alfa), interleukin 6 (IL-6) and vascular endothelial growth factor (VEGF) production. 2006;13: 324—333.
80. Golyshkin DV. Effect of melanin on the condition of gastric mucosa and reaction of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis under acute stress. Physiological journal. 2015;61(2):65-72.
81. Henry SL., Concannon MJ., Yee GJ. The effect of magnetic fields on wound healing. Experimental study and review of the literature. Open Access Journal of Plastic Surgery. 2008;8:393-399.
82. Чижанська НВ. Дослідження механізмів антистресової дії меланіну.: автореф. дис.канд. біол. наук: 03.00.13. 2008:15-17.
83. Голишкін ДВ. Вплив меланіну на стан слизової оболонки шлунка та реакцію гіпоталамо-гіпофізарно-наднирковозалозної осі за умов дії гострого стресу.Фізіологічний журнал. 2015;61(2):65-72.
84. Cui Y.Chrysanthemum morifolium extract attenuates high-fat milk-induced fatty liver through peroxisome proliferator-activated receptor alpha-mediated mechanism in mice. Nutr Res. 2014;34:268–275.
85. Борщевская МИ., Васильева СМ. Развитие представлений о биохимии и фармакологии меланиновых пигментов. Вопросы медицинской химии. – 1999;45(1):13–24.

86. Schweitzer AD., Revskaya E., Chu P. Melanin-covered nanoparticles for protection of bone marrow during radiation therapy of cancer. *Int. J. Radiat. oncol. Biol. phys.* 2010;78(5):1494–1502.
87. Huijser A., Pezzella A., Sundström V. Functionality of epidermal melanin pigments: current knowledge on UV-dissipative mechanisms and research perspectives. *Phys.Chem.* 2011;13: 9119.
88. Zonios G., Dimou A. Melanin optical properties provide evidence for chemical and structural disorder in vivo. *Optics express.* 2008;1:8263.
89. Permyakova N.M, Zheltonozhskaya T.V., Beregova T.V. Micellar nanocarriers for anticancer drug melanin. *Mol Cryst Liq Cryst.* 2017;640:122-133.
90. Перший національний конгрес з біоетики [Електронний ресурс]. Еженедельник Аптека. 2001;308(37)(від 24.09.2001).
91. Мальцев В.И., Белоусов Д.Ю. Этическая оценка методик проведения исследований [Електронний ресурс]. Еженедельник Аптека. 2001;305(34) (від 03.09.2001).
92. Сторожаков Г.И., Малышева Е.А. Оценка методик проведения исследований. *Качественная клиническая практика.* 2001;1:21–30.
93. Закон «Про захист тварин від жорстокого поводження» / Верховна Рада України. *Відомості Верховної Ради України.* 2006;27:230.
94. Henry SL, Concannon MJ., Yee GJ. The effect of magnetic fields on wound healing. *Experimental study and review of the literature. Open Access Journal of Plastic Surgery.* 2008;8:393-399.
95. Bilyayeva O. Effects of Sea Silon wound healing in the rat. *Journal of wound care.* 2014;23(8):140-146.
96. Кишкун А.А. Клиническая лабораторная диагностика: учебное пособие. М: ГЭОТАР-Медиа. 2010:971.
97. Васильева Л.С. Изменения планиметрических показателей инфицированной хронической раны при ее лечении препаратами, содержащими биологически активные вещества. *Сиб. мед. ж-л.* 2009;90(7):46-49.

98. Абаев ЮК., Ростов К. Справочник Хирурга. Раны и раневая инфекция. н/Д: Феникс.2006:427.
99. Саркисов ДС., Перов ЮЛ. Микроскопическая техника: руководство для врачей и лаборантов.ред.РАМН. - М. : Медицина. 1996:544.
100. Vereshchaka VV. Physico-chemical properties of the collagen of the skin of healthy people of all ages and people with symptoms of senile sagging. *Dermatol and Venereol.* 2007;4(38):12–8.
101. Okhmat OA, Plavan VP, Mokrousova OP, Danilkovich AG. Chemical analysis and physical and mechanical tests of skin and fur: methodological instructions for laboratory work on the discipline "Analytical control in fur and leather production". KNUTD. Kiev. 2006; 60–4.
102. Lowry OH. Protein measurement with Folin phenolreagent. *J. Biol. Chem.* 1951;193(1):265-275.
103. Sutherland MW, Learmonth BA. Thetetrazoliumdyes MTS and XTT provide new quantitative assays for superoxide and superoxidedismutase. *FreeRadic. Res,* 1997;27(3):283–9.
104. Able AJ., Guest DI., Sutherland MW. Use of new tetrazolium-based assay to study the production of superoxide radicals by tobacco cell cultures challenged with avirulent zoospores of *Phytophthora parasitica varnicotianae*. *PlantPhysiol.* 1998; 177(2):491–9.
105. Gay CA., Gebicki J. M. Measurement of protein and lipid hydroperoxides in biological systems by the ferric–xylenol orange method [Text]. *Analytical Biochemistry.* 2003;315(1):29–35.
106. Гаврилов ВБ., Гаврилова АР., Хмара НФ. Измерение диеновых конъюгатов в плазме крови по УФ-поглощению гептановых и изопропанольных экстрактов. *Лабораторное дело.*1988;2:60-63.
107. Зимон АД., Лещенко НФ. Коллоидная химия. М.: Химия. 1995:336.
108. Стальная ИД., Гаришвили Т.Г. Современные методы в биохимии. М.: Медицина.1977:66-68

109. Чевари С., Чаба И., Секей Й. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологических материалах. *Лабораторное дело*. 1985;11:678–681.
110. Королюк МА., Иванова ЛИ., Майорова ИГ. Метод определения активности каталазы. *Лабораторное дело* 1988;1:16-18.
111. Колесова ОЕ., Маркин АА., Федорова ТН. Перекисное окисление липидов и методы определения продуктов липопероксидации в биологических средах. *Лабораторное дело*. 1984;9:540-546.
112. Власова СН. Активность глутатионзависимых ферментов эритроцитов при хронических заболеваниях печени у детей. *Лаб. дело*, 1990;8:19–22.
113. Hissin PJ. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Analytical Biochemistry*. 1976;74(1):214–226.
114. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys*. 1959;82(1):70-77.
115. Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidiniumthiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987;162(1):156-159.
116. Lee WH., Sonntag WE., Mitschelen M., Yan H., Lee YW. Irradiation induces regionally specific alterations in pro-inflammatory environments in rat brain. *Int J Radiat Biol*. 2010;280(2):132–44.
117. Назарчук ОА., Палій ДВ., Назарчук ГГ. Вивчення резистентності штамів золотистого стафілококу до протимікробних засобів. *Аннали Мечниковського інституту*. 2012;4:133-139.
118. Григорян СХ., Григорян АК., Нанян АС., Григорян ЭС. Сравнительное изучение эффективности различных биоактивных материалов при лечении гнойных ран. *Материалы Международной конференции*. 2001:101–102.
119. Pastar I., Nusbaum AG., Gil J. Interactions of Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* USA300 and *Pseudomonas aeruginosa* in Polymicrobial Wound Infection. *PLoS One*. 2013;8 (2):1–11.

120. Munin A., Edwards-Lévy F. Encapsulation of Natural Polyphenolic Compounds; a Review. *Pharmaceutics*. 2011;3(4):793–829.
121. Айзятұлов ЮФ. Современные особенности патогенеза и комплексной терапии аллергодерматозов. *Журнал дерматології та косметології ім. М. О. Торсуєва*. 2013;1-2:11-14.
122. Edsberg LE., Wyffels JT., Brogan MS., Fries KM. Analysis of the proteomic profile of chronic pressure ulcers. *Wound Repair Regen*. 2012;20(3):378–401.
123. Richmond NA., Maderal AD., Vivas AC. Evidence-based management of common chronic lower extremity ulcers. *Dermatol Ther*. 2013;26 (3):187–96.
124. Левина ЮГ., Намазова-Баранова ЛС., Алексеева АА. Клинико – фармакологические особенности применения цетиризина в терапии аллергических болезней у детей. *Педиатрическая фармакология*. 2014;3: 20–26.
125. Карпова ТН., Матыцин ВО. Оценка эффективности применения средства «Ферменкол» в целях профилактики и коррекции рубцов. *Современная курортология: проблемы, решения, перспективы. Мат. Межд. науч. Конгр.* 2008: 51 – 52.
126. Карапетян ГЭ., Пахомова РА., Кочетова Л.В. Лечение гипертрофических и келоидных рубців. *Фундаментальные исследования*. 2013;3:70-73.
127. Nicoletti G., Perugini P., Bellino S. Scar Remodeling with the Association of Monopolar Capacitive Radiofrequency Electric Stimulation and Negative Pressure. *Photomed Laser Surg*. 2017;35(5):246–258.
128. Wilgus TA, Bergdall VK, Tober KL, Hill KJ, Mitra S, Flavahan NA, Oberyszyn TM. The impact of cyclooxygenase-2 mediated inflammation on scarless fetal wound healing. *American Journal of Pathology*. 2004; 165(3): 753-761.
129. Taburets OV, Morgaienko OO, Kondratiuk TO, Beregova TV, Ostapchenko LI. The Effect of "Melanin-Gel" on the Wound Healing. *Research journal of pharmaceutical, biological and chemical sciences*, 2016; 7(3):2031–8.
130. Mavrova DI. Metall maintenance and physical-chemical indices of unaffected skin site under chronic dermatosis. *Dermatol and Venereol*. 2009;3(45):62-6.

131. Dranitsina AS, Taburets OV, Dvorshchenko KO, Grebinyk DM, Beregova TV, Ostapchenko LI. TGFB 1, PTGS 2 Genes Expression during Dynamics of Wound Healing and with the Treatment of Melanin. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 2017; 8(1):2014–23.
132. Wagener FA, Carels CE, Lundvig DM. Targeting the redox balance in inflammatory skin conditions *Int. J. Mol. Sci*, 2013; 14:9126–67.
133. Penn JW, Grobbelaar AO, Rolfe KJ. The role of the TGF- β family in wound healing, burns and scarring: a review. *Int J Burn Trauma*, 2012;2(1):18-28.
134. Lane, N. *Oxygen: The Molecule that Made the World*. Oxford: Oxford University Press Lane. 2005:374.
135. Ai Pham-Huy L., He H., Pham-Hu C. Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *Int J Biomed Sci*. 2008;4 (2):89–96.
136. Halliwell B. *Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life / Barry Halliwell. Plant Physiology*. 2006; 141:312–322.
137. Leonard S., Wang S., Zang L. Role of molecular oxygen in the generation of hydroxyl and superoxide anion radicals during enzymatic Cr (VI) reduction and its implication to Cr(VI)-induced carcinogenesis. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*. 2000;19: 49–60.
138. Shi M, Gozal E, Choy H A, Forman H J. *Free Radical Biol Med*. 1993;15:57–67.
139. Tanaka H, Okada T, Konishi H, Tsuji T. The effect of reactive oxygen species on the biosynthesis of collagen and glycosaminoglycans in cultured human dermal fibroblasts. *Arch Dermatol Res*. 1993;285:352–355.
140. Wlaschek M., Scharffetter-Kochanek K. Oxidative stress in chronic venous leg ulcers. *Wound Repair Regen*. 2005;13(5):452–61.
141. Babior BM. Phagocytes and oxidative stress. *Am J Med*. 2000;109: 33–44.

142. Kessler L., Bilbault P., Ortéga F. Hyperbaric oxygenation accelerates the healing rate of nonischemic chronic diabetic foot ulcers: a prospective randomized study. *Diabetes Care*. 2003;26(8):2378–82.
143. Sakuma S, Kitamura T, Kuroda C, Takeda K, Nakano S, Hamashima T. All-trans Arachidonic acid generates reactive oxygen species via xanthine dehydrogenase/xanthine oxidase interconversion in the rat liver cytosol in vitro. *J Clin Biochem Nutr*, 2012;51(1):55–60
144. Leung PS, Chan YC. Role of oxidative stress in pancreatic inflammation. *Antioxid. RedoxSignal*. 2009;11(1):135–65.
145. Yin H., Xu L., Porter NA. Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. *Chem Rev*. 2011;111:5944–72.
146. Volinsky R., Kinnunen PK. Oxidized phosphatidylcholines in membrane-level cellular signaling: from biophysics to physiology and molecular pathology. *FEBS J*. 2013;280:2806–16.
147. Kinnunen PK., Kaarniranta K., Mahalka A. K. Protein-oxidized phospholipid interactions in cellular signaling for cell death: from biophysics to clinical correlations. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1818 (10):2446–55.
148. Fruhwirth GO., Loidl A., Hermetter A. Oxidized phospholipids: from molecular properties to disease. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1772 (7):718–36.
149. Esterbauer H., Schaur RJ., Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med*. 1991;11(1):81–128.
150. Giera M., Ioan-Facsinay A., Toes R. Lipid and lipid mediator profiling of human synovial fluid in rheumatoid arthritis patients by means of LC-MS/MS. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1821 (11):1415–24.
151. Reed TT. Lipid peroxidation and neurodegenerative disease. *Free Radic Biol Med*. 2011;51(7):1302–19.

152. Березняков АВ., Попов С. Б., Рубан О. А. Фармакологічне вивчення мазі з сухим екстрактом солодки. *Фітотерапія*. 2011; 2: 61-63.
153. Ebadi M. Antioxidants and free radicals in health and disease: An introduction to reactive oxygen species, oxidative injury, neuronal cell death and therapy in neurodegenerative disease. Arizona: Prominent Press. 2001:13-5.
154. Sivaranjani N., Venkata S., Rao G. Role of Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Atopic Dermatitis. *J Clin Diagn Res*. 2013; 7: 2683–2685.
155. Campisi J. Aging, Cellular Senescence, and Cancer. *Annu Rev Physiol*. 2013 ;75:685–705.
156. Dhall S., Do D., Garcia M. A Novel Model of Chronic Wounds: Importance of Redox Imbalance and Biofilm-Forming Bacteria for Establishment of Chronicity. *PLoS One*. 2014; 9:1–17.
157. Kabel AM. Free Radicals and Antioxidants: Role of Enzymes and Nutrition. *World Journal of Nutrition and Health*. 2014;2:35–38.
158. Lushchak VI. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem Biol Interact*. 2014;224:164–75.
159. Iwase T., Akiko Tajima., Sugimoto S. A Simple Assay for Measuring Catalase Activity: A Visual Approach. *Scientific Reports*. 2013;3:1–4.
160. Margis R., Dunand C., Teixeira FK., Margis-Pinheiro M. Glutathione peroxidase family – an evolutionary overview. *The FEBS journal*. 2008;5:3959–3970.
161. Kumaraguruparan R, Kabalimoorthy J, Nagini S. Correlation of tissue lipid peroxidation and antioxidants with clinical stage and menopausal status in patients with adenocarcinoma of the breast. *Clin Biochem*. 2005;38:154–158.
162. Couto N., Wood J., Barber J. The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homoeostasis network. *Free Radic Biol Med*. 2016; 95:27–42.

163. Tao Li., Xin-Ping Zhao., Li-Yuan Wang. Glutathione S-Transferase P1 Correlated with Oxidative Stress in Hepatocellular Carcinoma. *Int J Med Sci.* 2013;10(6):683–690.
164. Junichi Fujii., Jun-itsu Ito., Xuhong Zhang., Toshihiro Kurahashi. Unveiling the roles of the glutathione redox system in vivo by analyzing genetically modified mice. *J Clin Biochem Nutr.* 2011;49(2):70–78.
165. Fletcher ME., Boshier PR., Wakabayash K. Influence of glutathione-S-transferase (GST) inhibition on lung epithelial cell injury: role of oxidative stress and metabolism. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2015;308(12):1274–85.
166. Townsend DM., Tew K D., Tapiero H. The importance of glutathione in human disease. *Biomed Pharmacother.* 2003; 57:145–55.
167. Hisham Waggiallah, Mohammed Alzohairy. The effect of oxidative stress on human red cells glutathione peroxidase, glutathione reductase level, and prevalence of anemia among diabetics. *N Am J Med Sci.* 2011;3:344–347.
168. Mikhal'chik EV., Anurov MV., Titkova S. M. Activity of antioxidant enzymes in the skin during surgical wounds. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* December. 2006;142(6):667–669.
169. Rahal A., Kumar A., Singh V. Oxidative Stress, Prooxidants, and Antioxidants: The Interplay. *BioMed Research International.* 2014;19.
170. Mary Jane Underdown. *Antioxidants and Wound Healing.* East Tennessee State University. 2013;5:1–54.
171. Marcelo Genestra. Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. *Cellular Signalling.* 2007;19: 1807–1819.
172. Satish Balasaheb Nimse., Dilipkumar Palb. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Advances.* 2015; 35: 27986–28006.
173. Sergio Di Meo., Tanea T., Reed, Paola Venditti., Victor Manuel Victor. Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions. *Oxid Med Cell Longev.* 2016:44.

174. Joanna Kruk. Lifestyle Components and Primary Breast Cancer Prevention. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 2014;15:10543–10555.
175. Thittamaranahalli Muguregowda Honnegowda., Pramod Kumar., Padmanabha Udupa. Effect of limited access dressing on hydroxyproline and enzymatic antioxidant status in nonhealing chronic ulcers. *Indian J Plast Surg*. 2014; 47 (2): 216–220.
176. Santram Lodhi., Avijeet Jain., Alok Pal Jain. Effects of flavonoids from *Martynia annua* and *Tephrosia purpurea* on cutaneous wound healing. *Avicenna J Phytomed*. 2016;6:578–591.
177. Deepak Raj., Douglas E. Keratinocyte Apoptosis in Epidermal Development and Disease. *J Invest Dermatol*. 2006;126:243–257.
178. Andrés Vázquez-Torres. Redox Active Thiol Sensors of Oxidative and Nitrosative Stress. *Antioxid Redox Signal*. 2012;17:1201–1214.
179. Табурець ОВ., Грінченко ОО., Дворщенко КО., Верещака В.В., Остапченко Л.І. Вплив меланіну на прооксидантно-оксидантний гомеостаз у сироватці крові за умов різаної рани шкіри шурів. *Вісник проблем біології та медицини*. 2017;1:191-196.
180. Wagener FA., Carels CE., Lundvig D. M. Targeting the redox balance in inflammatory skin conditions. *Int J Mol Sci*. 2013;14(5):9126–67.
181. Steiling H., Munz B., Werner S., Brauchle M. Different types of ROS-scavenging enzymes are expressed during cutaneous wound repair. *Exp Cell Res*. 1999;247 (2):484–94.
182. Toshihiro Fujiwara., Dominik Duscher., Kristine C. Rustad. Extracellular superoxide dismutase deficiency impairs wound healing in advanced age by reducing neovascularization and fibroblast function. *Exp Dermatol*. 2016;25:206–211.
183. Iuchi Y., Kibe N., Tsunoda S. Implication of oxidative stress as a cause of autoimmune hemolytic anemia in NZB mice. *Free Radic Biol Med*. 2010;48:935–44.

184. Roy S., Khanna S., Nallu K. Dermal wound healing is subject to redox control. *Mol Ther.* 2006;13 (1):211–20.
185. Gerard Drewa., Alina Woźniak., Ewa Krzyżyńska-Malinowska., Rafał Czajkowski. Activity of superoxide dismutase and catalase and the level of lipid peroxidation products reactive with TBA in patients with psoriasis. *Med Sci Monit.* 2002;8:338–343.
186. Vijaykumar M., Pujari Shankargouda Ireddy., Inderraj Itagi. The Serum Levels of Malondialdehyde, Vitamin E and Erythrocyte Catalase Activity in Psoriasis Patients. *J Clin Diagn Res.* 2014;8:14–16.
187. Dipali P. Kadam, Dipali P. Kadam, Rajesh D. Ankush. Role of Oxidative Stress in Various Stages of Psoriasis. *Indian J Clin Biochem.* 2010;25(4):388–392.
188. Asheesh Gupta., Ram Raghubir., Ram L Singh. Antioxidant status during cutaneous wound healing in immunocompromised rats. *Molecular and Cellular Biochemistry.* 2002;241:1–7.
189. Kadam DP., Suryakar AN., Ankush RD. Role of oxidative stress in various stages of psoriasis. *Indian J Clin Biochem.* 2010;25:388–92.
190. Apostolova N., Gomez-Sucerquia L., Gortat A. Compromising mitochondrial function with the antiretroviral drug efavirenz induces cell survival-promoting autophagy. *Hepatology.* 2011;54:1009–19.
191. Sahib AS., Al-Jawad FH., Alkaisy AA., Sahib AS. Effect of antioxidants on the incidence of wound infection in burn patients. *Ann Burns Fire Disasters.* 2010;23(4):199–205.
192. Flavia Alvim Sant'anna Addor. Antioxidants in dermatology. *An Bras Dermatol.* 2017; 92 (3):356–362.
193. Dominik André-Lévigne., Ali Modarress., Michael S. Peppe., Brigitte Pittet-Cuénod. Reactive Oxygen Species and NOX Enzymes Are Emerging as Key Players in Cutaneous Wound Repair. *Int J Mol Sci.* 2017;18(10):2149.
194. Al-Shobaili HA. Correlation of clinical efficacy and psychosocial impact on vitiligo patients by excimer laser treatment. *Ann Saudi Med.* 2014;34:115–21.

195. Abood WN., Al-Henhena NA., Najim Abood. A Wound-healing potential of the fruit extract of *Phaleria macrocarpa*. *Bosn J Basic Med Sci.* 2015;15 (2):25–30.
196. Abdulrazaq Bidemi Nafiu., Mohammad Tariqur Rahman. Anti-inflammatory and antioxidant properties of unripe papaya extract in an excision wound model. *Pharmaceutical Biology.* 2014;53(5):662–671.
197. Yen-Hsien Lee., Jung-Jhih Chang., Chiang-Ting Chien. Antioxidant Sol-Gel Improves Cutaneous Wound Healing in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Exp Diabetes Res.* 2012:1–11.
198. Chandana Choudhury Barua., Shameem Ara Begum., Debesh Chandra Pathak., Rumi Saikia Bora. Wound healing activity of *Alternanthera brasiliana* Kuntze and its anti oxidant profiles in experimentally induced diabetic rats. *Journal of Applied Pharmaceutical Science.* 2013;3:161–166.
199. Winterbourn CC., Kettle AJ. Biomarkers of myeloperoxidase-derived hypochlorous acid. *Free Radic Biol. Med.* 2000;.29: 403–409.
200. Henriques A., Jackson S., Cooper R., Burton N. Free radical production and quenching in honeys with wound healing potential. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2006;58(4):773–777.
201. Aprioku J. S. Pharmacology of Free Radicals and the Impact of Reactive Oxygen Species on the Testis. *J Reprod Infertil.* 2013;14 (4):158–172.
202. Penn JW., Grobbelaar AO., Rolfe KJ. The role of the TGF- β family in wound healing, burns and scarring: a review. *Int J Burn Trauma.* 2012; 2(1):18-28.
203. Schneider JC., Holvanahalli R., Helm P., Goldstein R., Kowalske K. Contractures in burn injury: defining the problem. *J Burn Care Res.* 2006; 27: 508-514.
204. Cowin AJ., Holmes TM., Brosnan P., Ferguson MW. Expression of TGF-beta and its receptors in murine fetal and adult dermal wounds. *Eur J Dermatol.* 2001; 11: 424-431.
205. Klass BR., Grobbelaar AO., Rolfe KJ. Transforming growth factor beta 1

- signalling, wound healing and epiair: a multifunctional cytokine with clinical implications for wound repair, a delicate balance. *Postgrad Med J.* 2009; 85: 9-14.
206. Shi-Wen X., Leask A., Abraham D. Regulation and function of connective tissue growth factor/CCN2 in tissue repair, scarring and fibrosis. *Cytokine Growth factor Rev.* 2008; 19: 133-144.
207. Pan D., Zhe X., Jakkaraju S., Taylot GA., Schuger L. P311 induces a TGF- β -independent, nonfibrogenic myofibroblasts phenotype. *J Clin Invest.* 2002;110: 1349-1358.
208. Krummel TM., Michna BA., Thomas BL., Sporn MB., Nelson JM., Salzberg AM., Cohen IK., Diegelmann RF. Transforming growth factorbeta (TGF-beta) induces fibrosis in a fetal wound model. *J PediatrSurg.* 1988;23:647-652.
209. Soo C., Beanes SR., Hu FY., Zhang X., Dang C., Chang G., Wang Y., Nishimura I., Freymiller E., Longaker MT., Lorenz HP., Ting K. Ontogenetic transition in fetal wound transforming growth factor-beta regulation correlates with collagen organization. *Am J Pathol.* 2003;163:2459-2476.
210. Liechty KW., Adzick NS., Crombleholme TM. Diminished interleukin 6 (IL-6) production during scarless human fetal wound repair. *Cytokine.* 2000; 12:671-676.
211. Wu KK. Cyclooxygenase 2 induction: molecular mechanism and pathophysiologic roles. *J Lab Clin Med.* 1996;128:242-245.
212. Li HS., Hebda PA., Kelly LA., Ehrlich GD., Whitcomb DC., Dohar JE. Up-regulation of prostaglandin EP4 receptor messenger RNA in fetal rabbit skin wound. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2000;126:1337-1343.
213. Ehrlich HP., Kelley SF. Hypertrophic Scar: An interruption in the remodelling of repair- a laser Doppler blood flow study. *Plast Reconstr Surg.* 1992; 90: 993-998.
214. Reish RG., Eriksson E. Scars: a review of emerging and currently available therapies. *Plast Reconstr Surg.* 2008;122:1068-1078.

215. Savitsky YM. Effect of melanin on the secretory function of stomach, cytoprotection processes and motility of proximal part of digestive system. Ph.D. thesis in medical science. 2002:133.
216. Agar N., Young AR. Melanogenesis: a photoprotective response to DNA damage. *Mutation research*. 2005; 571: 121-132.
217. El-Obeid A., Al-Harbi S., Al-Jomah N., Hassib A. Herbal melanin modulates tumor necrosis factor (TNF- α), interleukin 6 (IL-6) and vascular endothelial growth factor (VEGF) production. *Phytomedicine*. 2006;13: 324—333.
218. Golyshkin DV., Falaleeva TM., Neporada KS., Beregova TV. Effect of melanin on the condition of gastric mucosa and reaction of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis under acute stress. *Physiological journal*. 2015; 61(2): 65-72.
219. Taburets OV., Morgaienko OO., Kondratiuk TO., Beregova TV., Ostapchenko LI. The Effect of "Melanin-Gel" on the Wound Healing. *Research journal of pharmaceutical, biological and chemical sciences*. 2016; 7(3): 2031—2038.
220. Henry SL., Concannon MJ., Yee GJ. The effect of magnetic fields on wound healing. Experimental study and review of the literature. *Open Access Journal of Plastic Surgery*. 2008;8: 393-399.
221. Bilyayeva O, Neshta VV, Golub A, Sams-Dodd F. Effects of Sea Silon wound healing in the rat. *Journal of wound care* 2014; 23(8): 140-146.
222. Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidiniumthiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987; 162(1): 156-159.
223. Wang J., Dodd C., Shankowsky HA., Sctt PG., Tredget EE. Deep dermal fibroblasts contribute to hypertrophic scarring. *Lab Invest*. 2008; 88: 1278-1290.
224. Slemple AE., Kirschner RE. Keloids and scars: a review of keloids and scars, their pathogenesis, risk factors, and management. *Curr Opin Pediatr*. 2006; 18: 396-402.

225. Chadwick S., Heath R., Shah M. Abnormal pigmentation within cutaneous scars: A complication of wound healing. *Indian J Plast Surg* . 2012; 45(2): 403–411.
226. Xie JL., Qi SH., Pan S., Xu YB., Li TZ., Liu XS., Li P. Expression of Smad protein by normal skin fibroblasts and hypertrophic scar fibroblasts in response to transforming growth factor beta 1. *Dermatol Surg*. 2008; 34: 1216-1224.
227. McCormick L., Zhang Y., Tootell E., Gilliam A. AntiTGFbeta treatment prevents skin and lung fibrosis in murine sclerodermatous graft-versus host disease: a model for human scleroderma. *J Immunol*. 1999; 163: 5693-5699.
228. Pastar I., Stojadinovic O., Krzyzanowska A., Barrientos S., Stuelten C., Zimmerman K., Blumenberg M., Brem H., Tomic-Canic M. Attenuation of the transforming growth factor beta-signaling pathway in chronic venous ulcers. *Mol Med*. 2010; 16: 92-101.
229. Zhang Y., McCormick L., Gilliam A. Latency associated peptide prevents skin fibrosis in murine sclerodermatous graft-versus host disease, a model for human scleroderma. *J Invest Dermatol*. 2003; 121: 713-719.
230. Gao Fu-Lei., JinRong., Zhang Lu., Zhang Yu-Guang. The contribution of melanocytes to pathological scar formation during wound healing. *Int J Clin Exp Med*. 2013; 6(7): 609-613.
231. Cui Y., Wang XL., Xue J., Liu JY., Xie ML. Chrysanthemum morifolium extract attenuates high-fat milk-induced fatty liver through peroxisome proliferator-activated receptor alpha-mediated mechanism in mice. *Nutr Res*. 2014; 34: 268–275.
232. Dranitsina AS., Taburets OV., Dvorshchenko KO., Grebinyk DM., Beregova TV., Ostapchenko LI. TGFB 1, PTGS 2 Genes Expression during Dynamics of Wound Healing and with the Treatment of Melanin. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. 2017; 8(1):2014–23.
233. Cario E., Gerken G., Podolsky DK. Toll-like receptor 2 enhances ZO-1-associated intestinal epithelial barrier integrity via protein kinase C.

- Gastroenterology. 2004; 127:224–38.
234. Yuki T., Yoshida H., Akazawa Y., Komiya A., Sugiyama Y., Inoue S. Activation of TLR2 enhances tight junction barrier in epidermal keratinocytes. *J Immunol.* 2011; 187:3230–7.
 235. Takeuchi O., Hoshino K., Kawai T., Sanjo H., Takada H., Ogawa T., Takeda K., Akira S. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity,* 1999;11(4):443-51.
 236. McMahon LA., House AK., Catchpole B., Elson-Riggins J., Riddle A., Smith K., Werling D., Burgener IA., Allenspach K. Expression of Toll-like receptor 2 in duodenal biopsies from dogs with inflammatory bowel disease is associated with severity of disease. *Vet Immunol Immunopathol.* 2010;135(1-2):158-63.
 237. Niebuhr M., Lutat C., Sigel S., Werfel T. Impaired TLR-2 expression and TLR-2-mediated cytokine secretion in macrophages from patients with atopic dermatitis. *Allergy.* 2009; 64:1580–7.
 238. Brandner JM., Kief S., Grund C., Rendl M., Houdek P., Kuhn C., Tschachler E., Franke WW., Moll I. Organization and formation of the tight junctionsystem in human epidermis and culturedkeratinocytes. *European Journal of Cell Biology.* 2002; 81:253–63.
 239. Qiao X., Roth I., Féraille E., Hasler U. Different effects of ZO-1, ZO-2 and ZO-3silencing on kidney collecting duct principal cellproliferation and adhesion. *Cell Cycle.* 2014; 13(19):3059–75.
 240. Steed E., Balda MS., Matter K. Dynamics and functions of tight junctions. *Trends Cell Biol.* 2010;20:142–9.
 241. Bauer H., Zweimueller-Mayer J., Steinbacher P., Lametschwandtner A., Bauer HC. The dual role ofzonula occludens (ZO) proteins. *J Biomed Biotechnol.* 2010;2010:402593.
 242. Agar N., Young AR. Melanogenesis: a photoprotective response to DNA damage.*Mutation research.* 2005; 571:121–32.

243. El-Obeid A., Al-Harbi S., Al-Jomah N., Hassib A. Herbal melanin modulates tumor necrosis factor (TNF- α), interleukin 6 (IL-6) and vascular endothelial growth factor (VEGF) production. *Phytomedicine*. 2006; 13: 324–33.
244. Henry SL., Concannon MJ., Yee GJ. The effect of magnetic fields on wound healing. Experimental study and review of the literature. *Open Access Journal of Plastic Surgery*. 2008; 8: 393–399.
245. Bilyayeva O., Neshta VV., Golub A., Sams-Dodd F. Effects of Sea Silon wound healing in the rat. *Journal of wound care*. 2014; 23(8): 140–146.
246. Schäfer M., Werner S. Oxidative stress in normal and impaired wound repair. *Pharmacological Research*. 2008; 58:165–71.
247. Sutherland MW., Learmonth BA. Thetetrazolium dyes MTS and XTT provide new quantitative assays for superoxide and superoxidedismutase. *FreeRadic. Res.*1997; 27(3):283–9.
248. Able AJ., Guest DI., Sutherland MW. Use of new tetrazolium-based assay to study the production of superoxide radicals by tobacco cell cultures challenged with avirulent zoospores of *Phytophthora parasitica* var. *cavarnicotianae*. *PlantPhysiol.*1998; 177(2):491–9.
249. Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidiniumthiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987; 162(1): 156-159.
250. Lee WH., Sonntag WE., Mitschelen M., Yan H., Lee YW. Irradiation induces regionally specific alterations in pro-inflammatory environments in rat brain. *Int J Radiat Biol*. 2010; 280(2):132–44.
251. Sakuma S., Kitamura T., Kuroda C., Takeda K., Nakano S., Hamashima T. All-trans Arachidonic acid generates reactive oxygen species via xanthine dehydrogenase/xanthine oxidase interconversion in the rat liver cytosol in vitro. *J Clin Biochem Nutr*. 2012;51(1):55–60.
252. Leung PS., ChanYC. Role of oxidative stress in pancreatic inflammation. *Antioxid. RedoxSignal*. 2009; 11(1):135–65.
253. Niessen CM. Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function. *J*

- Invest Dermatol. 2007; 127:2525–32.
254. De Benedetto A., Rafaels NM., McGirt LY., Ivanov AI., Georas SN., Cheadle C. Tight junction defects in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2011; 127:773–86.
255. Dickel H., Gambichler T., Kamphowe J., Altmeyer P., Skrygan M. Standardized tape stripping prior to patch testing induces upregulation of Hsp90, Hsp70, IL-33, TNF-alpha and IL-8/CXCL8 mRNA: new insights into the involvement of 'alarmins'. *Contact dermatitis.* 2010; 63:215–22.
256. Aderem A., Ulevitch RJ. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature.* 2000; 406(6797):782–7.
257. Kaisho T., Akira S. Toll-like receptors as adjuvant receptors. *Biochim Biophys Acta.* 2002; 1589(1):1–13.
258. Kostadinova R., Wahli W., Michalik L. PPARs in diseases: control mechanisms of inflammation. *Curr Med Chem.* 2005; 12(25):2995–3009.
259. Liu SJ., Tang ZS., Liao ZX., Cui CL. The chemistry and pharmacology of *Ligularia przewalskii*: a review. *J Ethnopharmacol.* 2018;219:32-49.
260. Gizaw M., Thompson J., Faglie A. Electrospun Fibers as a Dressing Material for Drug and Biological Agent Delivery in Wound Healing Applications. *Bioengineering (Basel).* 2018;5(1):1-28.
261. Berthet M., Gauthier Y., Lacroix C., Verrier B., Monge C. Nanoparticle-Based Dressing: The Future of Wound Treatment. *Trends Biotechnol.* 2017;8:770-784.
262. Byung Yong Jeong. Occupational Injuries and Deaths in Domestic Waste Collecting Process. *Human Factors and Ergonomics in Manufacturing & Service Industries.* 2016;26(5):608-614.
263. Sun X., Ni P., Wu M., Huang Y., Ye J., Xie T. A Clinicoepidemiological Profile of Chronic Wounds in Wound Healing Department in Shanghai. *Int J Low Extrem Wounds.* 2017;16(1):36-44.
264. White ES., Mantovani AR. Inflammation, wound repair, and fibrosis:

- reassessing the spectrum of tissue injury and resolution. *J Pathol.* 2013;229(2):141-4.
265. Leoni G., Neumann PA., Sumagin R., Denning TL., Nusrat A. Wound repair: role of immune-epithelial interactions. *Mucosal Immunol.* 2015 ;8(5):959-68.
266. Schulz A., Rothermund I., Lefering R., Fuchs PC., Schiefer J. Long-term Scar Quality after Treatment of Standardized Partial-Thickness Skin Graft Donor Sites. *Adv Skin Wound Care.* 2018;31(3):109-117
267. Roy S., Ahmed MU., Uddin BMM., Ratan ZA. Evaluation of antibiotic susceptibility in wound infections: A pilot study from Bangladesh. *F1000Res.* 2017;6:2103.
268. Gonzalez MR., Ducret V., Leoni S., Fleuchot B. Transcriptome Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* Cultured in Human Burn Wound Exudates. *Front Cell Infect Microbiol.* 2018;8:39.
269. Chis IC., Clichici A., Nagy AL., Oros A. Quercetin in association with moderate exercise training attenuates injuries induced by experimental diabetes in sciatic nerves. *J Physiol Pharmacol.* 2017;68(6):877-886.
270. Hamdan S., Pastar I., Drakulich S., Dikici E. Nanotechnology-Driven Therapeutic Interventions in Wound Healing: Potential Uses and Applications. *ACS Cent Sci.* 2017;3(3):163-175.
271. Борщевский ГИ., Янчук ИБ., Ярных ТГ. Изучение физико-химических свойств липосомальных препаратов. *Український біофармацевтичний.* 2015;6(41)4-8.
272. Кран ОС., Башура ОГ., Баранова П. Створення комбінованого гелю для лікування ран у другій фазі ранового процесу. Управління, економіка та забезпечення якості в фармації. 2015;4: 33-41.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

За темою дисертації опубліковано 15 наукових робіт, що відбивають основний зміст дисертаційної роботи: 7 статей у наукових виданнях, з них 7 в рекомендованих ДАК України, з них 3 публікації у виданнях, включених до міжнародних наукометричних баз і 8 тез доповідей на наукових конференціях.

1. **Taburets OV**, Morgaienko O.O, Kondratyuk TO, Beregova TV, Ostapchenko LI. The Effect of "Melanin-Gel" on the Wound Healing. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences (RJPBCS). 2016;7(3): 2031-2038. (SCOPUS).
2. **Табурець ОВ**, Грінченко ОО, Дворщенко КО, Верещака ВВ, Остапченко Л.І. Вплив меланіну на прооксидантно-оксидантний гомеостаз у сироватці крові за умов різаної рани шкіри щурів. Вісник проблем біології та медицини. 2017;1:191-196.
3. Dranitsina AS, **Taburets OV**, Dvorshchenko KO, Grebinyk D.M, Beregova TV, Ostapchenko LI. *Tgfb1, Ptgs2* Genes Expression During Dynamics of Wound Healing and with the Treatment of Melanin. Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences (RJPBCS). 2017;8(1):2014-2023.
4. **Табурець ОВ**, Дворщенко КО, Тимошенко М.О, Верещака В.В, Берегова Т.В, Остапченко Л.І. Глутатіонова система у сироватці крові щурів в динаміці різаної рани та при дії фармакологічної композиції на основі меланіну. Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Серія: Проблеми регуляції фізіологічних функцій. 2017;22 (1):5-8.
5. **Табурець ОВ**, Дворщенко КО, Верещака В.В, Берегова ТВ, Остапченко Л.І. Окисна модифікація білків сироватки крові за умов моделювання вирізаної площинної рани у щурів. Вісник проблем біології та медицини. 2017; 3:219-223.
6. Dranitsina A, **Taburets O**, Dvorshchenko K, Grebinyk D, Beregova T and Ostapchenko L. *Tlr2, Tjp1* genes expression during dynamics of wound healing and

with the treatment of melanin. *Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences*. – 2017;30 (2):81-85. (SCOPUS).

7. **Табурець ОВ**, Верещака ВВ, Берегова ТВ, Остапченко ЛІ. Вплив меланіну на морфо-функціональні показники шкіри за умов різаної рани та хімічного опіку у щурів. *Фізіологічний журнал*. 2017; 63(5): 28-33.

8. **Табурець О.В.** Дослідження репаративних властивостей препарату на основі меланіну. / **О.В. Табурець**, І.М. Горова, Н.С. Скочко//X Міжнародна конференція молодих учених «Біологія: від молекули до біосфери», 2-4 грудня 2015: матер.конф. – Харків, Україна, 2015. – С. 75-76.

9. **Табурець О.В.** Дослідження репаративних властивостей «Меланін-гелю» різних концентрацій на площинних ранах/ І.М. Горова, **О.В. Табурець**, І.В. Дудар// IV Міжнародна наукова конференція студентів, аспірантів та молодих вчених «Фундаментальні та прикладні дослідження в біології і екології», 12 – 14 квітня 2016: матер. конф. – Вінниця, Україна, 2016 . – С. 334.

10. **Табурец О.В.** Влияние фармакологической композиции на основе меланина на активность антирадикальных ферментов (СОД ,КАТ) / **О.В. Табурец**, О.А. Гринченко, Е.А. Дворщенко// «XII international research and practice conference», 30 января-7 февраля, 2017: матер.конф. – Sheffield, United Kingdom, 2017. – P. 51-54.

11. **Табурець О.В.** Вміст активних форм кисню у шкірі щурів на фоні застосування нової фармакологічної композиції на основі меланіну при експериментальній різаній рані/ **О.В. Табурець**, О.О. Грінченко, К.О. Дворщенко// IV Міжнародний медико-фармацевтичний конгрес студентів і молодих учених «Інновації та перспективи сучасної медицини» ВІМСО, 5 – 7 квітня, 2017: матер.конф. – Чернівці, Україна, 2017. – С. 57.

12. **Taburets O.** New pharmacological composition which contained melanin stimulates wound healing without scarring/ **O. Taburets**, A. Dranitsina, D. Grebinyk, K. Dvorshchenko, V. Vereschaka, T. Beregova // XIII міжнародна наукова

конференція студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології», 25 – 27 квітня 2017: матер. конф. – Львів, Україна, 2017. – С. 72.

13. **Табурець О.В.** Вміст відновленого та окисленого глутатіону на фоні застосування нової фармакологічної композиції на основі меланіну/ О.О.Гринченко, **О.В. Табурець**, М. О. Тимошенко, К. О. Дворщенко// XV Міжнародна наукова конференція «Шевченківська весна: досягнення біологічної науки / BioScience Advances», 18 – 21 квітня, 2017: матер.конф. – Київ, Україна, 2017. – С. 82-83.

14. **Табурець О.В.** Вплив меланіну на фізико-хімічні показники шкіри щурів при моделюванні хімічного опіку шкіри/ **О.В. Табурець**, В.В. Верещака, Т.В. Берегова, Л.І. Остапченко // Міжнародна науково-практична конференція «Актуальні питання медицини і біології», 30 травня – 1 червня, 2017: матер. конф. – Полтава, Україна, 2017. – С. 38-40.

15. **Taburets O.**The influence of melanin on genes expression during wound healing / **O. Taburets**, K. Dvorshchenko, A. Dranitsina, D. Grebinyk, T. Beregova, L. Ostapchenko // Lviv-Lublin conference of experimental and clinical biochemistry, September 21-23, 2017: abstract book. – Lublin, Poland, 2017. – P. 27.

Апробація результатів дисертації. Основні результати дисертаційної роботи доповідалися та обговорювалися на: X Міжнародній конференції молодих учених «Біологія: від молекули до біосфери» (Харків, 2015), IV Міжнародній науковій конференції студентів, аспірантів та молодих вчених «Фундаментальні та прикладні дослідження в біології і екології» (Вінниця, 2016), XII international research and practice conference» (UK, 2017), IV Міжнародний медико-фармацевтичний конгрес студентів і молодих учених «Інновації та перспективи сучасної медицини» (Чернівці, 2017), XIII Міжнародній науковій конференції "Молодь і поступ біології" (Львів, 2017), Шевченківська весна: конференція студентів, аспірантів та молодих вчених (Київ, 2017), Міжнародна науково-практична конференція «Актуальні питання

медицини і біології», (Полтава, 2017), Lviv-Lublin conference of experimental and clinical biochemistry (Lublin, 2017).