МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
імені ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

Табурець Олеся Володимирівна

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

МЕХАНІЗМ ДЕРМАТОТРОПНОЇ ДІЇ ФАРМАКОЛОГІЧНОЇ КОМПОЗИЦІЇ НА ОСНОВІ МЕЛАНІНУ

03.00.04 – біохімія

Автореферат
дисертації на здобуття
наукового ступеня кандидата біологічних наук

Київ – 2018

Дисертацією є рукопис
Робота виконана на кафедрі біохімії Навчально-наукового центру "Інститут біології та медицини" Київського національного університету імені Тараса Шевченка МОН України

Науковий керівник: доктор медичних наук, старший науковий співробітник
Верещака Володимир Валентинович,
Київський національний університет імені Тараса Шевченка МОН України, завідувач НДЛ відділення експериментальної біології НДЛ «Фізико-хімічної біології» Навчально-наукового центру «Інститут біології та медицини»

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, доцент
Калачнюк Лілія Григорівна,
Національний університет біоресурсів і природокористування України МОН України,
професор кафедри біохімії і фізіології тварин імені академіка М.Ф. Гулого;

доктор медичних наук, професор
Непорада Каріне Степанівна,
Вищий державний навчальний заклад України «Українська медична стоматологічна академія»,
завідувач кафедри біоорганічної та біологічної хімії

Захист відбудеться «21» травня 2018 року о $14^{\underline{00}}$ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.001.24 Київського національного університету імені Тараса Шевченка за адресою: м. Київ, проспект Академіка Глушкова, 2, ННЦ «Інститут біології та медицини», ауд. 434

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

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

Автореферат розісланий «___»_____2018 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради Д 26.001.24 Н.Г. Ракша

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. [Berthet M. et al., 2017; Liu S. et al., 2018; Singh H. et al., 2018; Gizaw M. et al., 2018]. 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 [Byung Y. 2016], збільшенням дорожньо-транспортного травматизму, а також числа хворих із синдромом діабетичної стопи, результатом якої є ампутація нижніх кінцівок [Borowy I. et al.,2013; Junna Ye. et al., 2016]. Розробка таких препаратів набула ще більшої актуальності у зв'язку з необ'явленою війною на Сході України, що призвело до зростання числа хворих. Ушкодження шкіри та рани різної етіології супроводжуються інфекціями шкіри, порушенням про/антиоксидантного стану шкіри та запаленням [White E. et al., 2013; Leoni G. et al., 2015]. Наслідком чого є кисневе голодування шкіри, порушення репаративних механізмів, з подальшим утворенням келоїдного рубця, а в деяких випадках розвитком гангрени [Schulz A. et al., 2018]. 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.) [Roy S. . et al., 2017]. Дефекти шкіри, такі як виразки, опікові, хірургічні рани або рани внаслідок травм, спричиняють колонізацію більш широким спектром бактерій [Gonzalez M. et al., 2018]. Мікробний спектр збудників інфекції характеризується зростанням резистентності до існуючих лікарських препаратів. Водночас лікування хворих обтяжується наявністю чинників, що призводять до ускладнень та інтоксикації організму (вік, наявність інфекцій, діабету, судинних захворювань, раку). Більшість препаратів має вузько направлену дію: лише антимікробну чи дегідратуючу, або некролітичну, тобто не забезпечують всебічної дії на рановий процес. В цьому полягає їх головний недолік. Темпи поширення ран мультифакторного ґенезу 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 [Hamdan S. et al., 2017]. 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 [Борщевский Г., 2015]. Також в НФУ розроблено гель комплексної дії для лікування ран у другій фазі ранового процесу на основі активних фармацевтичних інгредієнтів: глюкозаміну гідрохлориду, алантоїну, лавандової олії [Кран О., 2015]. 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) [Кондратюк Т., 2015], які були висіяні зі зразків вертикальних скель острова Галіндез (Українська антарктична станція «Академік Вернадський»), володіє цитопротекторними, стреспротекторними, антиоксидантними властивостями, вираженою профілактично-лікувальною дією на розвиток ерозивно-виразкових уражень у слизовій оболонці шлунка різного ґенезу [Чижанська Н., 2007; Голишкін Д., 2015]. Ми припустили, що препарат на основі меланіну міг мати дерматотропні властивості та поєднував у собі більшість із властивостей репаративного препарату для лікування ран різного ґенезу.

Актуальність проблеми розробки нових дерматотропних препаратів, які попереджують розвиток інфекцій, сприяють очищенню і грануляції ран, прискорюють регенерацію ран без утворення грубого келоїдного рубця та аналіз літературних даних щодо властивостей меланіну спонукали нас до дослідження дерматотропних властивостей нової фармакологічної композиції (ФК), що містить меланін, продуцентом якого є антарктичні мікроорганізми *Pseudonadsoniella brunnea.*

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 задачі дослідження. Метою роботи було з’ясувати молекулярно-біохімічні механізми дії ФК на основі меланіну за умов моделювання вирізаної площинної рани та хімічного опіку шкіри щурів.

Відповідно до зазначеної мети було поставлено наступні завдання:

1. Дослідити антибактеріальні властивості ФК щодо тест-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 застосуванні нової ФК на основі меланіну.
3. Визначити фізико-хімічні властивості шкіри при шкірній патології та за умов використання ФК.
4. Оцінити інтенсивність вільнорадикальних процесів та стан антиоксидантної системи у гомогенаті шкіри та сироватці крові щурів при вирізаній площинній рані та хімічному опіку шкіри щурів за умов застосування ФК 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 вирізаній площинній рані та хімічному опіку шкіри.

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

Методи дослідження: спектрофотометричні (визначення вмісту вільних радикалів, продуктів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ), окисної модифікації білків, ферментативної активності про- та антиоксидантних ферментів), флуоресцентні (визначення вмісту шиффових основ), молекулярно-генетичні (визначення рівня експресії генів), планіметричні (площа рани, швидкість її загоєння), фізико-хімічні (вмісту вологи і колагену, виходу желатини), 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 шкіри у динаміці, розкриті механізми дії ФК на основі меланіну при цих патологічних станах. Встановлено, що ФК, 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 ФК на основі меланіну, встановлено, що площа вирізаних площинних та хімічного опіку і тривалість їх гоєння були достовірно меншими у порівнянні з ранами без нанесення композиції. При використанні нової ФК 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. Вирізані площинні рани і хімічний опік 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 ПОЛ. При цьому супероксиддисмутазна (СОД) активність знижувалась, а каталазна (КАТ) – зростала на тлі виснаження глутатіонової системи антиоксидантного захисту. Застосування ФК з меланіном запобігало розвитку оксидативного стресу в ушкоджених ділянках шкіри та нормалізувало активність ферментів антиоксидантного захисту до рівня контролю. Показано, що гоєння вирізаних площинних ран та хімічного опіку шкіри супроводжується підвищенням рівнів експресії мРНК генів *Ptgs2 (*простогландин-ендопероксид синтаза-2)*, Tgfb1* (трансформуючий фактор росту бета-1) та *Tlr2* (Toll подібний рецептор-2) і зменшенням рівня експресії мРНК гену *Tjp1(*білок щілинних контактів). Застосування ФК 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.

Практичне значення одержаних результатів. Одержані результати доповнюють уявлення про патогенез уражень шкіри та механізми дії

поліфенольних сполук, до яких належить меланін при експериментальній вирізаній площинній рані та хімічному опіку шкіри. Робота містить експериментальне обґрунтування клінічного застосування ФК на основі меланіну при вирізаній площинній рані та хімічному опіку шкіри. Запропоновано нову ФК 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.

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. Л.І. Остапченко, д.б.н., проф. Т.В. Береговій., д.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» (Великобританія, 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 (Люблін, 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. Дисертаційна робота 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 джерела. Загальний обсяг роботи становить 205 сторінок друкованого тексту, з них 155 основного тексту, ілюстрована 4 таблицями, та 77 рисунками.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали та методи досліджень. Дослідження проведені на 220 білих лабораторних щурах-самцях, масою 200-250 г, які утримувались в акредитованому

віварію ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Дослідження відповідають основним вимогам щодо утримання та роботи з лабораторними тваринами згідно правил Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, які використовуються в експериментальних дослідженнях та інших наукових цілях (Закон України від 21.02.2006 № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження») та узгоджено біоетичною комісією ННЦ "Інститут біології та медицини" Київського національного університету імені Тараса Шевченка, протокол №5 від 29 листопада 2017 року.

Схема експериментів. Всі больові процедури та операції проводились під загальним наркозом із застосуванням тіопенталу натрію (Thiopental sodium, BiochemieGmbH/Austria) 60 мг/кг внутрішньоочеревинно. Тварин утримували в індивідуальних клітках протягом всього експерименту. Проведено дві серії експерименту. В першій серії експерименту моделювали вирізану площинну рану, яку відтворювали на попередньо депільованій ділянці шкіри, у наркотизованих щурів. Для цього шкіру вирізали за допомогою хірургічних скальпеля та пінцету, розміром 1 × 1 $см^2$ [Taburets O., 2016], а в другій – хімічний опік шкіри, який викликали підшкірним введенням 0,1мл $CaCl_2$. Звертали увагу на стандарт ран, розміри яких не повинні були перевищувати 400 $мм^2$. На 4-5 день здійснювали некротомію уражених ділянок і починали лікування ран до повного загоєння [Bilyayeva O., 2014]. Тварини були поділені на IV групи, кожна з яких також була поділена на 5 підгруп по 7 тварин у кожній. I – контрольна група, що складалася з інтактних тварин; II – група, тварини, яким моделювали хімічний опік шкіри, загоєння якого відбувалось без корекції; III – група, тварини, яким моделювали хімічний опік, який обробляли 0,5% розчином карбополу; IV група – тварини з хімічним опіком, яким уражену ділянку обробляли ФК на основі меланіну.

Продуцентом меланіну, використаного в наших дослідженнях, є чорні антарткичні дріжджеподібні гриби *Pseudonadsoniella brunnea* (раніше *Nadsoniella nigra* sp. X-1), які були висіяні зі зразків вертикальних скель острова Галіндез (Українська антарктична станція «Академік Вернадський»). Ми створили нову фармакологічну композицію, до складу якої входить – меланін (0,1% Меланін), розчинений в (0,5% карбополі (Карбопол *980*)). Так як при виконанні роботи досліджувався характер перебігу експериментального інфікованого ранового процесу м'яких тканин, термінами спостереження було обрано його ключові етапи загоєння – 3, 6, 9, 14 доби та день епітелізації рани, коли послідовно змінюється фаза гострих запальних явищ з вираженою гідратацією, фазами деградації та некролізу, початком розвитку грануляцій, повним заповненням поверхні рани грануляційною тканиною, початком краєвої епітелізації та закриттям дефекту рани шкірою. Для досліджень використовували сироватку крові та гомогенат шкіри щурів.

Морфометричний аналіз проводили на парафінових зрізах (3-5 мкм) шкіри (рана з прилеглою здоровою шкірою) забарвлених гематоксиліном-еозином та за Романовським – Гімзою [Саркисов Д., 1996]. Для визначення площі ранової поверхні рани фотографували цифровою фотокамерою (Nikon-D3100), Японія, вимірювання площі ранового пошкодження проводилося за допомогою програми

ImageJ (NIH, США). Результати виражали у відсотках від початкової площі [Васильева Л., 2009].

Визначення загального вмісту азоту проводили за методом К'єльдаля [Kjeldahl J., 1883]. При дослідженні функціональних властивостей сполучної тканини визначали вихід з колагену желатини гідротермічним зварюванням шкіри [Okhmat O., 2006; Vereshchaka V., 2007]. Для визначення відсотка вологи у тканині зразки шкіри зважували на аналітичних вагах і висушували до постійної маси при 80 °С.

Інтенсивність генерації супероксидного аніон-радикалу у біологічному матеріалі визначали за накопиченням ХТТ-формазану [Sutherland M., 1997; Able A., 1998]. Вміст пероксиду водню встановлювали спектрофотметрично з використанням барвника ксиленол оранжевий [Gay C., 2003].

Вміст дієнових кон’югатів визначали в гептан-ізопропанольному екстракті спектрофотометричним методом, а шиффових основ – флуориметричним методом [Гаврилов В., 1988; Зимон А., 1995]. Вміст ТБК-активних сполук визначали по реакції з тіобарбітуровою кислотою [Стальная И., 1977]. Глутатіонпероксидазну активність оцінювали за зменшенням вмісту GSH у реакції з реактивом Елмана. Глутатіонтрансферазну активність визначали за швидкістю утворення кон'югату GSH із 1-хлор-2,4-динітробензолом. Глутатіонредуктазну активність вимірювали за зменшенням оптичної густини проб у результаті окиснення НАД-ФН [Власова С., 1990].

Експресію мРНК в гомогенаті шкіри визначали методом ПЛР зі зворотною транскрипцією. Екстракцію РНК проводили фенольним методом [Chomczynski P., 1987]. Отримання кДНК та полімеразну ланцюгову активність визначали згідно з [Maniatis T., 1984].

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 Стьюдента

Результати досліджень та їх обговорення

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* [Григорян С., 2001]. В зв’язку з цим ми дослідили вплив ФК до якої входить меланін, на процес гоєння вирізаних площинних ран та хімічного опіку шкіри.

Нами було встановлено, що діаметр ділянок відсутності росту тест-культури *Staphylococcus aureus*, за умови дії 0,05 %-ої фармакологічної композиції складав 19,63 ± 0,18 мм, тест-культура *Staphylococcus aureus* є чутливою до дії дослідженої нами фармакологічної композиції (рис.1).

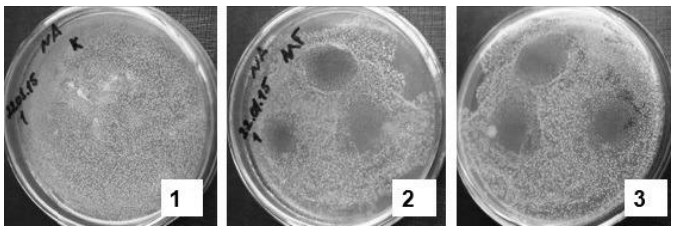

Рис. 1. Бактерицидна дія фармакологічної композиції на тест-культуру *Staphylococcus aureus* після 24 години культивування. 1– контроль, 2, 3 – зони відсутності росту в місцях нанесення меланінового гелю (зворотня сторона чашки Петрі)

Було показано, що діаметр ділянок відсутності росту тест-культури *Pseudomonas aeruginosa* складав 18,75 ± 0,31 мм, що відповідало помірній чутливості (рис. 2).

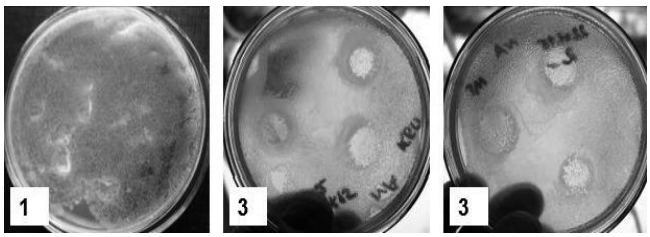

Рис. 2. Бактерицидна дія фармакологічної композиції на тест-культуру *Pseudomonas aeruginosa після* 24 години культивування. 1 – контроль, 2, 3 – зони пригнічення росту в місцях нанесення меланінового гелю (зворотня сторона чашок Петрі)

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).

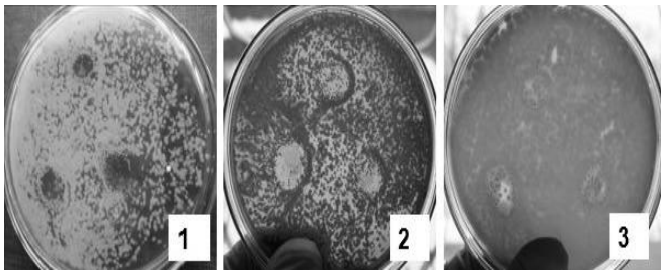

Рис. 3. Фунгістатична дія фармакологічної композиції на тест-культуру дріжджових грибів роду *Candida*. 1, 2 – 24 години культивування, 3 – 72 години культивування, зони інгібування росту заросли (зворотня сторона чашок Петрі)

Таким чином, аналіз результатів свідчить про фунгістатичну та антимікробну властивість досліджуваної композиції щодо тест-культур мікроорганізмів.

Нами було відтворено модель вирізаної площинної рани та хімічного опіку шкіри щурів, проведено гістологічні та біохімічні дослідження. Так як найбільш показовими були результати при моделюванні хімічного опіку шкіри, ми зупинимось на них.

Оцінку ранозагоювального ефекту досліджуваної фармакологічної композиції проводили за аналізом активності контракції поверхні рани у динаміці на 3, 6, 9 ,14, 20-ті доби. Було перевірено ефективність фармакологічної композиції на моделі хімічного опіку шкіри. Показано, що досліджувана композиція володіла вираженою антибактеріальною дією: 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. Епітелізація рани відбулась вже

на 27- добу без вираженого грубого рубця, тоді як в контрольній на 36 добу та супроводжувалась рубцюванням (рис. 4).

Починаючи з початкових фаз ранового процесу, 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.

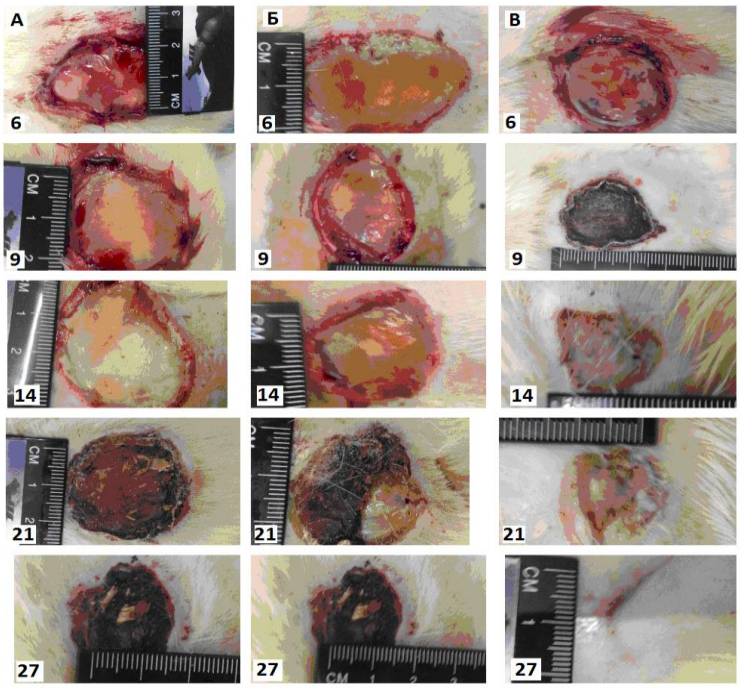

Рис. 4. Площа хімічного опіку шкіри в динаміці загоєння

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

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

В – на рану наносили ФК

Встановлено, що вміст вологи у шкірі тварин з хімічним опіком 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 ФК на основі меланіну ($p \leq 0,05$) відповідно порівняно з контрольною групою тварин (табл.1).

Вміст колагену та виплавленої желатини в дослідних зразках шкіри з хімічним опіком шкіри навпаки підвищувався. Так, у групі щурів з опіком цей показник зростав на 52 % та на 62% ($p \leq 0,05$) відповідно, та на 34 % і 58% ($p \leq 0,05$) при нанесені на рану карбополу, порівняно з контрольною групою тварин, тоді як в групі тварин, рани яких обробляли ФК не було виявлено достовірних відмінностей щодо значень контрольної групи тварин (табл.1).

Таблиця 1

Вміст вологи , колагену, виплавленої желатини у шкірі тварин з хімічним опіком та при використанні фармакологічної композиції (ФК) на основі меланіну, (M ± m, n=10)

Групи тварин	Вміст вологи, %	Вміст колагену, %	Виплавлення желатини, %
Контроль	60,31±5,58	35,80 ± 3,31	2,11 ± 0,20
Опік	31,30 ± 2,89*	54,36±5,03*	3,42 ± 0,13*
Опік+ 0,5% карбопол	33,64 ± 3,11*	47,82±4,42*	3,34 ± 0,12*
Опік+ФК	46,16±4,26*/##	37,12±3,43##	2,31 ± 0,21##

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

Збільшення вмісту колагену та виплавленої желатини, що супроводжується зменшенням вмісту вологи, призводить до деструкції колагенових волокон та незворотньої зміни архітектоніки сполучної тканини. Наші результати збігаються з даними І.І. Маврова та співт. [Mavrova I., 2009], який показав зменшення вмісту вологи, збільшення вмісту колагену у шкірі при хронічних дерматозах, що вказує на метаболічні порушення у шкірних покривах.

Основним механізмом активації вільнорадикальних процесів є збільшення утворення активних форм кисню (АФК). АФК можуть проявляти виразну токсичну дію на структури клітин. Їх пошкоджуюча дія в основному обумовлена подальшою стимуляцією процесів вільнорадикального окиснення, що призводить до розвитку оксидативного стресу, який проявляється накопиченням токсичних продуктів, ушкодженням молекул, мембран клітин, тканин, зниженням репаративних процесів у рані [Dranitsina A., 2017; Wagener F., 2013]. Супероксидний аніон-радикал бере безпосередню участь в ініціації вільнорадикальних процесів. Його генерація є пусковою ланкою каскаду реакцій, які призводять до виникнення інших АФК [Dvorshchenko К., 2013]. Вміст супероксидного аніону визначали за накопиченням ХТТ-формазану, у гомогенаті шкіри в групі тварин із опіками цей показник був вищим у 2,8 разів ($p \leq 0,05$) на 6 добу загоєння відповідно в порівнянні з контролем (рис.5). У той же час у тварин, яким на рани наносили ФК, цей показник був в 1,6 раза нижчим на 6 добу ($p \leq 0,05$), відповідно, ніж у тварин другої групи, та виявився менш підвищеним відносно контролю: 1,8 раза ($p \leq 0,05$) на 6 добу загоєння відповідно, і на 9 добу повертався до контрольних значень (рис.5).

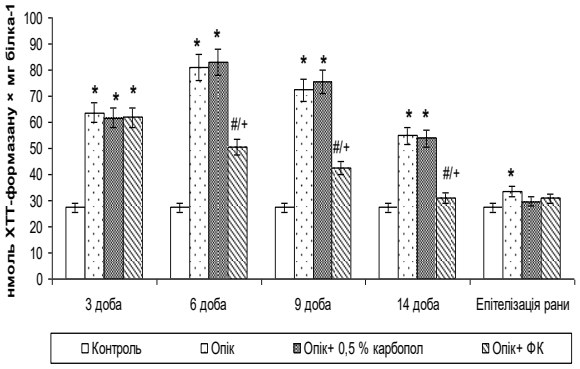

Рис. 5. Вміст ХТТ-формазану у гомогенаті шкіри щурів з хімічним опіком шкіри (M ± m; n=7): *-p≤0,05 порівняно з контрольними тваринами; + - p<0,05 порівняно з групою тварин з раною; #- p≤0,05 порівняно з групою тварин, рани яких обробляли карбополом 0,5%

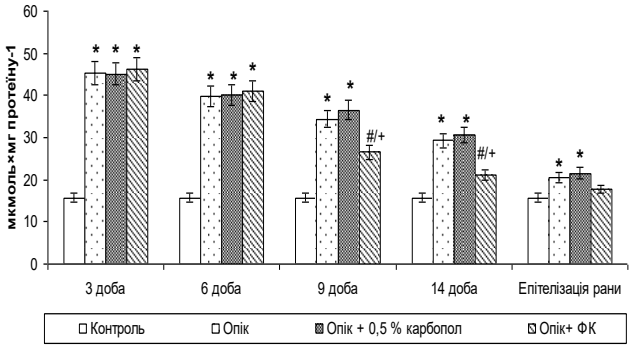

Рис. 6. Вміст H_2O_2 у гомогенаті шкіри щурів з хімічним опіком шкіри (M ± m; n=7): *-p≤0,05 порівняно з контрольними тваринами; + - p<0,05 порівняно з групою тварин з раною; #- p≤0,05 порівняно з групою тварин, рани яких обробляли 0,5% карбополом

Було показано зростання кількості пероксиду водню в гомогенаті шкіри тварин з хімічними опіками в 2,9 раза ($p \leq 0,05$) відповідно на 3 добу загоєння в порівнянні з контролем (рис.6). 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.6).

Основним механізмом активації вільнорадикальних процесів є збільшення утворення активних форм кисню (АФК), які відіграють важливе значення в процесі гоєння ран. Найбільш важливим проявом токсичної дії АФК є ПОЛ. Ці явища лежать в основі багатьох запальних, нейродегенеративних, злоякісних і вікових змін тканин людини, в тому числі і захворювань шкіри [Dhall S., 2014].

Встановлено зниження продуктів перекисного окиснення ліпідів при змодельованих нами ушкодженнях шкіри при використанні ФК на основі меланіну. Зменшення цих продуктів відбувалось на протязі усіх фаз ранового процесу (рис. 7- 9).

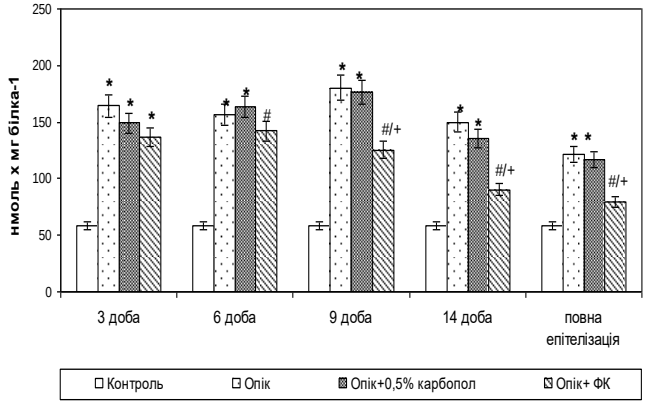

Рис. 7. Вміст дієнових кон'югатів у гомогенаті шкіри щурів з хімічним опіком шкіри, (M ± m; n=7): *-p≤0,05 порівняно з контрольними тваринами; + - p<0,05 порівняно з групою тварин з опіком; #- p≤0,05 порівняно з групою тварин, рани яких обробляли карбополом 0,5%.

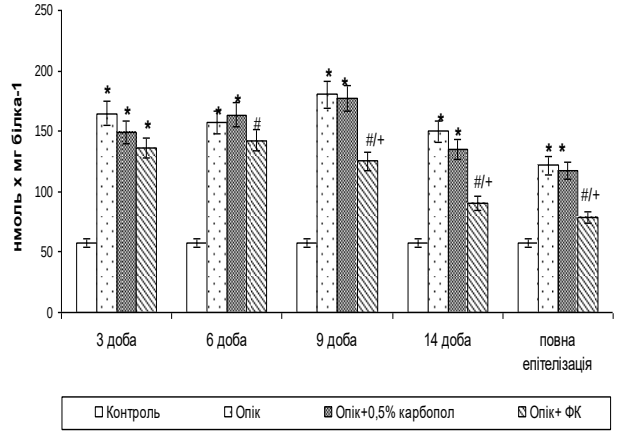

Рис. 8. Вміст ТБК-активних продуктів у гомогенаті шкіри щурів з хімічним опіком шкіри, (M ± m; n=7): *-p≤0,05 порівняно з контрольними тваринами; + - p<0,05 порівняно з групою тварин з опіком; #- p≤0,05 порівняно з групою тварин, рани яких обробляли 0,5% карбополом

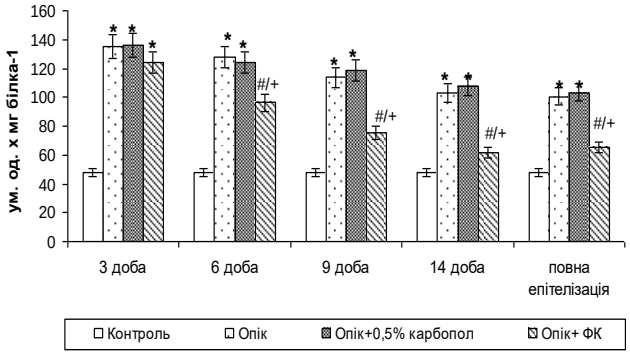

Рис. 9. Вміст шиффових основ у гомогенаті шкіри щурів з хімічним опіком шкіри, (M ± m; n=7): *-p≤0,05 порівняно з контрольними тваринами; + - p<0,05 порівняно з групою тварин з опіком; #-p≤0,05 порівняно з групою тварин, рани яких обробляли 0,5% карбополом

Узагальнюючи отримані нами дані, можна зробити висновок, що використання ФК на основі меланіну для місцевої корекції уражень шкіри, покращує процеси загоєння рани, поступово знижуючи рівень продуктів ПОЛ починаючи з 9 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.

Вільні радикали затримують загоєння ран та викликають значні пошкодження в здорових клітинах тканин по усьому організму. У відповідь на оксидативний стрес в місці рани, антиоксиданти знешкоджують вільні радикали та створюють необхідне середовище для загоєння ран.

В гомогенаті шкіри щурів з хімічним опіком, показано зниження активності СОД : на 3 добу – в 1,8 раза (p< 0,05) відносно показників контрольної групи тварин. Не було встановлено статистично достовірних змін у щурів рани яких обробляли карбополом щодо щурів з опіками. Проте за умов застосування ФК на основі меланіну, супероксиддисмутазна активність у гомогенаті шкіри щурів зростала порівняно тварин з опіками на усіх етапах ранового процесу (рис. 10).

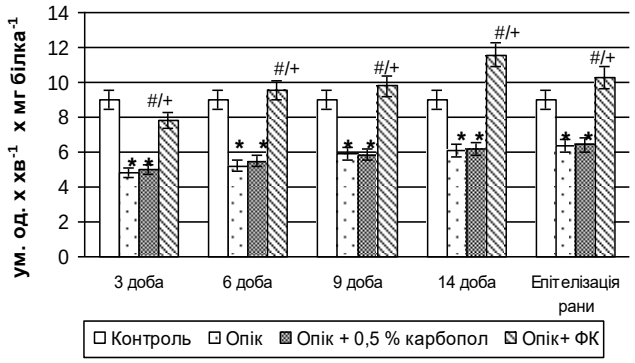

Рис.10. Супероксиддисмутазна активність у гомогенаті шкіри щурів з хімічним опіком шкіри, (M ± m; n=7): *- p≤0,05 порівняно з контрольними тваринами; + - p<0,05 порівняно з групою тварин з раною; #- p≤0,05 порівняно з групою тварин, рани яких обробляли 0,5% карбополом

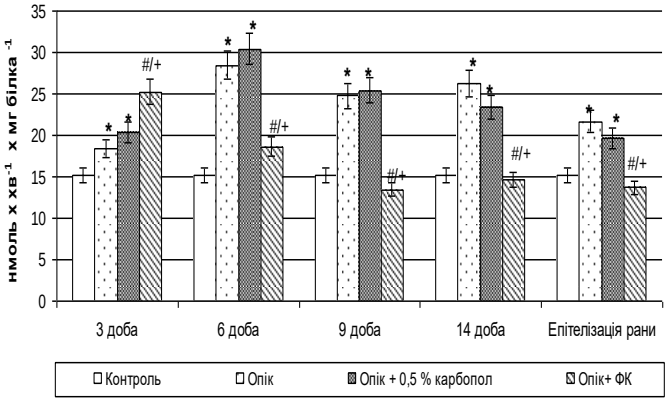

Рис.11. Каталазна активність у гомогенаті шкіри щурів з хімічним опіком шкіри, (M ± m; n=7): *-p≤0,05 порівняно з контрольними тваринами; + - p<0,05 порівняно з групою тварин з раною; #- p≤0,05 порівняно з групою тварин, рани яких обробляли 0,5% карбополом

Показано, що каталазна активність у гомогенаті шкіри щурів з опіками, підвищувалася на перших етапах ранового процесу відносно контрольної групи тварин. У групі тварин з карбополом, каталазна активність у гомогенаті шкіри статистично достовірно не відрізнялась відносно тварин з опіками. У групі тварин, яким наносили ФК, каталазна активність 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) раза відповідно, порівняно групи тварин з опіками (рис. 11).

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.

За умов хімічного опіку в гомогенаті шкіри зростає активність глутатіонпероксидази (рис.12) та глутатіонтрансферази (рис.13). При місцевому нанесенні на опіки ФК на основі меланіну активності вказаних ферментів нормалізуються, що можна пояснити здатністю меланіну до поглинання вільних радикалів.

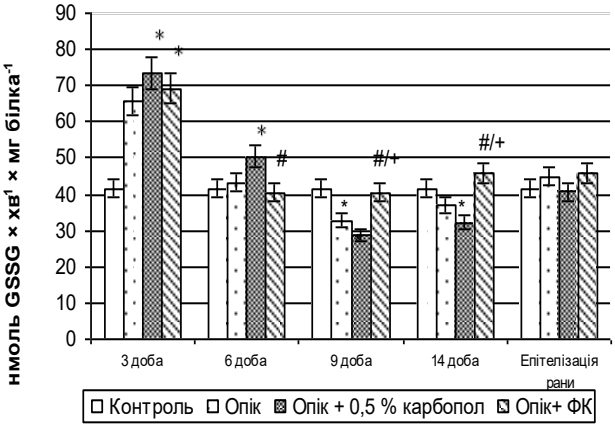

Рис.12. Глутатіонпероксидазна активність у гомогенаті шкіри щурів з хімічним опіком шкіри (M ± m; n=7): *-p≤0,05 порівняно з контрольними тваринами; + - p<0,05 порівняно з групою тварин з опіком; #- p≤0,05 порівняно з групою тварин, опіки яких обробляли 0,5% карбополом

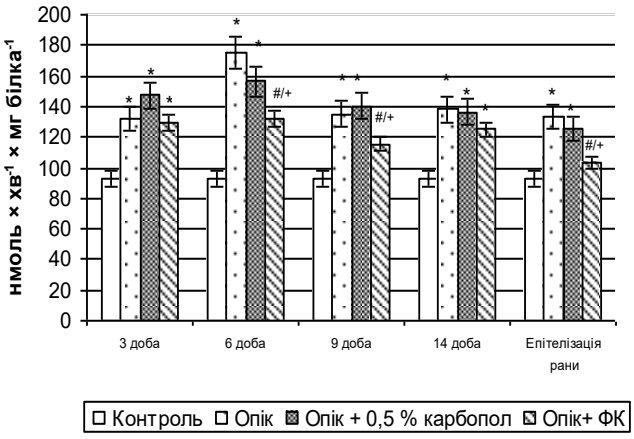

Рис.13.Глутатіонтрансферазна активність у гомогенаті шкіри щурів з хімічним опіком шкіри (M ± m; n=7): *-p≤0,05 порівняно з контрольними тваринами; + - p<0,05 порівняно з групою тварин з опіком; #- p≤0,05 порівняно з групою тварин, опіки яких обробляли 0,5% карбополом

Існують фактори, що сприяють генерації рубцевої тканини. Доведено, що одним із таких факторів є трансформуючий фактор росту β (TGF-β_1), який кодується геном *Tgfb1*. Ген *Tlr2* (кодує Toll-подібний рецептор 2) експресується в ентероцитах, колоноцитах, клітинах неспецифічного імунітету (макрофаги, мастоцити тощо), кератиноцитах, сальних залозах тощо [Kuo I., 2013]. Білок цитоплазматичної пластинки - ZO-1 (Zonula occludens-1, кодується геном *Tjp1*) разом із оклюдином формує один із відповідних комплексів білок-асоційованих щільних контактів (ZO). Метаболіти і ферменти каскаду арахідонової кислоти, у тому числі фермент - циклооксигеназа-2, COX-2 (кодується геном - *Ptgs2*) і його продукт - простагландин E_2 (PGE_2), як відомо, є важливими медіаторами запальної реакції, модулюють затримку загоєння, формування рубців шкіри тощо [Wilgus T., 2004].

Показано зростання рівня експресії генів, *Tlr2, Ptgs2* та *Tgfb1* та зниження *Tjp* при загоюванні вирізаних площинних та опіках. Під впливом ФК, рівень експресії цих генів змінювався в сторону контрольної групи щурів, опіки яких не обробляли ФК. Таким чином, можна зробити припущення про вплив меланіну на зменшення експресії зазначених генів: зменшення експресії *Tlr2* за умов використання ФК 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 цитокинів: TNF-α, ІЛ-6, VEGF тощо за рахунок 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* пов'язано із синтезом простагландина E_2 та TGF-β_1, що є необхідними передумовами для швидкого загоювання ран без виражених рубців.

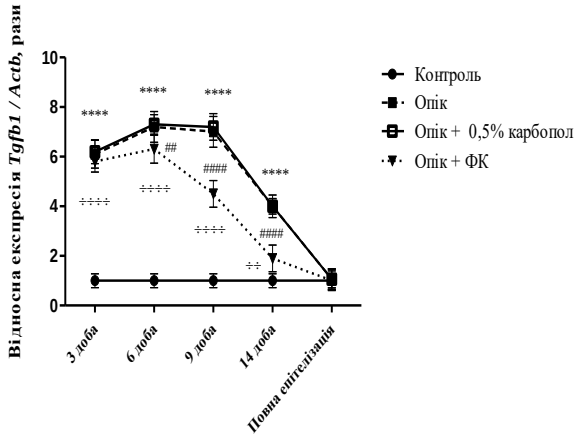

Рис.14. Рівень експресії мРНК гена *Tgfb1* у динаміці загоєння опіку та при використанні ФК. 1 – контроль; 2 – опік; 3 – опік + 0,5 % карбопол; 4 – опік + 0,1 % ФК; **** – $p \leq 0,0001$ опіки відносно контролю; ####, ## - $p \leq 0,0001$, $\leq 0,01$ опік з нанесеною ФК відносно тварин із опіками; ÷÷÷÷, ÷÷ - $p \leq 0,0001$, $\leq 0,01$ опік з нанесеним ФК порівняно з контролем.

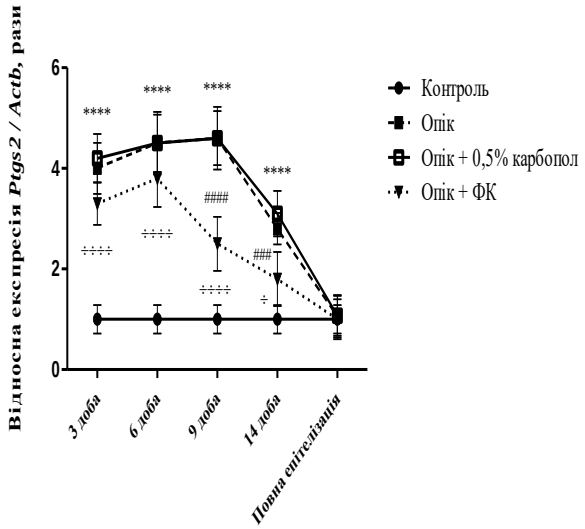

Рис.15. Рівень експресії мРНК гена *Ptgs2* в динаміці загоєння опіку та при ФК. 1 – контроль; 2 – опік; 3 –опік + 0,5 % карбопол; 4 – опік + 0,1 % ФК; **** – $p \leq 0,0001$ опік відносно контролю; ####, ### - $p \leq 0,0001$, $\leq 0,001$ опік з нанесеною ФК відносно тварин із опіками; ÷÷÷÷, ÷ - $p \leq 0,0001$, $\leq 0,05$ опік з нанесеним ФК порівняно з контролем

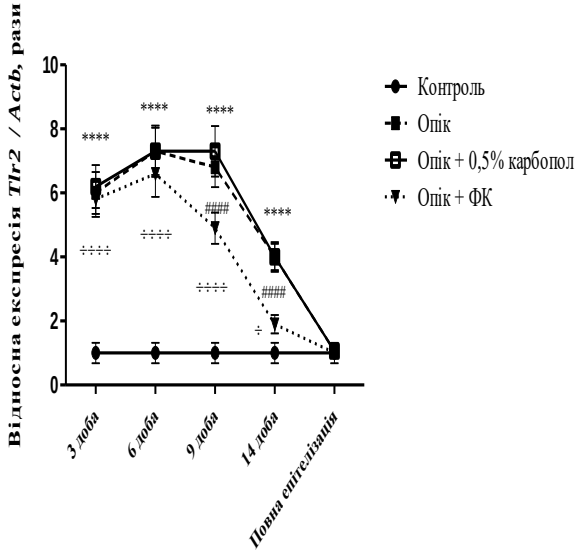

Рис.16. Рівень експресії мРНК гена *Tlr2* у динаміці опіків та при нанесенні ФК. 1 – контроль; 2 – опік; 3 – опік + карбопол; 4 – опік + ФК; **** – $p \leq 0,0001$ опіки відносно контролю; #### - $p \leq 0,0001$ опіки з нанесеною ФК відносно тварин із опіками; ÷÷÷÷ - $p \leq 0,0001$, ÷ $p \leq 0,05$ опік з нанесеною ФК порівняно з контролем

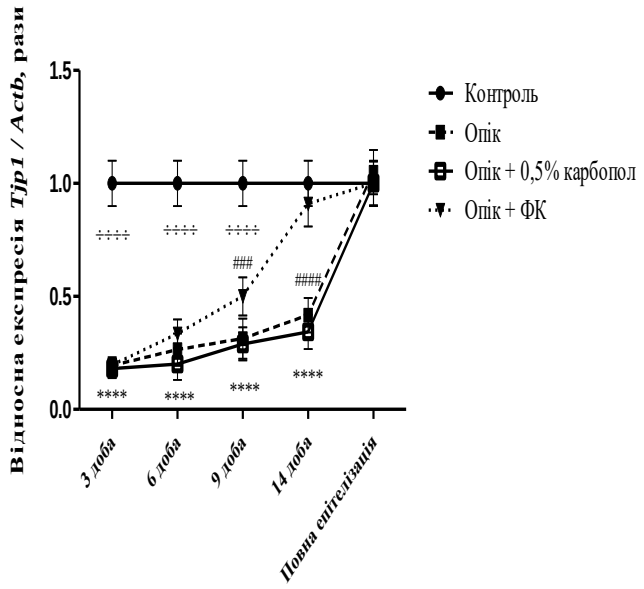

Рис.17. Рівень експресії мРНК гена *Tjp1* у динаміці загоєння опіків та при нанесенні ФК. 1 – контроль; 2 –ФК; 3 – опік + карбопол; 4 – опік + ФК; **** – $p \leq 0{,}0001$ опіки відносно контролю; #### - $p \leq 0{,}0001$, ### - $p \leq 0{,}001$ опік з нанесеною ФК відносно тварин із опіками; ÷÷÷÷ - $p \leq 0{,}0001$ опік з нанесеною ФК порівняно з контролем.

ВИСНОВКИ

Результати, представлені у дисертаційній роботі, поглиблюють існуючі погляди на гоєння вирізаних площинних ран та хімічного опіку шкіри під впливом ФК, що вміщує меланін, 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 грубих рубців.

1. ФК, 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*, що запобігатиме вторинному інфікуванню ран.

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

3. При використанні ФК, 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 порівняно з контрольною групою тварин.

4. Вирізані площинні рани та хімічний опік шкіри супроводжувалися розвитком оксидативного стресу та зміною активності ферментів прооксидантно-антиоксидантної системи в організмі щурів, що супроводжується зростанням вмісту супероксид аніон радикалу на 6 добу в 2,8 раза, пероксиду водню на 9 добу в 2,9 раза, продуктів перекисного окиснення ліпідів (дієнових кон'югатів, ТБК-активних сполук, шиффових основ). При цьому супероксиддисмутазна активність знижується, а каталазна – зростає на тлі виснаження глутатіонової системи антиоксидантного захисту (зростання активності глутатіонпероксидази,

глутатіонтрансферази). Застосування ФК з меланіном відновлювює показники оксидативного стресу та активність ферментів антиоксидантного захисту до рівня контролю.

5. Гоєння опіків шкіри супроводжується підвищенням рівнів експресії мРНК генів шкіри *Ptgs2, Tgfb1* та *Tlr2* і зменшенням рівня експресії мРНК гену *Tjp1*. Застосування ФК 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.

СПИСОК ПРАЦЬ, ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Taburets O.V. The Effect of "Melanin-Gel" on the Wound Healing. / O.V. Taburets, O.O. Morgaienko, T.O. Kondratyuk, T.V. Beregova, Ostapchenko L.I // Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences (RJPBCS). – 2016. – 7(3). – P. 2031-2038. (*Здобувачем проведено експериментальну роботу по вимірах площі ран, пошук джерел літератури, статистичну обробку результатів та їх аналіз, підготовку матеріалів до друку*).
2. Табурець О.В. Вплив меланіну на прооксидантно-оксидантний гомеостаз у сироватці крові за умов різаної рани шкіри щурів / О.В. Табурець, О.О. Грінченко, К.О. Дворщенко, В.В. Верещака, Л.І. Остапченко // Вісник проблем біології та медицини. – 2017. - Вип. 1. - С. 191-196. (*Здобувачем проведено експериментальну роботу по визначенню продуктів перекисного окиснення ліпідів та ферментів антиоксидантного захисту, аналіз отриманих результатів, підготовку матеріалів до друку*).
3. Dranitsina A.S. *Tgfb1, Ptgs2* Genes Expression During Dynamics of Wound Healing and with the Treatment of Melanin/ A.S. Dranitsina, O.V.Taburets, K.O. Dvorshchenko, D.M.Grebinyk, T.V.Beregova and LI. Ostapchenko // Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences (RJPBCS). – 2017. – 8(1).–P. 2014-2023. (*Здобувачем проведено планування експерименту, забір метеріалу та підготовку матеріалів до друку*).
4. Табурець О.В. Глутатіонова система у сироватці крові щурів в динаміці різаної рани та при дії фармакологічної композиції на основі меланіну / О.В. Табурець, К.О. Дворщенко, М.О. Тимошенко, В.В. Верещака, Т.В. Берегова, Л.І. Остапченко // Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка. – 2017. – №1 (22). – С. 5-8. (*Здобувачем проведено експериментальну роботу по визначенню ферментів глутатіонової ланки антиоксидантної системи, аналіз отриманих результатів, підготовку матеріалів до друку*).
5. Табурець О.В. Окисна модифікація білків сироватки крові за умов моделювання вирізаної площинної рани у щурів / О.В. Табурець, К.О. Дворщенко, В.В. Верещака, Т.В. Берегова, Л.І. Остапченко // Вісник проблем біології та медицини. – 2017. - Вип. 3. - С. 219-223. (*Здобувачем проведено пошук джерел літератури, планування та проведення експериментальної роботи по визначенню окисних модифікацій білків, аналіз результатів, підготовку матеріалів до друку*).
6. Taburets O. *Tlr2, Tjp1* genes expression during dynamics of wound healing and with the treatment of melanin / A.Dranitsina, O.Taburets, K.Dvorshchenko, D.Grebinyk,

T.Beregova and L. Ostapchenko // Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences. – 2017 – 30 (2). – P. 81-85. (*Здобувачем проведено пошук джерел літератури, аналіз отриманих результатів*).
7. Табурець О.В. Вплив меланіну на морфофункціональні показники шкіри за умов різаної рани та хімічного опіку у щурів / О.В. Табурець, В.В. Верещака, Т.В. Берегова, Л.І. Остапченко // Фізіологічний журнал. – 2017. - Т. 63, № 5. – С. 28-33. (*Здобувачем проведено пошук джерел літератури, визначення вмісту колагену, виплавленої желатини та вологи в шкірі, проведено статистичну обробку результатів та їх аналіз, підготовку матеріалів до друку*).
8. Табурець О.В. Дослідження репаративних властивостей препарату на основі меланіну / О.В. Табурець, Н.С Скочко // X Міжнародна конференція молодих учених «Біологія: від молекули до біосфери», 2-4 грудня 2015 року: матер.конфер. – 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 року: матер.конфер. – 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 года: 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», 5 – 7 квітня 2017 року: матер.конфер. – Чернівці, Україна, 2017. – С. 57.
12. Taburets O. New pharmacological composition which contained melanin stimulates wound healing without scarring / Taburets O., Dranitsina A., Grebinyk D., Dvorshchenko K., Vereschaka V., Beregova T. // XIII міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології», 25 – 27 квітня 2017 року: 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 року: матер.кофер. – 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 року: матер.конфер. – Полтава, Україна, 2017. – С. 38-40.

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

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. – Київський національний університет імені Тараса Шевченка МОН України, Київ, 2018.

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

Отримані результати показали, 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.* 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 желатини в шкірі був меншим, вміст вологи був більшим, ніж у тварин з ранами без корекції).

Встановлено зниження продуктів перекисного окиснення ліпідів в гомогенаті шкіри та сироватці крові щурів при змодельованих нами патологіях шкіри при використанні фармакологічної композиції на основі меланіну. За умов вирізаної площинної рани та хімічного опіку 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.

Показано зростання рівня експресії генів у шкірі: *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.

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

АННОТАЦИЯ

Табурец О.В. Механизм дерматотропного действия фармакологической композиции на основе меланина. - Квалификационный научный труд на правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.04 - биохимия. - Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко МОН Украины, Киев, 2018.

Работа посвящена исследованию механизма дерматотропного действия фармакологической композиции на основе меланина в условиях моделирования вырезанной плоскостной раны и химического ожога кожи крыс. Полученные результаты показали, что фармакологическая композиция, в состав которой входит 0,1% меланин растворенный в 0,5% карбополе оказывает бактерицидное действие на тест-культуры *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa* и фунгистатическое действие на тест-культуру дрожжевых грибов рода *Candida*.

При использовании новой фармакологической композиции заживления вырезанной плоскостной и гнойно-некротической раны происходило без грубого рубцевания ткани, подтверждающие наши исследования (содержание коллагена и выплавленной желатина в коже был меньше, содержание влаги было больше, чем у животных с ранами без коррекции). Установлено снижение продуктов перекисного окисления липидов в гомогенате кожи и сыворотке крови крыс при смоделированных нами патологиях кожи при использовании фармакологической композиции на основе меланина.

В условиях плоскостно-вырезанной и гнойно-некротической раны в гомогенате кожи и сыворотке крови возрастает активность глутатионпероксидазы и глутатионтрансферазы, снижается супероксиддисмутазна активность и растет каталазная активность. При местном нанесении на раны фармакологической композиции на основе меланина активности указанных ферментов нормализуются.

Показано рост и уровня экспрессии генов в коже: *Tlr2, Ptgs2* и *Tgfb1* и снижение *Tjp* при заживлении вырезанных плоскостных и гнойно-некротических ран. Под влиянием фармакологической композиции, уровень экспрессии этих генов менялся в сторону контрольной группы крыс, раны которых обрабатывали фармакологической композицией.

Ключевые слова: вырезанная плоскостная рана, химический ожог кожи, меланин, коллаген, перекисное окисление липидов, антиоксидантная система.

SUMMARY

Taburets O.V. Mechanism of dermatotropic action of a melanin-based pharmacological composition. - Manuscript.

Thesis for obtaining the Candidate of Sciences degree in Biology, specialty 03.00.04 - Biochemistry. - Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ministry of Education and Science of Ukraine, Kyiv, 2018.

The work is devoted to investigation of the mechanism of dermatotropic action of a melanin-based pharmaceutical composition in terms of a full-thickness wound and chemical burn on the skin of rats. It is established that the pharmacological composition comprising 0.1% melanin dissolved in 0.5% Carbopol produces bactericidal effect of the test cultures *Staphylococcus aureus*and *Pseudomonas aeruginosa* and a fungistatic effect on the test culture of *Candida* fungi. During all follow-up periods, the area of the wounds

influenced by a melanin-based pharmaceutical composition was significantly lower compared to the wounds without the applied composition. The greatest rate of healing of a full-thickness wound influencedby a melanin-based pharmaceutical composition was observed on day 6-9, and the for the purulent necrotic wounds – on day 12-14. A complete epithelization of wounds of both types under the influence of the pharmaceutical composition occurred 4 days faster on a full-thickness wound and 9 days faster on a purulent necrotic wound. The use of a new pharmaceutical compositions promoted the healing of the full-thickness and purulent necrotic wounds without a gross tissue scarring, as confirmed by our studies (the percentage of collagen and melted gelatin in the skin was less, and the moisture content was greater than in animals with untreated wounds). It is shown that upon daily application (twice daily) of a melanin-based pharmaceutical on the full-thickness and purulent necrotic wound, starting from the sixth day of the wound healing, the content of superoxide anion radical and hydrogen peroxide is reduced in skin homogenate and serum, indicating the antioxidant properties of melanin. The decrease of lipid peroxidation products upon skin pathologies simulated by them under the influence of the melanin-based pharmaceutical composition was observed. These products reducedat the early phases of wound healing, both in serum and in homogenate of the rat skin, which may be connected with melanin structure, as a polyphenolic compound, it is capable of reacting with peroxide radicals and destroying the hyperoxides to prevent the formation of free radicals, leading to chain termination and loweringthe oxidation rate. Upon a full-thickness and purulent necrotic wound, glutathione peroxidase and glutathione transferase activity is increased, superoxide dismutase activity is reduced and catalase activity is increased in skin homogenate and serum. When the melanin-based pharmaceutical composition is topically applied to the wounds, the activity of these enzymes is normalized due to the ability of melanin to absorb free radicals. An increase in *Tlr2, Ptgs2* та *Tgfb1* gene expression and *Tjp* reduction is shown during healing of the full-thickness and purulent necrotic wounds. Under the influence of the pharmaceutical composition, the expression level of these genes changed in the direction of the control group of rats, whose wounds were not treated with a pharmacological composition. Thus, we can assume that melanin reduces the expression of these genes; a reduced *Tlr2* expression in terms of use of a pharmaceutical composition can be explained by a strong bactericidal effect of melanin on pathological microflora, i.e. *Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Candida albicans*. Melanin has a cytoprotective effect; it reduces the activity of lipid peroxidation, increases the activity of the antioxidant system enzymes, preventing DNA damage; affects the production of cytokines, such as TNF-α, IL-6, VEGF, etc. by, for example, affecting the expression of PPAR nuclear receptors, increases eNOS expression and release of anti-inflammatory cytokines in order to reduce the intensity of inflammation and scarring during the wound healing. A reduced *Ptgs2* and *Tgfb1*expression may be associated with the synthesis of $E_2$and TGF-$\beta_1$prostaglandin, which is a prerequisite for rapid wound healing without expressed scarring.

Thus, the melanin-based pharmaceutical composition has antibacterial, wound-healing, anti-inflammatory and antioxidant properties, indicating the effectiveness of this composition to accelerate the wound healing without the formation of a rough keloid scar.

Keywords: full-thickness wound, chemical skin burns, melanin, collagen, lipid peroxidation, antioxidant system.