

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ
И.М. СЕЧЕНОВА МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)

На правах рукописи



Галенко-Ярошевский Павел Александрович

**Теоретическое и экспериментальное обоснование разработки
дерматотропных лекарственных средств на основе металлокомплексов
цинка производных N-алкенилимидазолов**

3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

доктор биологических наук, доцент

Лебедева Светлана Анатольевна

Москва – 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ДЕРМАТОТРОПНОГО ДЕЙСТВИЯ ЦИНКА КАК ЭССЕНЦИАЛЬНОГО МИКРОЭЛЕМЕНТА.....	12
1.1. Биологическая роль цинка	12
1.2. Роль цинка в процессах регенерации и репарации кожи.....	15
1.2.1. Патофизиология раневых процессов.....	16
1.2.2. Роль клеточных компонентов в процессе заживления раны.....	20
1.2.3. Роль цинка в процессах ранозаживления кожи.....	26
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	41
2.1. Дизайн экспериментального исследования.....	41
2.2. Экспериментальные животные.....	43
2.3. Исследованные химические соединения и референтные средства.....	44
2.4. Методы исследования.....	57
2.4.1. Оценка острой накожной токсичности.....	57
2.4.2. Определение острой токсичности при внутрибрюшинном введении.....	57
2.4.3. Модель неинфицированной линейной раны.....	58
2.4.4. Модель неинфицированной плоскостной раны.....	59
2.4.5. Модель контактного дерматита.....	60
2.4.6. Изучение противомикробной активности.....	61
2.4.6.1. Метод двукратных серийных разведений <i>in vitro</i>	61
2.4.6.2. Раневая модель моноинфекции <i>in vivo</i>	63
2.4.7. Гистоморфологические исследования.....	66
2.4.8. Оценка процессов микроциркуляции.....	67
2.4.9. Определение ферментов антиоксидантной системы.....	69
2.4.10. Оценка системы гемостаза.....	69
2.4.11. Статистическая обработка экспериментальных данных.....	71

ГЛАВА 3. ИЗУЧЕНИЕ ТОКСИЧНОСТИ И ДЕРМАТОТРОПНОГО ДЕЙСТВИЯ МЕТАЛЛОКОМПЛЕКСОВ ЦИНКА ПРОИЗВОДНЫХ N-АЛКЕНИЛИМИДАЗОЛОВ.....	72
3.1. Оценка токсичности металлокомплексов цинка производных N-алкенилимидазолов	72
3.1.1. Оценка токсичности металлокомплексов цинка производных N-алкенилимидазолов при накожном нанесении.....	72
3.1.2. Оценка острой токсичности металлокомплексов цинка производных N-алкенилимидазолов при внутрибрюшинном введении.....	72
3.2. Сравнительное изучение ранозаживляющего действия металлокомплексов цинка производных N-алкенилимидазолов.....	73
3.2.1. Оценка ранозаживляющего действия на модели неинфицированной линейной раны.....	73
3.2.2. Оценка ранозаживляющего действия на модели неинфицированной плоскостной раны.....	76
3.3. Сравнительное изучение активности металлокомплексов цинка производных N-алкенилимидазолов на модели контактного дерматита.....	78
ГЛАВА 4. ИЗУЧЕНИЕ ПРОТИВОМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ МЕТАЛЛОКОМПЛЕКСОВ ЦИНКА ПРОИЗВОДНЫХ N-АЛКЕНИЛИМИДАЗОЛОВ.....	82
4.1. Изучение бактерио- и фунгистатической активности комплексных соединений цинка производных N-алкенилимидазолов в опытах <i>in vitro</i>	83
4.2. Изучение антибактериального действия комплексов цинка производных N-алкенилимидазолов на раневой модели моноинфекции, вызванной <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Ts 38-16.....	84
4.2.1. Оценка антибактериального действия Пилима-1 и Аллила <i>in vitro</i>	85
4.2.2. Оценка антибактериального действия Пилима-1 и Аллила на модели раневой моноинфекции <i>in vivo</i> , вызванной <i>P. aeruginosa</i> Ts 38-16.....	85

ГЛАВА 5. ГИСТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ДЕРМАТОТРОПНОГО ДЕЙСТВИЯ МЕТАЛЛОКОМПЛЕКСОВ ЦИНКА ПРОИЗВОДНЫХ N-АЛКЕНИЛИМИДАЗОЛОВ.....	92
5.1. Гистоморфологические исследования раневых отпечатков.....	92
5.1.1. Раневые биоптаты неинфицированной линейной раны.....	92
5.1.2. Раневые биоптаты неинфицированной плоскостной раны.....	103
5.1.3. Раневые биоптаты плоскостной раны при моноинфекции.....	111
5.2. Гистоморфологический анализ кожных биоптатов при контактном дерматите.....	118
ГЛАВА 6. МАТЕРИАЛЫ К ВОЗМОЖНОМУ МЕХАНИЗМУ ДЕРМАТОТРОПНОГО ДЕЙСТВИЯ МЕТАЛЛОКОМПЛЕКСОВ ЦИНКА ПРОИЗВОДНЫХ N-АЛКЕНИЛИМИДАЗОЛОВ.....	120
6.1. Влияние Пилима-1 на микроциркуляцию крови.....	121
6.2. Влияние Пилима-1 на активность пероксидазы и каталазы.....	124
6.3. Влияние Пилима-1 на показатели гемостаза.....	125
ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	127
ВЫВОДЫ.....	132
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	134
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	136
ПРИЛОЖЕНИЕ А.....	166
ПРИЛОЖЕНИЕ Б.....	171
ПРИЛОЖЕНИЕ В.....	173

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Несмотря на значительный многообещающий прорыв в трансляционных исследованиях, последних инновациях и научных открытиях в дерматологии, поиск лекарственных средств (ЛС), ускоряющих регенеративные и репаративные процессы в коже, остается особенно актуальным. Разработка и внедрение в практическую медицину препаратов на основе координационных соединений жизненно важных микроэлементов с достаточно высокой активностью лигандной системы, упрощающей реализацию физиологического воздействия лекарственного вещества (ЛВ) на молекулярном уровне, является перспективным направлением.

Многообещающими являются комплексы цинка с производными N-алкенилимидазолов, так как имидазол и эссенциальные микроэлементы выступают в качестве структурных фрагментов многих природных физиологически активных соединений, играющих важную роль в биологических процессах. Одним из положительных и эффективных способов и направлений разработки новых фармакологически активных веществ с широким спектром действия и низкой токсичностью, является комплексообразование биометаллов с известными органическими соединениями. Изучение биологической активности таких металлокомплексов является важной задачей и может служить теоретической основой для целенаправленного синтеза веществ с заданными свойствами.

Несмотря на то, что соединения цинка являются важным компонентом косметической продукции [71], применяемые в настоящее время препараты цинка, в частности, Цинк пиритион, Цинка оксид, Цинка сульфат оказывают токсическое действие и недостаточно эффективны вследствие слабого усвоения, что значительно ограничивает их применение и подчеркивает актуальность поиска новых более эффективных и безопасных препаратов.

Степень разработанности темы исследования

Цинк входит в состав около 3000 белков и ферментных систем и является наиболее важным эссенциальным микроэлементом, регулирующим множество метаболических путей в организме человека [120]. Ему принадлежит важная роль в синтезе белков и нуклеиновых кислот, процессах роста и деления клеток, стабилизации и проницаемости клеточных и внутриклеточных мембран, формировании антиоксидантного статуса. Этот микроэлемент оказывает значительное влияние на иммунную систему, процессы апоптоза, остеогенеза, гемопоэза, пролиферации клеток, клеточного дыхания [144; 174].

Известно, что цинк, поступающий в организм с пищей, распределяется преимущественно в скелетных мышцах, костях, коже, печени [155; 223]. Имеются сведения, что цинк участвует в дифференциации и пролиферации эпидермиса, а дефицит этого микроэлемента приводит к развитию некролитической мигрирующей эритемы, пеллагры, алопеции, а также является причиной труднозаживающих ран, пролежней, язв кожи [110; 155; 184].

Участие цинка в процессах миграции, пролиферации и дифференцировки кератиноцитов, его противовоспалительная и противомикробная активность, мембраностабилизирующие свойства [143], а также важная физиологическая роль имидазола позволяют предположить наличие дерматотропного действия у комплексов цинка производных N-алкенимидазолов. В качестве перспективных нами было исследовано шесть оригинальных соединений¹.

Цель и задачи исследования

Изучение дерматотропных свойств комплексов цинка производных N-алкенилимидазолов и обоснование перспективности их разработки в качестве

¹Вещества синтезированы в лаборатории непредельных гетероатомных соединений Иркутского института химии имени А.Е. Фаворского СО РАН под руководством академика РАН, доктора химических наук, профессора Б.А. Трофимова и любезно предоставлены нам для исследования, за что выражаем глубокую признательность.

эффективных ранозаживляющих средств.

1. Оценить безопасность комплексов цинка производных N-алкенилимидазолов при нанесении на кожу крыс и при внутрибрюшинном (в/б) введении мышам.

2. Изучить ранозаживляющее действие комплексов цинка производных N-алкенилимидазолов и референтных средств: Цинка сульфата, Солкосерила[®], Метилурацила[®] на моделях линейной и плоскостной неинфицированной раны у крыс.

3. Оценить в сравнительном аспекте с референтным препаратом Акридерм[®] противоаллергическую и противовоспалительную активность комплексов цинка производных N-алкенилимидазолов на модели контактного дерматита (КД) у крыс.

4. Изучить противомикробное действие соединений-лидеров *in vitro* и на модели инфицированной кожной раны *in vivo*.

5. Провести гистоморфологический анализ кожных биоптатов.

6. Изучить возможные пути механизма ранозаживляющего действия комплекса цинка с наиболее выраженным эффектом.

7. На основании полученных экспериментальных данных дать рекомендации по дальнейшему изучению комплексов цинка производных N-алкенилимидазолов в качестве дерматотропных средств.

Научная новизна

Впервые изучена токсичность при нанесении на кожу крыс 1% гелей на основе натрий-карбоксиметилцеллюлозы (Na-КМЦ) шести комплексов цинка производных N-алкенилимидазолов и установлена полулетальная доза (LD₅₀) для мышей при в/б введении двух новых, ранее не изученных комплексов цинка.

В сравнении с референтными препаратами проведена оценка ранозаживляющего и противоаллергического действия 1% гелей на основе Na-КМЦ шести комплексов цинка и проведен гистоморфологический анализ

биоптатов кожи. Показано, что исследованные соединения обладают выраженными регенерирующими свойствами на моделях линейной и плоскостной раны у крыс. Противомикробное действие двух комплексов цинка под шифрами Пилим-1 и Аллил с наиболее выраженным ранозаживляющим действием впервые изучено на культурах бактериальных клеток *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) 209-P, *Escherichia coli* (*E. coli*) ATCC 25922, *Proteus vulgaris* (*Pt. vulgaris*) ATCC 6896, *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) ATCC 9027 и патогенных грибов *Candida albicans* (*C. albicans*) ATCC 10231 и *Microsporium canis* (*M. canis*) 352, а также на модели раневой моноинфекции у мышей, вызванной полирезистентным штаммом *P. aeruginosa* Ts 38-16. Впервые изложены возможные пути механизма ранозаживляющего действия Пилима-1 и сделано предположение, что оно может реализовываться через систему гемостаза, активацию антиоксидантной защиты, оптимизацию процессов микроциркуляции крови и устранения гипоксии тканей.

Теоретическая и практическая значимость работы

В результате исследования получены новые данные дерматотропного действия комплексов цинка производных N-алкенилимидазолов, что вносит вклад в понимание патогенеза раневых и воспалительных заболеваний кожи и роли цинка в данных процессах. Практическая значимость диссертационного исследования заключается в возможности разработки на основе изученного комплекса цинка Пилима-1 нового эффективного и безопасного ранозаживляющего ЛС, а также в использовании полученных результатов в учебном процессе, что подтверждается соответствующим актом внедрения.

Методология и методы исследования

Методология проведенного диссертационного исследования основана на теоретических и практических подходах отечественных и зарубежных авторов, освещенных в научной литературе.

Дизайн исследования планировался с учетом рекомендаций по проведению доклинических исследований и одобрен Локальным Комитетом по этике ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (протокол № 03-23 от 16.02.2023 г.).

Положения, выносимые на защиту

1. Комплексы цинка производные N-алкенилимидазолов являются нетоксичными веществами, проявляющими ранозаживляющее действие на моделях неинфицированных кожных ран у крыс. Наиболее выраженным ранозаживляющим эффектом обладают производные N-изопропенилимидазола и N-аллилимидазола под шифрами Пилим-1 и Аллил соответственно.

2. Среди изученных металлокомплексов цинка производных N-алкенилимидазолов не выявлены вещества, обладающие противоаллергическим и противовоспалительным эффектом на модели КД у крыс.

3. Установленное *in vitro* противомикробное действие Пилима-1 и Аллила превышало активность субстанций Метронидазола и Цинка сульфата.

4. Гистологические образцы кожи животных, получавших аппликации 1% геля Пилима-1, демонстрируют более выраженное ранозаживление неинфицированных ран, а при раневой моноинфекции у мышей сопоставимы с референтным препаратом Левомеколь®.

5. Ранозаживляющий эффект Пилима-1 может быть обусловлен антигипоксической и антиоксидантной активностью, а также улучшением реологических показателей крови и процессов микроциркуляции.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертационное исследование соответствует паспорту научной специальности 3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология, а именно п. 3, 5, 7.

Степень достоверности и апробация результатов

Диссертационная работа выполнена на современном научно-методическом уровне с использованием методик, адекватных цели и задачам. При проведении экспериментальной работы использовано современное оборудование, методами статистической обработки установлена воспроизводимость и правильность результатов исследований, что позволяет считать их достоверными. Данные, полученные автором, обработаны с применением пакетов прикладных компьютерных программ Microsoft Excel XP в среде Windows XP, STATISTICA 10.0, GraphPad Prism 9.3.1. (StatSoft Inc, США). Научные положения, выводы и рекомендации, сформулированные в диссертационной работе, обоснованы, логично вытекают из полученных автором результатов и не противоречат данным, представленным в независимых источниках по данной тематике. Первичная документация полностью соответствует материалам, содержащимся в работе.

Результаты и основные положения диссертации доложены и обсуждены на V Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Безопасность фармакотерапии: NOLI NOCERE!» (Москва, 2022 г.), конференции ученых Института фармации имени А.П. Нелюбина и Института профессионального образования ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова (Сеченовский Университет) Минздрава России (протокол № 3 от 13.10.2023 г.). Результаты диссертационного исследования внедрены в учебный процесс кафедры фармакологии Института фармации имени А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова (Сеченовский Университет) и используются при изучении дисциплин: «Фармакология», «Основы доклинических исследований», «Фармацевтическое информирование», «Методы экспериментального изучения молекулярных основ действия лекарственных средств», читаемых студентам по направлению подготовки 33.05.01. Фармация (Акт № 000304 от 28.09.2023 г.).

Личный вклад автора

Автору принадлежит главная роль в разработке дизайна исследования, постановке цели и поиске методологических подходов для ее достижения. Углубленное изучение отечественной и зарубежной литературы по теме диссертации, анализ и обобщение полученных результатов позволили автору сформулировать выводы и дать практические рекомендации по дальнейшему изучению комплексных соединений цинка производных N-алкенилимидазолов.

Автор принимал активное участие в планировании и выполнении экспериментов, систематизации и описании полученных результатов, их статистической обработке, формулировании выводов. Определяющим является его вклад в подготовку научных публикаций, внедрение в практику результатов исследования. Написание и оформление диссертации выполнено лично автором.

Публикации по теме диссертации

По теме диссертации опубликовано 6 научных работ, из них – 4 научных статьи в зарубежных журналах, индексируемых в международной базе SCOPUS; 1 научная статья – иная; 1 статья – материалы всероссийской конференции.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 174 страницах машинописного текста, включает введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, экспериментальную часть, обсуждение полученных результатов и заключение, выводы, список литературы, приложения. Работа иллюстрирована 61 рисунком и 14 таблицами. Библиография включает 245 источников литературы, из которых 70 отечественных и 175 зарубежных.

ГЛАВА 1. ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ДЕРМАТОТРОПНОГО ДЕЙСТВИЯ ЦИНКА КАК ЭССЕНЦИАЛЬНОГО МИКРОЭЛЕМЕНТА

1.1. Биологическая роль цинка

Цинк выступает важным компонентом всех клеток организма благодаря своим структурным, каталитическим и сигнальным функциям. Это второй после железа по распространенности в организме человека элемент, встречающийся во всех органах, тканях, жидких средах и секретах в относительно высоких концентрациях. Поступающий с пищей цинк всасывается в тонком кишечнике и распределяется в организме следующим образом: скелетные мышцы – 60%, кости – 30%, кожа – 5%, другие ткани – 5%.

Эссенциальная роль цинка определяется взаимодействием примерно с 3000 белков, играющих незаменимую роль в процессах транскрипции, апоптоза, репарации ДНК, регуляции экстрацеллюлярного матрикса (ЭЦМ), антиоксидантной защиты [120; 157; 192; 245]. Большая часть этих белков – транскрипционные факторы с особым доменом «цинковый палец» [69; 122; 133; 164; 229]. Цинковый палец – тип белковой структуры, стабилизированный одним или двумя ионами цинка, связанными координационными связями с аминокислотными остатками. Как правило, цинковый палец включает около 20 аминокислот, ион цинка связывает по две молекулы гистидина и цистеина. Подавляющее количество цинка в организме входит в состав белковых структур, в то время как с низкомолекулярными лигандами соединяется незначительная часть. Структурная роль цинка в составе более 300 энзимов, включая карбоангидразу, щелочные фосфатазы, каталазу, карбоксипептидазы и дегидрогеназы, лиазы, миело- и тиреопероксидазы, фосфотрансферазы, цитохромы дыхательной цепи, ДНК- и РНК-полимеразы, определяет его как незаменимый участник многих биохимических процессов [69; 86; 131; 231]. Цинк стимулирует синтез металлотioneинов (МТ), являющихся защитными белками клетки [21; 69; 164], входит в структуру супероксиддимуатазы (СОД), что объясняет его

антиоксидантное и мембраностабилизирующее действие, предотвращающее перекисное окисление липидов (ПОЛ) и повреждение мембран клеток [69].

Имеющиеся в литературных источниках данные позволяют утверждать, что цинк обладает противовоспалительными, антиоксидантными, антимикробными, иммуномодулирующими и себосупрессивными свойствами [79; 168; 113; 166]. Было показано, что добавки цинка у пожилых людей снижают уровень окислительного стресса в плазме крови, а также уменьшают выработку провоспалительных цитокинов [166].

Кроме того, цинк может действовать как нейромедиатор, выполняя функцию быстрой сигнализации [140]. При возбуждении ионы цинка доставляются в синаптическую щель нейронов вместе с глутаматом и взаимодействуют с рецепторами NMDA и AMPA для модуляции их активности [126]. Он также может выступать в качестве модулятора ингибирующей нейротрансмиссии, воздействуя на нервные импульсы, опосредованные ГАМК и глицином.

Цинк участвует в синтезе, хранении и секреции инсулина в β -клетках поджелудочной железы и влияет на его активность [179]. Показано, что нарушение гомеостаза этого микроэлемента приводит к повышенному риску развития сахарного диабета (СД) 2 типа [69; 104; 200; 234]. С другой стороны, вследствие сниженного всасывания цинка в кишечнике и повышенной экскреции почками у больных СД развивается цинкдефицитное состояние [69; 82].

Роль цинка в иммунном статусе связана с участием в функционировании тимуса и формировании Т-клеточного иммунитета [69]. В настоящее время описано влияние цинка на дифференцировку и активацию иммунных клеток, активно обсуждается связь цинка с аутоиммунными реакциями и раком как заболеваниями с повышенным или сниженным иммунным ответом [188; 216; 240]. В настоящее время показано, что цинк может участвовать в дифференцировке моноцитов в провоспалительные и иммунорегуляторные и ранозаживляющие макрофаги, участвующие в подавлении иммунитета и последующем ремоделировании тканей [95].

Цинк является неотъемлемым компонентом многих вирусных ферментов, протеаз и полимераз, что подчеркивает важность регулирования клеточного и системного распределения цинка для подавления репликации и диссеминации вируса [203]. Так, более 40 лет назад было продемонстрировано ингибирующее действие цинка на жизненный цикл вируса герпеса 1 и 2 типа [102], а позднее – в отношении вирусов энцефаломиелита, полиомиелита, Коксаки, энтеро- и риновирусов [79; 168].

В клиническом исследовании (ClinicalTrials.gov, [NCT05212480](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT05212480)) было показано, что прием цинка внутрь больными с COVID-19 снижает 30-дневную смертность, частоту госпитализаций в отделения интенсивной терапии и сокращает продолжительность симптомов инфекции [209]. Также в настоящее время представлены исследования, демонстрирующие участие цинка и цинкзависимых белков в иммунной регуляции в дыхательных путях, а также связь между цинком и острым респираторным дистресс-синдромом [222].

Цинк входит в состав алкогольдегидрогеназы, поэтому цинкдефицитные состояния являются одной из причин предрасположенности к алкоголизму. Цинк участвует в процессах кроветворения, облегчает элиминацию из организма двуокиси углерода и выведение солей тяжелых металлов и т.д. Недостаток этого элемента может приводить к развитию многочисленных тяжелых патологий: ишемической болезни сердца (ИБС), атеросклероза, гепатита, заболеваний кожи, легких, деструктивных изменений тканей пародонта, болезни Паркинсона [69; 167; 221].

Разрушительные эффекты, которые может иметь цинк, когда его концентрация превышает нормальный физиологический уровень, хорошо изучены. В то же время дефицит цинка вызывает различные нарушения у людей и животных: задержку роста, иммунные и эндокринные дисфункции, диарею и кожные заболевания, в том числе энтеропатический акродерматит [195]. По этой причине следует учитывать важность поддержания внутриклеточного гомеостаза цинка. Концентрация свободного цитозольного цинка должна быть достаточно высокой, чтобы сайты связывания на металлопротеинах оставались занятыми, но

не настолько, чтобы цинк вытеснял из соответствующих белков биологически значимые двухвалентные катионы с более низкой аффинностью, такие, как никель или кобальт.

1.2. Роль цинка в процессах регенерации и репарации кожи

Целостность кожи играет ключевую роль в поддержании физиологического гомеостаза, жизнеспособности и функционировании внутренних органов. Роль цинка в процессах восстановления кожных покровов не вызывает сомнений, однако, до конца не изучена.

Кожа человека содержит около 5% цинка от его общего количества в организме, уступая только мышечным волокнам и костной ткани [195]. В связи с этим, этот микроэлемент играет крайне важную роль в физиологии кожи и ее придатков. Дефицит цинка и нарушения его метаболизма являются патогенетическим звеном многих кожных болезней [30; 138; 166; 244; 184; 189], а также причиной замедления репаративных и регенеративных процессов [123], в том числе, заживления ран [232]. В настоящее время показана роль цинка при ожоговой травме [127; 202], подкожном абсцессе, хирургических вмешательствах [226], пролежнях [110; 163]. При изучении изменений метаболизма цинка во время ранозаживления в коже мышей показано, что он накапливается в раневой поверхности после увеличения экспрессии МТ [232]. Однако механизмы, с помощью которых цинк проявляет свою активность, остаются неизученными.

В течение первых суток после получения травмы содержание цинка в ране увеличивается на 15-20%, достигая своего максимума 30% в период интенсивного формирования грануляционной ткани и пролиферации эпидермиса (с 8 ч после нанесения раны до 3 суток), что может свидетельствовать о влиянии цинка на пролиферацию и дифференцировку кератиноцитов [30]. Это можно объяснить рекрутированием клеток с высоким содержанием ионов цинка, включая эритроциты, нейтрофильные лимфоциты и тромбоциты, благодаря чему ионы цинка доставляются в места повреждения сосудов [75]. В поздние стадии

заживления происходит снижение содержания цинка, что, возможно, связано с уменьшением митотической активности и созреванием рубцовой ткани [30; 232].

Учитывая, что многокомпонентный механизм ранозаживления контролируется многодоменными цинксодержащими металлопротеиназами [125], интересен тот факт, что в пролиферирующих клетках наблюдается накопление цинка, в поставке которого важную роль играет эпидермальная металлопротеиназа [185].

Для более полного понимания роли цинка в процессах регенерации и репарации кожи следует остановиться на патофизиологии раневого процесса, а также молекулярных и клеточных механизмах заживления ран.

1.2.1. Патофизиология раневых процессов

Раной называют нарушение анатомической целостности кожи или слизистых покровов с возможным повреждением более глубоко лежащих тканей вследствие механического воздействия [30].

Заживление раны, или раневой процесс, включает несколько фаз, последовательно сменяющих друг друга: гемостаз, воспаление, пролиферацию и ремоделирование.

Повреждение сосудов в области раны активирует процессы свертывания крови и запускает фазу воспаления, которая длится около 5 дней. Выделение фактора эндотелия сосудов (VEGF) повышает проницаемость сосудистой стенки, что приводит к развитию первичного отека, который затем сменяется на вторичный вследствие увеличения онкотического и осмотического давления в тканях, а также перераспределения жидкости в межклеточное пространство.

Фаза воспаления направлена на то, чтобы избежать физиологических нарушений, сначала – путем восстановления гемостаза, противодействуя любым патогенам, затем – начав восстановление поврежденного участка. С прогрессированием реэпителизации фаза воспаления снижается.

Фаза пролиферации состоит из двух основных процессов: эпителизации, включающей пролиферацию кератиноцитов и миграцию поверх раневого ложа, и грануляции, включающей фибробласты, которые пролиферируют, мигрируют и синтезируют компоненты внеклеточного матрикса. В фазу грануляции фибробласты индуцируются для миграции в фибриновый сгусток. Оказавшись там, они пролиферируют и синтезируют коллаген III типа и фибронектин [17; 21]. Эта модификация позволяет осуществлять клеточную миграцию кератиноцитов в грануляционную ткань. Длится фаза пролиферации 6-14 дней и заканчивается заполнением полости раны новообразованной тканью.

Фаза ремоделирования направлена на замену грануляционной ткани более здоровой кожей. Этот процесс занимает очень много времени (до 6 месяцев) по сравнению с другими фазами. Полученный шрам соответствует физическим и физиологическим свойствам неповрежденной кожи. Эта фаза наступает тогда, когда эпидермис полностью регенерирует. Завершающий этап заживления раны восстанавливает непроницаемость кожного барьера путем реэпителизации [205].

В зависимости от размера и причины возникновения раны заживление может осуществляться первичным или вторичным натяжением [66].

Заживление первичным натяжением происходит при повреждении только эпителиального слоя кожи и включает три стадии: воспаление, пролиферацию эпителиальных клеток и созревание соединительной ткани рубца. Сразу после нанесения раны активизируются коагуляционные процессы и происходит формирование сгустка из эритроцитов, фибрина, фибронектина, белков системы комплемента. Этот сгусток служит барьером, останавливающим кровотечение, а также миграцию клеток, вызванную выделением факторов роста, цитокинов и хемокинов в месте повреждения кожи. После высыхания внешней поверхности сгустка крови происходит образование струпа [30; 143].

На первом этапе также увеличивается проницаемость стенок сосудов, что приводит к отеку окружающих тканей. В течение следующих 24 ч на краях раны скапливаются нейтрофилы вследствие миграции к образовавшемуся фибриновому сгустку. Протеолитические ферменты, которые они выделяют, очищают рану от

клеточного детрита. Через 24-48 ч после нанесения раны начинаются процессы миграции и пролиферации эпителиальных клеток по поверхности дермы, вследствие чего образуются компоненты базальной мембраны. После этого клетки эпителия перемещаются на среднюю линию образующегося струпа, формируя тонкий, но непрерывный слой, который закрывает рану [30; 143].

На третьи сутки происходит замещение нейтрофилов макрофагами, грануляционная ткань начинает проникать в область раны, коллагеновые волокна становятся хорошо различимыми, а продолжающиеся процессы эпителизации ведут к восстановлению нормальной толщины эпидермиса. Основными клеточными компонентами, которые осуществляют процессы репарации тканей, очищения от экстрацеллюлярного детрита, фибрина, инородных компонентов, а также способствуют ангиогенезу и формированию внеклеточного матрикса, являются макрофаги. Эти клетки выделяют хемокины, фактор некроза опухолей (TNF), тромбоцитарный фактор роста (PDGF), трансформирующий ростовой фактор (TGF- β), фактор роста фибробластов (FGF), интерлейкин-1 (IL-1), под влиянием которых происходит миграция и последующая пролиферация фибробластов в рану. Фибробласты продуцируют белки ЭЦМ, а также волокна коллагена. После дифференциации поверхностных клеток начинается процесс образования эпидермиса с кератинизацией его поверхности. По мере заполнения пространства раны грануляционной тканью активно протекает процесс неоваскуляризации, который к пятым суткам достигает своего пика. Вследствие высокой проницаемости новообразовавшихся сосудов белки плазмы крови и жидкость переходят в экстравазкулярное пространство и вызывают отек [30; 143].

В течение второй недели продолжается процесс аккумуляции коллагена и пролиферации фибробластов. На фоне уменьшения инфильтрации области раны лейкоцитами спадает отек, а также уменьшается процесс васкуляризации. В процессе накопления волокон коллагена внутри образующегося рубца, а также снижения количества сосудов, рана начинает выглядеть белее.

К концу первого месяца заживления раны рубец состоит из соединительной ткани, покрытой нормальным эпидермисом. Однако любые придатки кожи,

разрушенные в процессе нанесения раны, теряются по всей длине раны. С течением времени происходит увеличение механической устойчивости образовавшегося рубца на растяжение [30; 143].

При *заживлении вторичным натяжением* наблюдается гораздо более выраженная воспалительная реакция, что приводит к образованию большего количества грануляционной ткани, аккумуляции ЭЦМ и формированию обширного рубца, а также стягиванию раны под действием миофибробластов.

Для вторичного натяжения ран характерны следующие отличительные черты:

1) массивный сгусток фибрина, а также большое количество экссудата и некротического детрита, что приводит к выраженному процессу воспаления и повышению вероятности возникновения вторичных повреждений, ассоциированных с воспалительной реакцией.

2) потребность в большем объеме грануляционной ткани для заполнения пустот и формирования необходимой структуры для процесса роста эпителия вследствие дефицита тканей, в результате чего размер рубца будет больше.

3) в начале процесса вторичного натяжения временный матрикс содержит в своем составе фибрин, фибронектин, коллаген III типа, но к концу второй недели происходит замещение временного матрикса коллагеном I типа.

В дальнейшем первоначальная грануляционная ткань превращается в бледный, аваскулярный рубец, состоящий из веретенообразных фибробластов, коллагена высокой плотности, фрагментов эластичных волокон и других компонентов ЭЦМ. Все кожные придатки, поврежденные во время нанесения раны, теряются. Эпидермис восстанавливает свою нормальную толщину и строение. К концу первого месяца рубец, состоящий из ацеллюлярной соединительной ткани, полностью очищается от воспалительных инфильтратов и покрывается интактным эпидермисом [30; 143].

Процесс стягивания раны позволяет сократить разрыв между краями дермы и уменьшить площадь открытой поверхности раны. На начальном этапе наблюдается процесс формирования сети миофибробластов на краях раны,

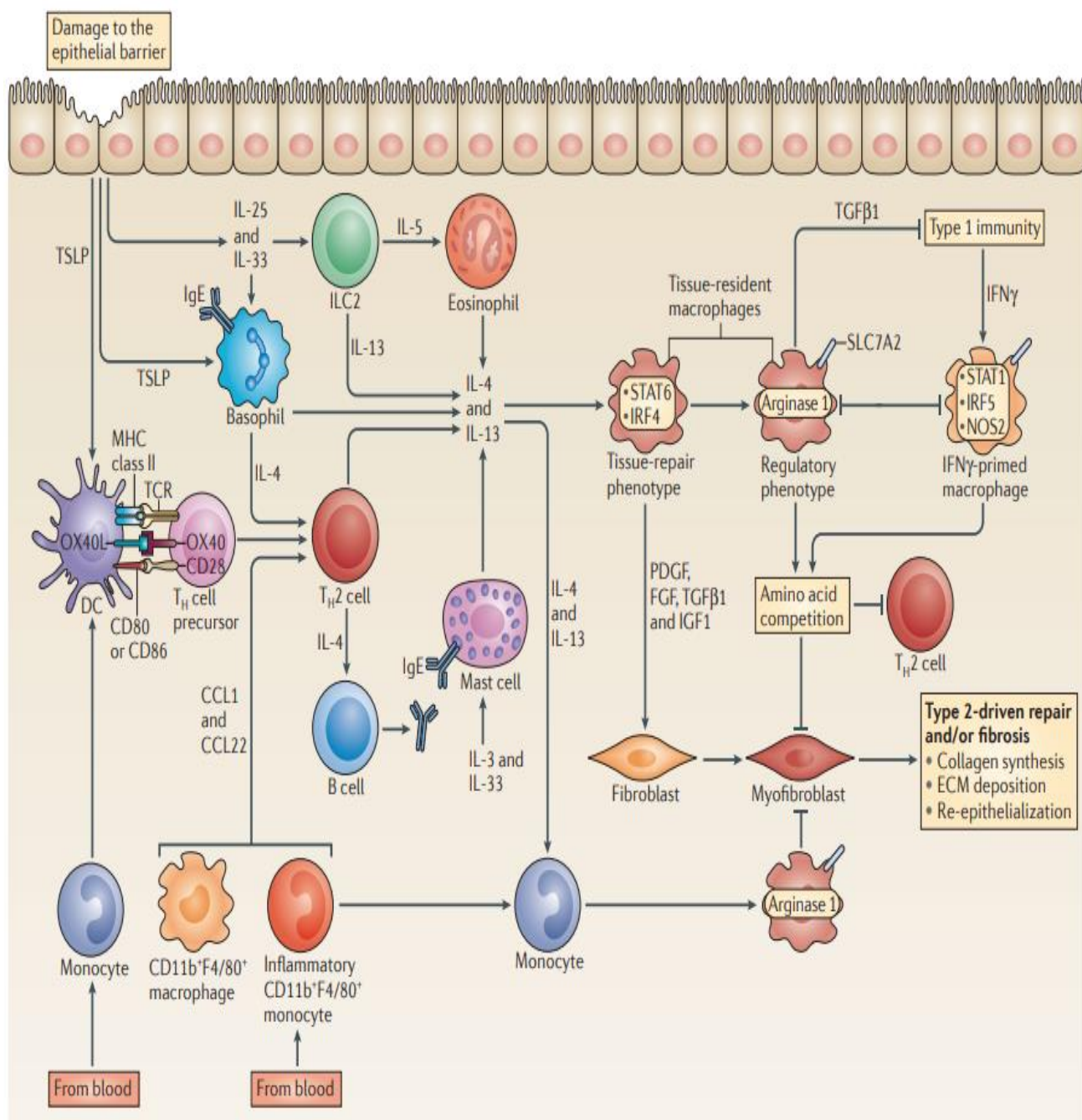
которые по ультраструктуре и исполняемым функциям напоминают гладкомышечные клетки. Фибробласты играют основную роль в процессе заживления раны. Во-первых, в ответ на образование раны, они начинают процесс пролиферации и хемотаксиса к месту ранения для образования ЭЦМ и создания необходимых условий для процесса регенерации тканей. Кроме того, фибробласты могут преобразовываться в миофибробласты и, таким образом, стягивать рану, запечатывая ее, в ответ на потерю тканей. Фибробласты также играют важную роль в образовании кровяного сгустка путем продукции урокиназного активатора плазминогена и его ингибиторов, а также экспрессируют рецепторы, активируемые протеазами (PAR1), что позволяет им реагировать на активированный тромбин [118].

1.2.2. Роль клеточных компонентов в процессе заживления раны

Травма вызывает переход компонентов крови в область раны и высвобождение вазоактивных факторов, запускающих каскадный процесс свертывания крови. Гемостаз, вызванный коагуляцией, обеспечивает основу для воспалительной фазы заживления раны и формирования тканей. Гемостатическая пробка создает матрицу, в которую мигрируют эффекторные клетки и компоненты ЭЦМ. Как известно, решающее значение для гемостаза и высвобождения факторов роста и провоспалительных цитокинов, играют тромбоциты. В течение нескольких часов после травмы в область раны проникают также моноциты и макрофаги [101].

После нанесения раны подается сигнал тревоги при помощи тимусного стромального лимфопоэтина (TSLP), IL-25, IL-33, дендритных клеток, что активирует иммунные реакции. CD11b(+), F4/80(+) макрофаги и воспалительные моноциты помогают обеспечивать иммунный ответ в поврежденных тканях путем продукции хемокинов, таких как CCL1 (C-C motif ligand 1) и CCL2 (C-C motif ligand 2), которые притягивают в область раны Т-хелперы. IL-4 и IL-13, продуцируемые клетками CD4⁺ Т-хелперов 2, IL2 (врожденные лимфоидные

клетки 2 группы), базофилами, тучными клетками и эозинофилами, стимулируют макрофаги, расположенные в близлежащих тканях, а также вызывают пролиферацию и дифференциацию в макрофаги расположенных рядом воспалительных моноцитов (Рисунок 1.1).



Примечание: FGF – фактор роста фибробластов; IGF1 – инсулиноподобный фактор роста 1; IRF – регуляторный фактор интерферона; OX40L – лиганд рецептора CD134 (OX40) (также известный как TNFSF4); PDGF – тромбоцитарный фактор роста; STAT, сигнальный белок и активатор транскрипции; TCR – рецептор к Т-хелперам

Рисунок 1.1 – Участие цитокинов в процессе заживления раны [218]

Эти макрофаги имеют два фенотипа: ранозаживляющий и регуляторный. Ранозаживляющая популяция макрофагов активируется ИЛ-4 и/или ИЛ-13 и продуцирует широкий спектр факторов роста, которые способствуют пролиферации, дифференциации, а также активации близлежащих фибробластов, вместе с тем, способствуя процессам репарации эпителиальных и эндотелиальных клеток.

Однако, ИЛ-4 и/или ИЛ-13, активированные макрофаги могут подавлять активность миофибробластов путем конкуренции за аминокислоты: L-аргинин, L-орнитин и L-глутамат, которые регулируют синтез L-пролина в расположенных рядом миофибробластах. L-пролин необходим для синтеза миофибробластами компонентов ЭЦМ.

Конкуренция за аминокислоты между макрофагами и Т-хелперами 2 может улучшать иммунный ответ из-за уменьшения пролиферации Т-хелперов. Схожая ситуация наблюдается с макрофагами M1, продуцирующими iNOS2 (индуцируемая синтаза оксида азота 2), которые могут замедлять процессы репарации тканей и фиброза путем уменьшения количества L-аргинина в пространстве раны, а также путем снижения популяции Т-хелперов. Однако, в течении процесса иммунного ответа 2 типа, TGFβ1, продуцируемый макрофагами, подавляет иммунный ответ 1 типа и развитие макрофагов, активирующихся интерфероном гамма (IFN-γ). Поэтому именно макрофаги, активирующиеся ИЛ-4 и/или ИЛ-13, являются доминантным видом миелоидных супрессорных клеток в течение иммунного ответа 2 типа.

Существуют убедительные доказательства того, что воспалительная реакция способствует выделению факторов роста, а также передаче сигналов цитокинов, которые управляют клеточным и тканевым движением. Кроме того, появляется все больше доказательств того, что различные подгруппы лейкоцитов проявляют специфические, прямые и непрямые функции по ремоделированию сосудов во время репарации раны [101; 135].

Вскоре после образования гемостатической пробки, полиморфноядерные лейкоциты (нейтрофилы, PMN), активированные провоспалительными

цитокинами (IL-1 β , TGF- α , IFN- γ), мигрируют через стенку капилляров к участку раны, что приводит к высвобождению веществ различных классов, обеспечивающих эндотелиальную адгезию, которые необходимы для диапедеза лейкоцитов.

Основная функция нейтрофилов – это санация омертвевшей ткани и фагоцитоз инфекционных агентов. Для выполнения этой задачи нейтрофилы выделяют большое разнообразие антимикробных веществ, например, активных форм кислорода (АФК), катионных пептидов, эйкозаноидов и протеаз (эластаза, катепсин G, протеиназа 3 (PR-3), активатор плазминогена урокиназного типа (uPA) [214]. Кроме того, было показано, что нейтрофилы являются важным источником проангиогенных факторов, в том числе VEGF-A и IL-8 [105; 183; 211].

Гемостаз вызван утечкой компонентов крови и вазоактивных факторов в область раны. Гемостатическая пробка состоит из тромбоцитов и молекул ЭЦМ (фибронектин, витронектин), которые облегчают инвазию и миграцию эндотелиальных клеток. Приток PMN и макрофагов характеризует воспалительную фазу восстановления; различные группы лейкоцитов высвобождают ангиогенные факторы роста и провоспалительные цитокины, которые контролируют миграцию воспалительных и эндотелиальных клеток в области раны. Во время формирования грануляционной ткани активированные макрофаги, а также эндотелиальные клетки и фибробласты образуют функциональную единицу, необходимую для эффективного роста кровеносных сосудов. Фибробласты образуют временный матрикс раны, состоящий из гликозаминогликанов, протеогликанов, коллагена III, тромбоспондина, фибронектина и витронектина, которые способствуют образованию эндотелиальной трубки и росту сосудов. Преобразование грануляционной ткани в рубцовую ткань характеризуется регрессией капилляров и дифференциацией новообразованных кровеносных сосудов в зрелые сосудистые структуры. Этот процесс связан с уменьшением воспаления, присутствием миофибробластов и замещением временного раневого матрикса в коллагеновый.

Если стимулы, вызывающие миграцию нейтрофилов, не сохраняются в области раны, инфильтрация нейтрофилами прекращается через несколько дней. Сами нейтрофилы фагоцитируются макрофагами, которые присутствуют в области раны в течение 2 дней после травмы. Несмотря на присутствие резидентных макрофагов, их основная часть мигрирует в область раны из крови. Инфильтрация макрофагов строго регулируется градиентом различных хемотаксических факторов, включая факторы роста, провоспалительные цитокины и хемокины [215].

Основными источниками этих хемоаттрактантов в области раны являются тромбоциты, включенные в фибриновый сгусток на раневой поверхности, гиперпролиферативные кератиноциты, различные группы фибробластов и лейкоцитов. Когда моноциты мигрируют из кровеносного сосуда, они активируются и дифференцируются в зрелые макрофаги, что предполагает существенное изменение в активации фенотипа макрофагов. Существуют доказательства того, что процесс активации направляется посредниками, присутствующими в микросреде, которая имеет решающее значение для правильной адаптации функции макрофагов к определенным метаболическим потребностям в области раны [172]. Помимо их иммунологических функций в качестве антигенпрезентирующих клеток и фагоцитов, макрофаги, как полагают, играют неотъемлемую роль в успешном заживлении раны путем синтеза многочисленных факторов роста, например, TGF- β , TGF- α , PDGF, VEGF, способствующих ангиогенезу, пролиферации клеток и синтезу веществ резидентными клетками кожи.

Проангиогенный потенциал макрофагов был продемонстрирован более чем четыре десятилетия назад [72], и их решающая роль в раневом ангиогенезе была показана в многочисленных экспериментальных исследованиях заживления ран. Исследования *in vivo* подтвердили экспрессию мощных ангиогенных медиаторов макрофагами во время восстановления кожи, что предполагает их функциональный вклад в раневой ангиогенез [142]. Тем не менее, остается до сих пор неясно, выделяют ли макрофаги проангиогенные факторы, которые

необходимы для процесса ангиогенеза в ране, или нет. Есть сведения, что у мышей PU.1, у которых отсутствуют клетки миелоидного происхождения (макрофаги, нейтрофилы, тучные клетки, эозинофилы) и В-клетки, перинатальное заживление происходило за такое же количество времени, как и у диких мышей, и раневой ангиогенез не нарушался [217].

Во время процесса ангиогенеза фибробласты мигрируют во временную матрицу раны, пролиферируют, синтезируют ЭЦМ и дифференцируются в сократительный фенотип – миофибробласт [109; 146]. Эти события означают образование грануляционной ткани. Во время этого процесса количество клеток в месте раны увеличивается, и эта пролиферативная фаза длится в течение нескольких дней, пока область раны не заполнится, чтобы восстановить целостность тканей. Когда образуется грануляционная ткань, кератиноциты на краях раны синтезируют протеазы (ММП-1, стромолизин) и компоненты базальной пластинки (ламнин-5) для повторной эпителизации раны. Для стимуляции пролиферации и миграции кератиноцитов необходим сложный комплекс эпидермально-мезенхимных взаимодействий.

Когда раневое пространство заполняется грануляционной тканью, количество воспалительных клеток уменьшается, а фибробласты и эндотелиальные клетки продолжают синтезировать факторы роста и компоненты ЭЦМ. После завершения эпителизации пролиферация клеток и неоваскуляризация прекращаются, формируется рубцовая ткань, и рана входит в фазу ремоделирования, которая длится несколько месяцев. В течение этой последней фазы достигается баланс между синтезом новых компонентов рубца матрицы и их деградация протеазами. Несмотря на достаточное понимание механизмов, участвующих в образовании грануляционной ткани, процессы, вовлеченные в ее регресс и превращение в рубцовую ткань, исследовались гораздо меньше. Типичные особенности этих событий включают в себя регресс сосудов, уменьшение количества лейкоцитов, превращение фибробластов в миофибробласты, замену временного ЭЦМ в постоянный коллагеновый. Есть доказательства того, что апоптоз эндотелиальных клеток ответственен за

основной механизм, обеспечивающий регрессию сосудов при преобразовании грануляционной ткани в рубец [81].

Таким образом, заживление ран – сложный и динамичный процесс, который можно разделить на ряд фаз: 1) гемостаз с образованием коагулирующего фибринового сгустка (от нескольких секунд до 1 часа); 2) воспалительная реакция (от нескольких минут до нескольких дней); 3) пролиферация клеток, реэпителизация; 4) грануляция и ангиогенез (начинается через 18-24 ч после ранения и длится от нескольких дней до недель); 5) ремоделирование матрикса и образование рубцов (в течение нескольких месяцев). Продолжительность каждой фазы ранозаживления зависит от разных факторов: типа и размера раны, возраста, физического состояния, сопутствующих заболеваний, локализации и лечения раны [30; 143; 226]. В этих процессах участвуют ионы металлов, что связано с их влиянием на поведение клеток и регуляцию ферментативной активности [30; 143].

1.2.3. Роль цинка в процессах ранозаживления кожи

На каждом из описанных выше этапов ранозаживления цинк выполняет важную биологическую роль (Рисунок 1.2) [143].

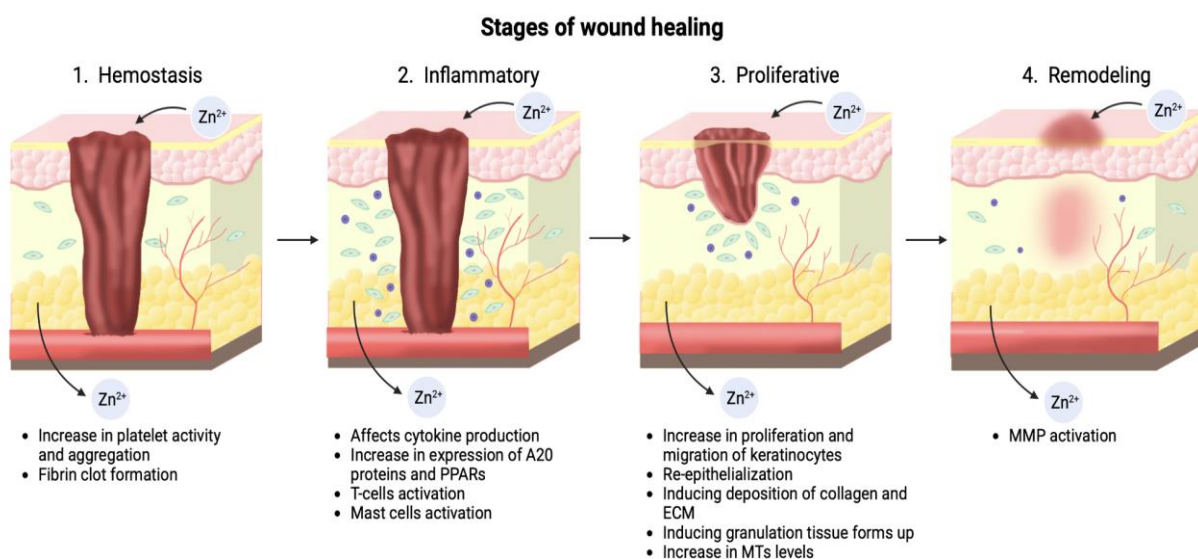


Рисунок 1.2 – Роль цинка на разных этапах ранозаживления [143]

Гемостаз – это поддержание равновесия между свертывающей и противосвертывающей системами [30]. При повреждении сосуда происходит переход компонентов крови в область раны, а также высвобождение вазоактивных факторов, приводящих к активации каскада свертывания крови и гемостаза.

Тромбоцитарный гемостаз. Важным элементом свертывающей системы являются тромбоциты, которые высвобождают вазоактивные вещества, факторы роста, провоспалительные цитокины. Поскольку исследования процессов тромбоцитарного гемостаза были сфокусированы в большей степени на роли ионов кальция, цинку уделялось незначительное внимание. Однако этот микроэлемент выступает как важный гемостатический фактор, повышающий активность и агрегацию тромбоцитов [30; 143]. Так, еще в прошлом веке у грызунов с дефицитом цинка были отмечены повышенное кровотечение и более трудные роды [80; 100; 153]. Это демонстрирует потенциальную роль ионов цинка во время тромбоза и гемостаза и подчеркивает его признание в качестве внутри- и внеклеточного регулятора тромбоцитов [75]. В настоящее время предполагается синергетическая взаимосвязь ионов кальция и цинка, но доказательств этой теории пока не предоставлено [30; 143; 235]. Заслуживает внимания тот факт, что ионы цинка часто взаимодействуют с белками с более высоким сродством, чем ионы кальция [96].

Известно, что гематопоэтический ген цинкового пальца (*Hzf*) экспрессируется в мегакариоцитах, а модификация домена *Hzf* с цинковыми пальцами приводит к нарушению нормального синтеза α -гранул, упаковки в них веществ и биогенеза тромбоцитов [120; 143].

Для поддержания необходимого уровня цинка в мембране мегакариоцитов расположены различные ZIP/*ZnT*-транспортеры [30; 76; 83; 103; 117; 120; 143; 162], однако для понимания молекулярных механизмов захвата, хранения, высвобождения ионов цинка тромбоцитами необходимо дальнейшее изучение субклеточной локализации транспортеров цинка и вклада ZIP/*ZnT* изоформ в гомеостаз цинка [132]. Благодаря активным механизмам транспорта тромбоциты

способны поглощать Zn^{2+} из плазмы крови и накапливать их в α -гранулах в значительном количестве [94; 132; 196]. Кроме α -гранул цинк содержится в цитозоле тромбоцитов в связанном с МТ или в свободном состоянии.

Участие цинка в механизмах регуляции функции тромбоцитов до сих пор не изучено. К.А. Taylor и N. Pugh (2016) представили модель, описывающую механизмы активации тромбоцитов, на которые оказывают свое влияние ионы цинка [196]. Согласно данной модели, после повреждения сосудов и первичной активации тромбоцитов коллагеном внутриклеточная концентрация ионов цинка значительно увеличивается. Предполагается, что это происходит в результате работы мембранных ионных каналов и транспортеров. Также часть ионов высвобождается из внутренних хранилищ. Лабильный цинк действует как агонист тромбоцитов: в низких концентрациях он потенцирует реакцию тромбоцитов на другие агонисты, а в высоких – стимулирует агрегацию [235]. Ионы цинка повышают сродство рецептора $GpVI$ к коллагену, таким образом, индуцируя первичную активацию тромбоцитов, выброс тромбоксана A_2 (TxA_2) и высвобождение α -гранул [235]. Также ионы цинка взаимодействуют с протеинкиназой C (PKC), активируя фосфорилирование тирозина сигнальных белков и последующее изменение конформации гликопротеина $GpIIbIIIa$, что способствует их связыванию с фибрином и формированию тромба [73].

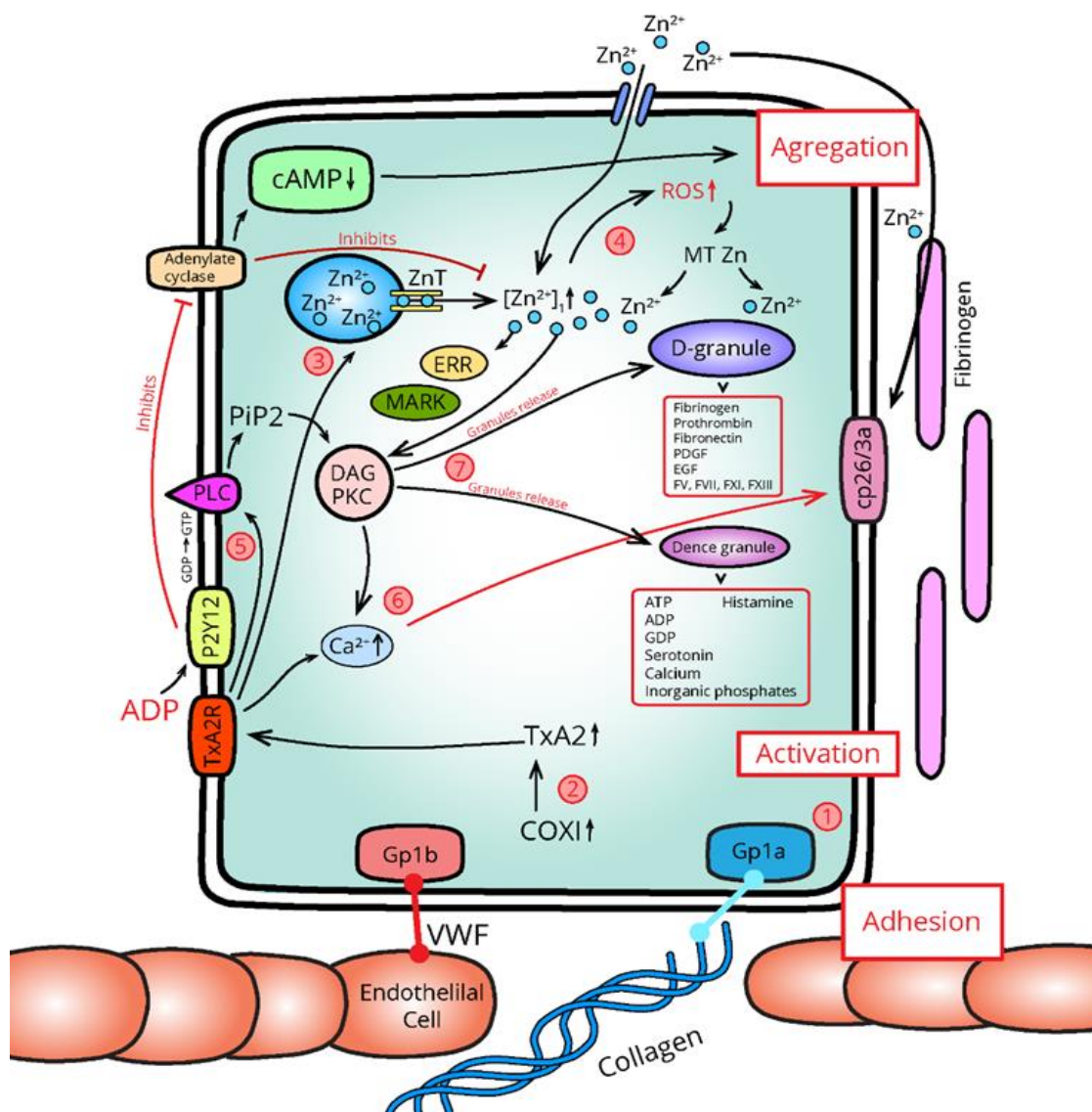
Цинк также является регулятором биогенеза и высвобождения из α -гранул фибриногена, протромбина, факторов коагуляции V, XI, XIII, фактора фон Виллебранда (VWF), фибронектина, P-селектина (CD62), PDGF, эпидермального фактора роста (EGF), β -тромбоглобулинов, альбумина, калликерина, α_2 -антиплазмина [196]. Содержимое гранул усиливает агрегацию тромбоцитов, поддерживает целостность и стимулирует восстановление сосудистой стенки [30; 143]. Активация тромбоцитов зависит от быстрого фосфорилирования и дефосфорилирования ключевых сигнальных белков, особенно остатков тирозина. Даже незначительное увеличение внутриклеточного цинка ингибирует активность многих тирозинфосфатаз и поддерживает фосфорилирование белков тромбоцитов [196].

Также активируются тирозинкиназы, которые регулируют фосфорилирование тирозина белков уже после активации тромбоцитов [30; 143]. Важную роль в регуляции активации тромбоцитов играет изменение внутриклеточного уровня циклических нуклеотидов: циклического аденозинмонофосфата (цАМФ) и циклического гуанозинмонофосфата (цГМФ). Согласно исследованиям, цинк препятствует дальнейшему синтезу цАМФ, изменяя конформацию аденилатциклазы [121]. Путем ингибирования циклической фосфодиэстеразы ионы цинка повышают уровень цГМФ. Снижение цАМФ и увеличение цГМФ приводит к уменьшению влияния отрицательной регуляции в процессе активации тромбоцитов и способствует их агрегации [30; 143].

В настоящее время показана роль цинкзависимых сигнальных механизмов на образование АФК во время активации тромбоцитов [239]. Так как АФК регулируют хранение МТ, содержащего ионы цинка, инкубация тромбоцитов с МТ или введение мышам МТ подавляет агрегационную реакцию на коллаген путем снижения мобилизации ионов кальция и синтеза ТхА₂ [180]. Участие ионов цинка в тромбоцитарном гемостазе представлено на Рисунке 1.3. После активации тромбоцитов наступает дегрануляция, способствующая коагуляции, заживлению ран и воспалению.

Сосудистый гемостаз. Цинк, высвобожденный из α -гранул тромбоцитов, наравне с ионами кальция участвует в формировании фибринового сгустка. Известно, что цинк совместно с фактором XIII способствует стабилизации тромба за счет уплотнения волокон фибрина и формирования эластичной сети [213]. Более ранние исследования показали снижение связывания тромбина с фибрином и отщепления фибринопептида А при повышенных концентрациях Zn^{2+} [136; 237]. Соответственно, при пониженных концентрациях ионов адсорбция тромбина усиливалась [237].

Таким образом, можно сделать вывод, что роль Zn^{2+} в большей степени определяется не стимуляцией образования фибрина, а последующими его трансформациями и формированием фибриновой сети [30; 143].



Примечание: Адгезия (1). Тромбоциты реагируют на повреждение сосуда взаимодействием с коллагеном базальной мембраны через чувствительный к коллагену рецептор тромбоцитов гликопротеин 1a (Gp1a) и гликопротеин клеток эндотелия и субэндотелиальной ткани, фактор Виллебранда (VWF), который связывается со специфическим рецептором, гликопротеином 1b (Gp1b) через домен A1 и к коллагену через домен A3. Активация (2). Повышенная активность циклооксигеназы 1 типа (COX 1) усиливает синтез тромбоксана A2 (ТхА2), что приводит к высвобождению Zn^{2+} из внутриклеточных запасов (3). Повышенное образование активных форм кислорода (АФК) приводит к уменьшению количества тиолов на металлотиионеине (MT), связывающих Zn^{2+} , и приводит к высвобождению Zn^{2+} (4). Под воздействием ТхА2 белки Gq активируются (5), что приводит к увеличению образования инозитол-3-фосфата (ИЗР), увеличению содержания Ca^{2+} в тромбоците и изменению конформации Gp2b/3a (6). Повышенное содержание внутриклеточных ионов цинка активирует протеинкиназу С (PKC) и приводит к высвобождению α -гранул (7). Внутриклеточные ионы Zn^{2+} ингибируют аденилатциклазу, снижая уровень циклического аденозинмонофосфата (Самр) и способствуя агрегации тромбоцитов (8)

Рисунок 1.3 – Роль цинка в гемостазе [143]

Кроме того, ионы цинка регулируют несколько этапов коагуляции. Например, связываются с фактором XII, индуцируя конформационные изменения, тем самым, активируя калликреин-кининовую систему [88]. В результате происходит высвобождение и накопление брадикинина на поверхности эндотелиальных клеток, что способствует адгезии воспалительных иммунных клеток. Ионы цинка связываются с такими нейтрализующими белками, как фибриноген, высокомолекулярный кининоген (HMWK) и богатый гистидином гликопротеин (HRG), усиливая их сродство к антикоагулянтам и, являясь, таким образом, важным регулятором гемостаза [30; 143; 189]. Доказано, что дефицит цинка нарушает каскад коагуляции и образование фибрина, что приводит к увеличению времени кровотечения [196].

Таким образом, цинк может способствовать гемостазу через несколько механизмов, модулирующих агрегацию тромбоцитов, коагуляцию и формирование фибриновой сети [132]. Тем не менее, необходимы дальнейшие исследования, направленные на выяснение путей поступления ионов в цитозоль тромбоцитов и сигнальных путей, индуцированных цинком [30; 143].

Гемостаз, вызванный коагуляцией, обеспечивает основу для воспалительной фазы заживления раны и формирования тканей. Гемостатическая пробка создает матрицу, в которую мигрируют эффекторные клетки и компоненты ЭЦМ.

Воспаление – сложный процесс взаимодействия между разнообразными клетками. Стадия воспаления при ранозаживлении способствует быстрой миграции кератиноцитов от краев раны, а также из волосяных фолликулов и потовых желез в раневое ложе, где появляются молекулы ЭЦМ. Фибробласты начинают продуцировать новые клетки ЭЦМ, EGF и TGF инициируют эпителизацию.

Эпителизация – последовательность процессов миграции, пролиферации и дифференцировки кератиноцитов, которая стимулируется измененными белками ЭЦМ и цитокинами [178]. Основными продуцентами цитокинов являются макрофаги и другие иммунные клетки.

В многочисленных исследованиях показано, что цинк влияет на продукцию цитокинов путем снижения активации ядерного фактора каппа В (NF-κB) [233]. Семейство транскрипционных факторов Rel/NF-κB регулирует экспрессию многих генов, ответственных за функционирование иммунной системы, воспалительные реакции и другие биологические процессы. Кроме того, NF-κB играет решающую роль в регулировании выживания, активации и дифференцировки клеток врожденного иммунитета и воспалительных Т-клеток [148].

Активация NF-κB может быть вызвана различными внешними и внутренними факторами, например, бактериальными и вирусными инфекциями, воспалительными цитокинами, УФ- и γ-излучением, физиологическими состояниями (ишемия, гиперосмотический шок) и окислительным стрессом. Семейство факторов транскрипции NF-κB состоит из пяти белков: p65 (RelA), RelB, c-Rel, p105/p50 (NF-κB1) и p100/52 (NF-κB2). Связываясь друг с другом, они образуют около 15 различных транскрипционно активных гомо- и гетеродимерных комплексов. В клетках димеры NF-κB находятся в комплексе с ингибитором NF-κB (IκB), что позволяет им в норме оставаться неактивными. Однако при активации сигнального пути эти комплексы фосфорилируются IκB киназами (IKK), что приводит к активации NF-κB димера, его ядерной транслокации и индукции транскрипции генов-мишеней. Активация NF-κB сигнального пути индуцирует образование молекул и медиаторов, участвующих в синтезе иммунорегуляторных белков (сывороточный амилоид, компонент системы комплемента C3, VCAM, ICAM, TCR α,β, MNC-1), цитокинов (TNFα, IL-1, IL-6, IL-12), IκB киназ (IκBα, c-Rel, p105), гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора и регуляторов апоптоза (Bcl-XL, IAPs) [154].

Известно, что цинк участвует в регуляции NF-κB пути (Рисунок 1.4), однако, его влияние довольно противоречиво [30; 143]. Так, в некоторых исследованиях сообщается, что цинк необходим для связывания NF-κB с ДНК в очищенных или рекомбинантных линиях NF-κB p50 или Т-хелперных клеток [219; 220].

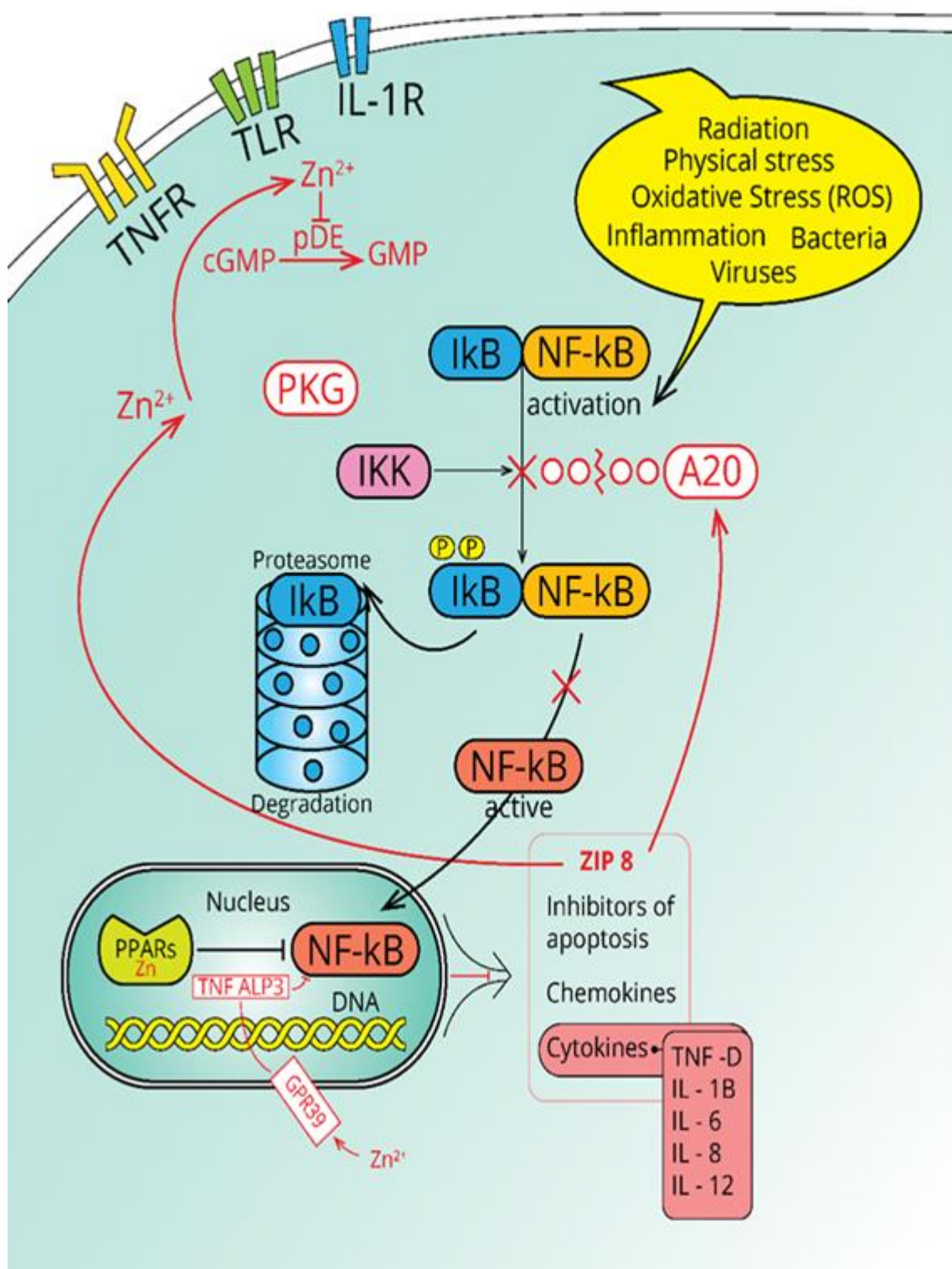


Рисунок 1.4 – Роль цинка в NF-κB сигнальном пути [143]

С другой стороны, показано, что цинк способен ингибировать активность и экспрессию циклической фосфодиэстеразы (ФДЭ), что увеличивает клеточное

содержание цГМФ. Цинк-опосредованный рост цГМФ приводит к перекрестной активации протеинкиназы G. По этому механизму цинк подавляет активацию ИКК и NF-κB и последующее производство TNF-α. Кроме того, показано, что ZIP8-опосредованная активация цинка блокирует ИКК на связывании к определенному месту внутри домена киназы. Таким образом, ZIP8 отрицательно регулирует путь NF-κB, играя, таким образом, решающую роль в защитных реакциях [83].

Основным механизмом подавления воспаления, вызванным цинком, является увеличение экспрессии цинксодержащих белков A20 и рецепторов, активирующих пролиферацию пероксисом (PPARs). Белок цинкового пальца A20 (TNFAIP3) является центральным негативным регулятором NF-κB [30; 143].

Способность цинка регулировать A20 определяется наличием в его C-концевом домене семи «цинковых пальцев». О молекулярных механизмах этого процесса мало что известно. Вероятно, что A20 действует на нескольких этапах сигнального пути NF-κB, ингибируя TNF- и TLR4-индуцированную активацию NF-κB, что, в конечном итоге, приводит к прекращению передачи сигналов и снижению выработки нижестоящих медиаторов [187].

PPAR – это семейство ядерных рецепторов, в строении ДНК-связывающих доменов которых находятся два «цинковых пальца» [207]. В настоящее время установлено, что PPAR не только активируют пролиферацию пероксисом, но и контролируют обмен углеводов, жиров и белков в клетке, процессы клеточной дифференцировки и апоптоза. PPAR участвуют в транскрипционной регуляции метаболизма, воспаления, ангиогенеза и фиброзной реакции [90; 99; 114].

Известно, что все подтипы PPAR активируются для подавления воспаления посредством ингибирования NF-κB [99; 124]. Кроме того, PPAR-α и β/δ играют важную роль в ранозаживлении [161]. Так, на модели щелочного ожога роговицы крысы показано ускорение заживления после местного применения офтальмологического раствора агонистов PPAR за счет усиления пролиферативной способности и ингибирования воспаления [99].

Важную роль в заживлении ран играет иммунная система, которая особенно чувствительна к изменению уровня цинка [30; 143]. Известно, что ZIP6, ZIP8,

ZIP10 участвуют во многих иммунных реакциях [83; 204]. Так, показано, что активации Т-клеток способствует приток цинка из внеклеточных и внутриклеточных источников через транспортеры ZIP6 и ZIP8 соответственно [83; 119]. ZIP6 является важной молекулой для CD4 Т-клеток [83]. Активация Т-клеточного рецептора (TCR) на поверхности CD4 Т-клеток способствует их дифференцировке в различные Т-клетки, включая Th1, Th2, Th17 и T-регуляторные клетки. В настоящее время показано, что ZIP8 важен для различных иммунных клеток, связанных с врожденным иммунитетом [83].

Дефицит цинка снижает адгезию моноцитов к эндотелию, выработку цитокинов гранулоцитами, фагоцитоз макрофагов, активность цитокинов, секретируемых Т-клетками и макрофагами, активность НК-клеток, дифференцировку Т-клеток и высвобождение определенных интерлейкинов и антител, грануляцию нейтрофилов [129; 243].

Ионы цинка являются важным компонентом тимулина – тимопоэтического гормона, необходимого для пролиферации и дифференцировки Т-хелперов [165]. Кроме этого, дефицит цинка отрицательно влияет на экспрессию IL-2 и IFN- γ и увеличивает выработку провоспалительных цитокинов IL-1 β , IL-6 и TNF- α [227]. В свою очередь, дефицит IL-2 снижает литическую активность НК-клеток и цитотоксических Т-клеток, а дефицит IFN- γ ингибирует функции макрофагов [165].

Было показано, что В-лимфоциты способствуют очищению ран, а также продуцируют антитела, обнаруживающие поврежденную ткань. Дефицит цинка, вызванный нарушением транспорта ионов белком ZnT7, ингибирует стимулированное CD145 фосфорилирование p38 MAPK, что в конечном итоге приводит к ингибированию активации В-лимфоцитов, опосредованной Т-клетками.

Цинксодержащий фермент щелочная фосфатаза является маркером ранних стадий ангиогенеза, характерных для посттравматического воспаления и пролиферации соединительной ткани. Этот фермент дефосфорилирует АМР с образованием аденозина, который обладает выраженным противовоспалительным

действием и важен для прерывания фазы воспаления раневого процесса [30; 143].

В настоящее время на разных этапах заживления ран, включая воспаление, пролиферацию и ремоделирование изучается роль макрофагов. В начале кожного повреждения они высвобождают провоспалительные и иммуномодулирующие медиаторы, преимущественно гистамин, VEGF, IL-6, IL-8, которые увеличивают проницаемость эндотелия и вазодилатацию и способствуют миграции моноцитов и нейтрофилов к месту повреждения. В настоящее время не вызывает сомнений, что цинк участвует в активации макрофагов и необходим как для их дегрануляции, так и для продукции цитокинов [137; 149; 150].

Обнаружено, что цинк и макрофаги индуцируют продукцию IL-6 из фибробластов кожи через сигнальные пути, опосредованные рецептором 39 (GPR39) – чувствительным к Zn^{2+} орфанным рецептором, связанным с G-белком [137]. Он экспрессируется в нейронах, кератиноцитах, колоноцитах, клетках поджелудочной железы, слюнных железах, костях, клетках рака предстательной железы, осуществляя Zn-зависимую сигнализацию [108; 137].

Следовательно, фаза воспаления направлена на восстановление поврежденных тканей путем активации клеток и высвобождения медиаторов воспаления, взаимодействие между которыми обуславливает развитие местной и системной острой воспалительной реакции. Примерно через 3-5 дней после ранения признаки воспаления ослабевают и развивается стадия пролиферации.

Фаза пролиферации состоит из трех основных процессов: реэпителизации, включающей пролиферацию кератиноцитов и миграцию поверх раневого ложа, образование грануляционной ткани, включающей пролиферацию, миграцию и синтез компонентов ЭЦМ фибробластами, неоваскуляризацию.

При заживлении раны важно как можно раньше подавить воспалительный процесс и не дать ему перейти в хроническую форму. Устраняют воспаление и способствуют повторной эпителизации и сокращению раны T-регуляторные клетки (Treg) [93]. В ряде исследований показано, что добавки цинка, регулируя сигнальные пути Treg, способствуют их индукции и стабильности [139; 228; 242]. Под действием коллагеназ, активаторов плазминогена и цинкзависимой

матриксной металлопротеиназы (ММП) происходит деградация фибринового сгустка, обеспечивается пространство для роста клеток, миграции и ангиогенеза. Индуцируется повторная эпителизация, т.е. размножение эпителиальных клеток и последующее заселение и закрытие ими раны [30; 143].

Известен X-связанный белок цинкового пальца (ZFX), дополнительно способствующий пролиферации и миграции клеток кератиноцитов [201]. Цинк является необходимым кофактором для нормальной работы SMAD белков, являющихся основными преобразователями сигнальных молекул к рецепторам TGF- β . Таким образом индуцируется отложение коллагена и ЭЦМ, затем формируется грануляционная ткань [30; 139; 143].

В настоящее время показано, что ZIP4 экспрессируется в человеческих кератиноцитах [76], а повышение концентрации цинка с 8 ч до 3 дней после нанесения раны может вызывать их пролиферацию [205]. Кроме того, было выявлено, что чувствительный к цинку GPR39, который высоко экспрессируется в кератиноцитах, способствует заживлению кожных ран [182]. Также продемонстрировано, что ZnR/GPR39 участвует в пролиферации кератиноцитов через клеточные механизмы, включающие фосфоинозитид-3-киназный (PI3K) и внеклеточный сигнально-регулируемый киназный (ERK) пути [182].

При пролиферации кератиноцитов увеличивается содержание МТ, являющихся редокс-чувствительными антиоксидантными протеинами. Регуляция окислительно-восстановительных реакций имеет важное значение в заживлении ран. Показано, что около 20% внутриклеточного цинка связано с МТ [232], которые регулируют его перемещение в соответствии с физиологическими потребностями [120]. На моделях нормальных человеческих эпидермальных кератиноцитов (ННЕК) показано, что содержание МТ и Zn^{2+} увеличивается при пролиферации кератиноцитов [83].

Ангиогенез. Одновременно с повторной эпителизацией эндотелиальные клетки мигрируют и размножаются в местах раны, образуя новые кровеносные сосуды. Таким образом новые клетки обеспечиваются кислородом и питательными веществами, необходимыми для поддержания их жизни и роста.

Точная роль цинка в регуляции ангиогенеза остается мало изученной. Известно, что экспрессия цинкзависимого белка ZEB2 повышена в поврежденных кардиомиоцитах. При введении терапевтической дозы ZEB2 в кардиомиоциты индуцируется ангиогенез и увеличивается плотность новообразовавшейся сети сосудов, что приводит к снижению образования рубцов и сохранению сердечной функции [87]. С другой стороны, дефицит цинка стимулирует миграцию эндотелиальных клеток микрососудов человека [139; 143].

Ремоделирование. Фаза ремоделирования наступает после полного восстановления эпидермиса и направлена на замену грануляционной ткани более здоровой кожей путем реэпителизации [205]. Ремоделирование представляет собой тонкое равновесие между формированием и деградацией тканей, контролируемое активностью протеолитических ферментов.

Деградация различных белков ЭЦМ является важным процессом в ремоделировании и восстановлении тканей. Деградация осуществляется различными видами протеаз, однако основными являются ММР.

ММР относятся к семейству цинкзависимых эндопептидаз, идентифицированных в разных тканях [74] и секретируемых различными типами клеток: воспалительными, кератиноцитами, эндотелиальными клетками, фибробластами, гладкими мышцами сосудов (VSM) и др. Все члены ММР семейства содержат общие домены, из которых цинк необходим в каталитическом домене для протеолитической активации белка [30; 92; 143].

В коже ММР участвуют во многих клеточных, молекулярных и биохимических процессах [181], модулируют высвобождение цитокинов, факторов роста и других активных агентов, которые секвестрируются в ЭЦМ [125; 212]. На моделях острых ран у человека продемонстрировано, что образование неоэпителия нарушается из-за блокирования активности ММР [185]. На мышинных моделях показано, что ММР-1, ММР-7, ММР-9 участвуют в реэпителизации [106; 128], активация ММР-9 происходит при ранозаживлении [147], а экспрессия и активность ММР-1 в поверхностных ранах увеличивается в 100 раз.

ММР способны гидролизовать практически все белки ЭЦМ, включая эластин и коллаген, и обуславливают структурную организацию и регенерацию дермы и эпидермиса [134; 177]. ММР участвуют в ремоделировании сосудистой ткани, росте клеток, миграции и дифференцировке, а также в инвазии и васкуляризации тканей [115]. Кроме этого, ММР могут влиять на функцию эндотелиальных клеток, а также миграцию VSM-клеток, пролиферацию, сигнализацию Ca^{2+} и мышечное сокращение [92; 212]. Триггерами для активации ММР являются: повреждение тканей, окислительный стресс, воспалительные цитокины, гормоны, факторы роста, УФ-излучение [30; 143].

Основными ферментами семейства ММР являются коллагеназы, способные гидролизовать нативный коллаген. Коллагенолитические ферменты являются эффективными протеолитическими комплексами, т.к. обладают способностью расщеплять коллаген, который является главным компонентом ран и рубцов. В исследованиях показано, что коллагеназы влияют на процесс репарации, в частности, активацию клеточной миграции, пролиферативную и ангиогенную реакцию на травму *in vitro*, и повышение заживления раны *in vivo* [111]. Во время фазы ремоделирования происходит повторная эпителизация раны, а дерма восстанавливает свою прочность.

Окислительный стресс. На всех этапах регенерации раны патологическую роль играют АФК. В частности, в воспалительной фазе большие количества АФК, наряду с провоспалительными цитокинами и протеолитическими ферментами начинают выделять нейтрофилы и макрофаги. В настоящее время хорошо изучена роль сигналов АФК в ангиогенезе [85]. Умеренные уровни H_2O_2 регулируют производство VEGF – ключевого ангиогенного фактора роста в кератиноцитах – и приводят к ускорению ангиогенеза. АФК участвуют также в эпителизации, запуская активацию рецепторов EGF и фактора роста кератиноцитов (KGF), и индуцируют продукцию TGF α в фибробластах. В то же время, чрезмерное количество АФК оказывает замедляющее действие на ангиогенез. Некоторые ферменты, участвующие в сигнальных путях, например, фосфотирозинфосфатаза, имеют сульфгидрильные остатки, очень чувствительные к окислительной

модификации и подвергающиеся окислительной инактивации. Таким образом, избыточное количество АФК сигнализирует о несбалансированном редокс-гомеостазе и приводит к нарушению заживления ран.

Антиоксидантное действие цинка проявляется по разным механизмам: конкурентного связывания с ионами железа и меди за связывание с клеточными мембранами и белками, вытесняющими эти окислительно-восстановительные металлы; связывания с SH-сульфгидрильными группами молекул, защищающими от окисления; активации антиоксидантных белков, молекул и ферментов, например, глутатиона, каталазы, СОД; связывания с МТ, богатыми цистеином [166; 198].

В ходе эволюции выработались сложные многокаскадные механизмы ранозаживления, направленные на ограничение доступа инфекционных агентов к кровяному руслу, защиту от потери крови, восстановление целостности кожи [30; 143]. Эти процессы играют важную ключевую роль в поддержании физиологического гомеостаза, жизнеспособности и функционировании внутренних органов. Заживление кожной раны включает стадии гемостаза, воспаления, пролиферации и ремоделирования. В реализации этих процессов, наряду с модуляторами, ростовыми факторами, цитокинами, ММР, клеточными рецепторами, особую роль играют микроэлементы, в первую очередь, цинк. Глубокое понимание физиологии ранозаживления является теоретическим фундаментом для разработки новых терапевтических подходов в лечении ран. Несмотря на то, что в настоящее время во всем мире проводится целый ряд исследований по изучению дерматотропных эффектов цинка, молекулярные механизмы, лежащие в их основе, до конца не изучены и имеют много «белых» пятен [30; 143].

Учитывая важную роль цинка в процессах ранозаживления, его противовоспалительные, антибактериальные, антиоксидантные свойства, участие в процессах дифференцировки клеток, регенерации кожи, изучение дерматопротного действия комплексов цинка с N-алкенилимидазолами представляет теоретический и практический интерес.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования на животных соответствуют основным документам, регламентирующим объем, схему и процедуру проведения экспериментов: Решению Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 г. № 81 «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств»; ГОСТу 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики», Руководству по проведению доклинических исследований лекарственных средств (Миронов А.Н. [ред.], 2012) [32; 57]. Содержание, питание, уход за животными и выведение их из эксперимента осуществляли согласно требованиям ГОСТа 34566-2019 от 23.08.2019 г. «Комбикорма полнорационные для лабораторных животных. Технические условия» и ГОСТа 33216-2014 от 01.07.2016 г. «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами». Протоколы экспериментальных исследований прошли биоэтическую экспертизу на заседании Локального этического Комитета ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова (Сеченовский Университет) (протокол № 03-23 от 16.02.2023 г.).

2.1. Дизайн экспериментального исследования

Настоящее исследование включало несколько этапов (Рисунок 2.1).

На *первом этапе* проводилось планирование диссертационной работы, анализ зарубежных и отечественных литературных источников, была выдвинута гипотеза, определены цель, задачи, методы исследования, получены результаты этической экспертизы. На *втором этапе* была определены LD₅₀ двух новых соединений цинка при в/б введении мышам и острая токсичность при нанесении на кожу крыс 1% гелей шести комплексов цинка на основе Na-КМЦ. На *третьем этапе* изучали динамику заживления на моделях линейной и плоскостной раны у крыс при накожном нанесении 1% гелей комплексов цинка на основе Na-КМЦ

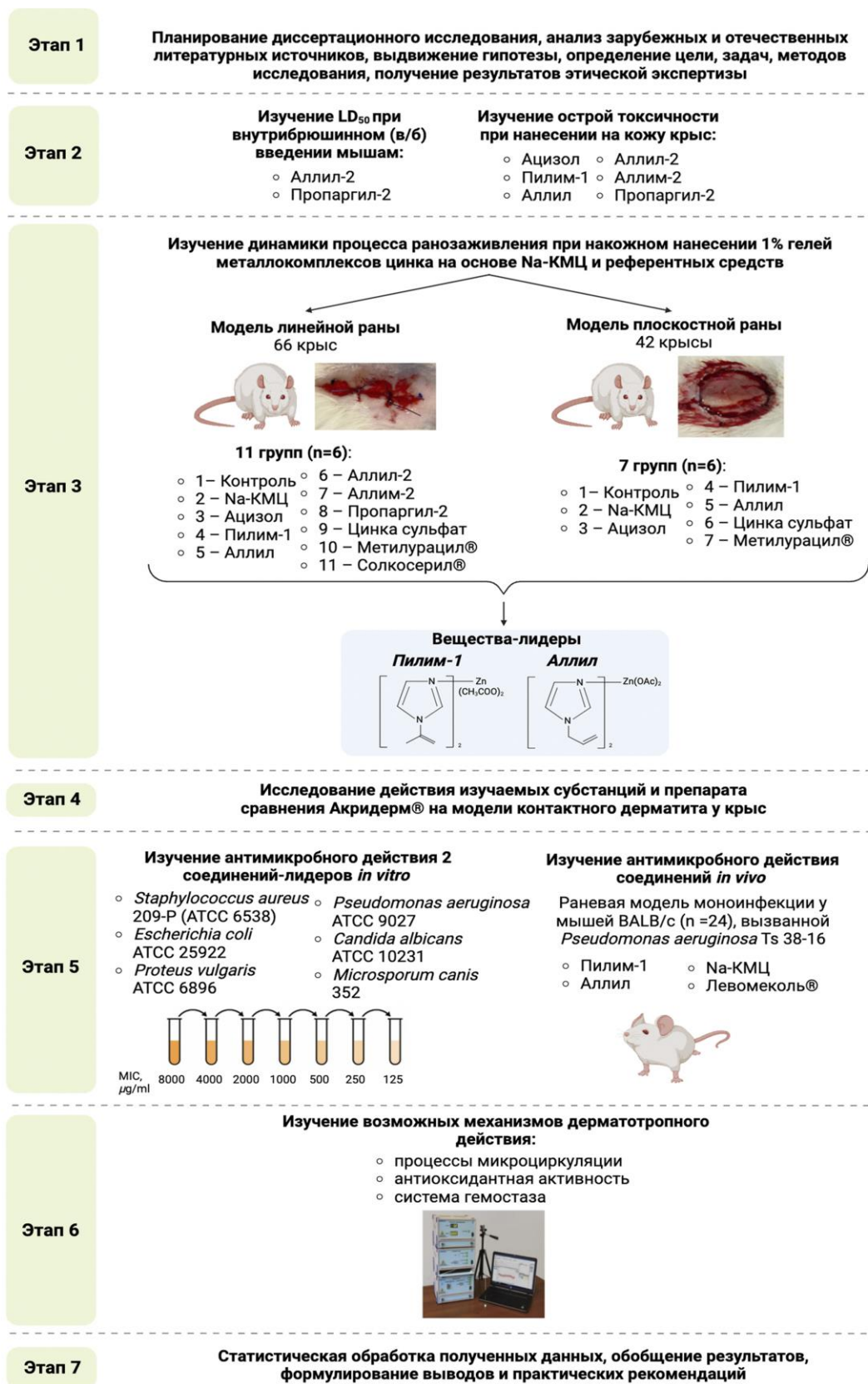


Рисунок 2.1 – Дизайн диссертационного исследования [97]

и референтных препаратов, а также гистоморфологические показатели раневых биоптатов. По результатам данного этапа выявили 2 соединения-лидера, обладающих наиболее выраженным ранозаживляющим действием. На *четвертом этапе* оценивали противоаллергическое и противовоспалительное действие шести изучаемых субстанций и препаратов сравнения. На *пятом этапе* исследовали антимикробное действие 2 соединений-лидеров *in vitro* на культурах бактериальных и грибных клеток, а также *in vivo* на модели инфицированной кожной раны у мышей. На *шестом этапе* изучали возможные патогенетические механизмы выявленного ранозаживляющего действия соединения-лидера: оценивали антиоксидантную активность, влияние на процессы микроциркуляции в коже и гемостаз. На заключительном *седьмом этапе* работы проводили статистическую обработку полученных данных, обобщение результатов, формулировали выводы и практические рекомендации.

2.2. Экспериментальные животные

В соответствии с поставленными целью и задачами исследования опыты проведены на 212 аутбредных здоровых половозрелых белых крысах обоего пола (112 самцов и 100 самок) массой 220-320 г, 120 белых нелинейных мышцах-самцах и 24 мышцах-самках BALB/c массой 18-20 г, доставленных из питомника лабораторных животных «КролИнфо» Московской области.

Эксперименты на крысах проводили после 20-дневной адаптации в виварии. Мыши после получения из питомника были адаптированы в лаборатории в течение 7 дней до начала эксперимента в соответствии с СП 2.2.1.3218-14. Во время карантина осуществляли ежедневный визуальный осмотр внешнего состояния животных.

Животных на протяжении всего времени эксперимента содержали на стандартной диете в условиях свободного доступа к очищенной водопроводной воде в индивидуальных клетках при температуре 18-20° С и относительной влажности воздуха 50-70% с естественным свето-темновым циклом [97].

Животных случайным образом рандомизировали по группам ($n = 6-7$): контрольная, Na-КМЦ, животные опытных групп получали 1% гели комплексов цинка на основе Na-КМЦ или референтные средства сравнения. Распределение экспериментальных животных по видам исследования представлено в Таблице 2.1.

Таблица 2.1 – Распределение животных по видам исследования

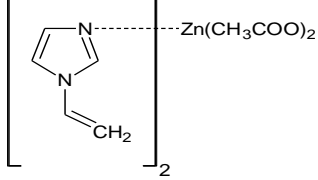
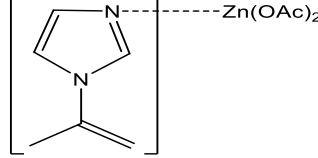
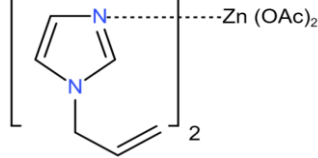
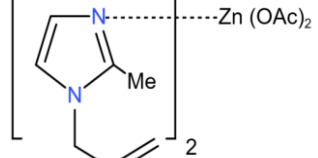
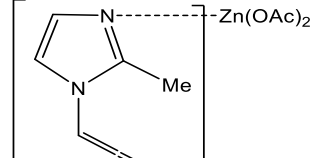
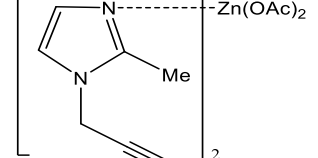
Исследования	Количество	
	крыс	мышей
Острая токсичность при накожном нанесении	36	
Острая токсичность при в/б введении		120
Модель неинфицированной линейной раны	66	
Модель неинфицированной плоскостной раны	42	
Модель инфицированной плоскостной раны		24
Модель КД	54	
Микроциркуляция крови	14	

Манипуляции, вызывающие неприятные болевые ощущения, были минимизированы в соответствии с правилом 3R (Reduction, Replacement, Refinement), изложенным в стандарте GLP (Good Laboratory Practice). Хирургическое вмешательство крысам проводили под общей анестезией с использованием наркотического средства Золетил[®] (Virbac, Франция) в дозе 5 мг/100 г веса животного внутримышечно (в/м); мышам – Золетил[®], 45 мг/кг + ксилазин, 7,5 мг/кг, в/м. Гуманное выведение лабораторных животных из эксперимента осуществляли путем обескровливания в сочетании с предварительной дезориентацией в CO₂-боксе.

2.3. Исследованные химические соединения и референтные средства

Исследованные комплексы цинка производные N-алкенилимидазолов синтезированы в Иркутском институте химии имени А.Е. Фаворского СО РАН. Химические и структурные формулы соединений представлены в Таблице 2.2.

Таблица 2.2 – Исследованные комплексы цинка производные N-алкенилимидазолов [97]

№ п/п	Вещество	Химическое название	Структурная формула	Химическая формула
1	Ацизол	бис(N-винилимидазол)цинкдиацетат		$C_{14}H_{18}N_4O_4Zn$
2	Пилим-1	(N-изопрпенилимидазол)цинкдиацетат		$C_{10}H_{14}N_2O_4Zn$
3	Аллил	бис(N-аллилимидазол)цинкдиацетат		$C_{16}H_{22}N_4O_4Zn$
4	Аллил-2	бис(N-аллил-2-метилимдазол)цинкдиацетат		$C_{18}H_{26}N_4O_4Zn$
5	Аллил-2	(N-алленил-2-метилимдазол)цинкдиацетат		$C_{11}H_{14}N_2O_2Zn$
6	Пропаргил-2	(бис-N-пропаргил-2-метилимдазол)цинкдиацетат		$C_{18}H_{22}N_4O_4Zn$

Ацизол – наиболее изученное вещество, на основе которого был разработан оригинальный отечественный препарат. Синтез Ацизола описан ранее [35]. LD₅₀ при в/б введении мышам составляет 130 мг/кг, крысам – 150 мг/кг [69; 70]. Кристаллическая структура Ацизола представлена на Рисунке 2.2.

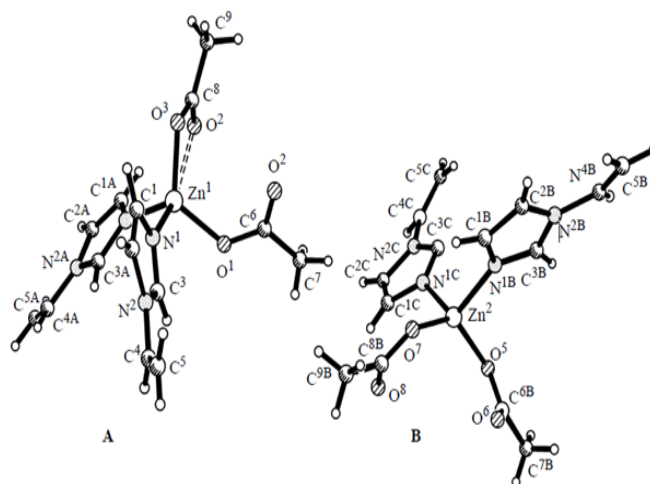


Рисунок 2.2 – Кристаллическая структура Ацизола [91]

Препарат разрабатывался в качестве антидота при отравлениях смертельными дозами монооксида углерода [3]. Способность снижать тяжесть повреждения ЦНС токсичными продуктами горения, улучшая процессы долговременной памяти, спонтанную двигательную активность и эмоциональное поведение, способность к обучению, позиционирует Ацизол как профилактическое и лечебное средство при поражениях нейротоксическими веществами [50; 69; 70].

Ацизол как донатор цинка может быть препаратом выбора для лечения некоторых нейродегенеративных заболеваний, требующих коррекции ионного гомеостаза [98]. Ацизол зарекомендовал себя как высокоэффективный цинксодержащий препарат с целым рядом фармакологических эффектов: противовоспалительным, бактериостатическим, репаративным, детоксикационным, иммуномодулирующим [5]. Изучено антигипоксическое и антиоксидантное действие, а также адаптогенные, мембрано-, гепато- и кардиопротекторные эффекты Ацизола [1; 69; 82; 169].

При хроническом отравлении свинцом назначение Ацизола снижает выраженность ПОЛ и патогистологических изменений в легких, сердце и почках, что позволяет сохранить нормальное функционирование внутренних органов [8; 69; 70]. В условиях нитритной интоксикации препарат также уменьшает выраженность ПОЛ, что проявляется снижением гидроперекисей и малонового диальдегида и повышением активности каталазы [14]. Ацизол повышает антиоксидантную защиту миокарда, индуцирует микросомальные ферменты печени, стимулирует антиокислительную активность клеток [1; 69].

При отравлении угарным газом Ацизол ускоряет его элиминацию и снижает выраженность гипоксии. Кроме того, препарат уменьшает потребность организма в кислороде и способствует повышению устойчивости к кислородному голоданию наиболее чувствительных органов, в первую очередь, головного мозга, миокарда, печени. При острых гипоксических состояниях, включая гипобарическую гипоксию, гипоксию с гиперкапнией, гемическую и гистотоксическую гипоксию у мышей, Ацизол проявлял защитный эффект [69; 70; 186].

Цинк, содержащийся в Ацизоле, нормализует каскады метаболических процессов, связанных с работой цинк-зависимых ферментных систем [69; 70]. В связи с этим, данный препарат может быть использован при лечении цинкдефицитных состояний (болезнь Прасада, иммунодефициты, аллергодерматозы, дисфункция простаты и др.) [82].

Установлена высокая эффективность Ацизола как средства для лечения и профилактики псориаза [51; 69] и продемонстрирована уникальная способность оказывать универсальное саногенетическое действие, проявляющееся в восстановлении элементного гомеостаза при дисбалансе цинка [9; 60].

Экспериментальные и клинические исследования при лечении заболеваний пародонта различной степени тяжести (гингивит, периодонтит и пародонтоз) показали, что применение Ацизола сопровождалось быстрым выздоровлением и стойкой ремиссией как в эксперименте, так и в клинике [49]. Продемонстрирована высокая эффективность зубной пасты и ополаскивателя для полости рта на основе

Ацизола в комплексной терапии воспалительных заболеваний пародонта [6].

Как антигипоксическое средство Ацизол может применяться при многих заболеваниях, сопровождающихся ишемией и гипоксией внутренних органов: в терапевтической и хирургической практике, в урологии, гинекологии, дерматологии, а также для лечения функциональной импотенции. Благодаря антигипоксическому и антиоксидантному действию Ацизол может найти применение в реаниматологии, неотложной терапии, хирургии с целью коррекции метаболического ацидоза и защиты клеточных мембран от воздействия продуктов ПОЛ. Ацизол может быть рекомендован для внедрения в акушерскую практику как эффективное средство при гипоксии плода [69; 70; 82].

Применение Ацизола перспективно для спортивной и восстановительной медицины, поскольку повышает уровень функциональных резервов организма, работоспособность и выносливость в тренировочных процессах за счет восполнения цинка в ферментативных системах, оптимизации тканевого дыхания, улучшения кислород-связывающих свойств крови [69; 70; 82].

Таким образом, Ацизол как цинксодержащий препарат выступает в качестве высокоэффективного средства при широком круге патологий, в том числе, при различных заболеваниях кожи.

В настоящее время на основе бис(N-винилимидазол) цинкдиацетата выпускается препарат Цинказол® (ФГУП НПЦ «Фармзащита» ФМБА России).

Пилим-1, *Аллил*, *Аллим-2* – комплексы цинка, для которых продемонстрировано антигипоксическое действие на моделях гипоксии разного генеза [70; 186].

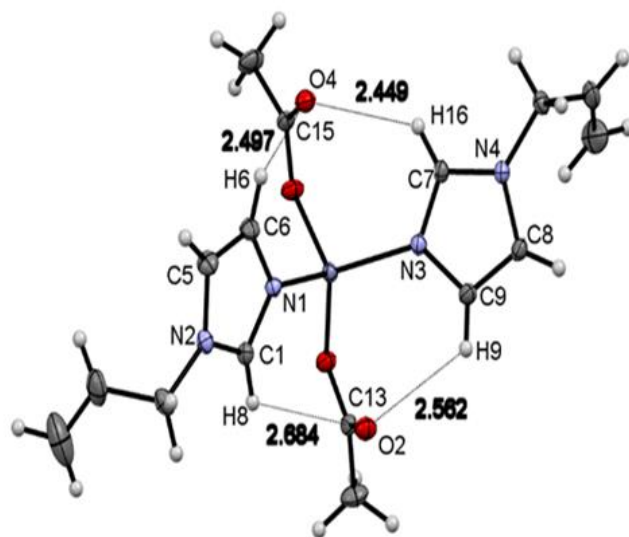
Синтез данных соединений описан ранее [39; 40]. LD₅₀ при в/б введении мышам составляет 105, 155, 200 мг/кг для Пилима-1, Аллила и Аллима-2 соответственно [70; 186].

Изучение влияния Пилима-1 на воспалительно-деструктивные процессы в пульпе и ткани пародонтального комплекса на экспериментальной модели у крыс, воспроизводящей одновременное формирование острого периодонтита и пародонтита, показало, что Пилим-1 и, особенно, комбинация Метрогил Дента +

Пилим-1 оказывают защитное действие на эпителий и соединительную ткань десны, проявляющееся в восстановлении ее морфологической структуры с минимальными остаточными явлениями дистрофии и склероза, и нормализации патологических изменений [199].

В тесте «формалиновый отек» у крыс было показано, что Пилим-1 обладает более выраженным, чем Диклофенак, болеутоляющим действием в первую фазу воспаления, отражающую острую боль. Также была продемонстрирована сопоставимая с Диклофенаком способность Пилима-1 ингибировать экссудативное воспаление, индуцированное каррагинаном и полным адъювантом Фрейнда (ПАФ). При этом у Пилима-1 в экспериментах на крысах отмечалась крайне низкая язвобогенная активность, а в условиях НПВС-индуцированной гастропатии у крыс, вызванной Диклофенаком, – выраженная дозозависимая антиязвобогенная активность [193].

Молекулярная структура Аллила подтверждена ЯМР-, масс- и ИК-спектроскопией (Рисунок 2.3).



Примечание: Выбранные длины связей (Å) и углы (°): Zn1–O1 1.977(9), Zn1–O2 1.968(9), Zn1–N1 2.008(1), Zn1–N3 2.002(1); O1–Zn1–O2 99.2(4), O1–Zn1–N1 113.3(4), O1–Zn1–N3 111.4(4), O2–Zn1–N1 107.0(4), O2–Zn1–N3 109.9(4), N1–Zn1–N3 114.8(4)

Рисунок 2.3 – Молекулярная структура Аллила с вероятностью 50% [194]

Аллил-2 и *Пропаргил-2* – новые, ранее не исследованные соединения.

Для выполнения задач экспериментальной работы в сравнительном аспекте с референтными препаратами были исследованы 1% гели шести комплексов цинка производных N-алкенилимидазолов на основе Na-КМЦ. Для получения геля смешивали 0,05 г Na-КМЦ с 4,90 мл воды для инъекций. После набухания через 1,5-2 ч в готовую основу добавляли 0,05 г сухих веществ, тщательно перемешивая до полного растворения [36; 37].

Гидрогели на основе Na-КМЦ достаточно широко применяются в биомедицине, так как они просты в разработке и изготовлении и часто чувствительны к внешним воздействиям. Na-КМЦ $[C_6H_7O_2(OH)_3x(OCH_2COONa)_x]_n$ – натриевая соль простого эфира целлюлозы и гликолевой кислоты, однородный порошок белого или серого цвета вязкостью 1%, при 25°C – 2200 mPa.s. Растворы Na-КМЦ стойки к действию микроорганизмов, нетоксичны, физиологически инертны, устойчивы в широком интервале Рн, хорошо смешиваются с выделениями слизистой, что способствует лучшему всасыванию вещества, обладают высокой связывающей, диспергирующей, смачивающей и адгезивной способностью [56].

К достоинствам Na-КМЦ относятся: отсутствие раздражающего и сенсibiliзирующего действия, сравнительно низкая бактериоёмкость и достаточно высокая осмотическая активность. Na-КМЦ обладает пленкообразующими свойствами, способна образовывать при различных температурах как низко-, так и высоковязкие растворы [12], при этом бъемы образующихся эластичных гелей могут в десятки раз превосходить собственный объем полимера. Na-КМЦ, обладая биологической инертностью, легко взаимодействует с рядом неорганических веществ, что используется при создании комплексных лекарственных препаратов [19].

Перечисленные свойства делают Na-КМЦ подходящим носителем для геля. Кроме того, Na-КМЦ – полимер, обладающий гемостатической активностью и противоспаечными характеристиками [60]. 4% гель Na-КМЦ в виде препарата «Мезогель» (ООО «Линтекс», г. Санкт-Петербург) используется для профилактики и лечения спаечного процесса в хирургии.

В качестве референтных были взяты широко применяемые средства с ранозаживляющим, противоаллергическим, противовоспалительным, антимикробным, антиагрегантным и антикоагулянтным действием: Цинка сульфат, 0,5% гель на основе Na-КМЦ; Солкосерил[®], гель 10% для наружного применения (ООО «Меда Фарма», Швейцария); Метилурацил[®], мазь 10% для наружного применения (АО «Нижфарм», Россия); Акридерм[®], мазь для наружного применения 0,05% («Акрихин»); Метронидазол (химически чистая субстанция); Левомеколь[®], мазь для наружного применения (АО Нижфарм, Россия), Пентоксифиллин (ОАО «Дальхимфарм», Россия); Ацетилсалициловая кислота (АСК) в виде фармацевтической субстанции-порошка (фармацевтическая фабрика «Шандонг Ксинхуа Фармасьютикал Ко., ЛТД», Китай); Гепарин (ОАО «Синтез», Россия).

Цинка сульфат обладает иммуномодулирующим, антисептическим, вяжущим, подсушивающим, антибактериальным и местным противовоспалительным действием [36; 37; 151]. Изучение ранозаживляющего действия Цинка сульфата показало, что его применение в 1/10 от LD₅₀ вызывает значительное улучшение ангиогенеза, реэпителизации и ремоделирования тканей за счет сверхэкспрессии COLI alpha 1, TGF-beta 1, VEGF-A и FGF-7 [36; 37; 112].

Солкосерил[®] – стандартизированный высокоочищенный депротенизированный диализат из крови здоровых молочных телят, содержащий широкий спектр гликопротеидов, нуклеозидов, аминокислот, микроэлементов, олигопептидов. Солкосерил[®] относится к фармакотерапевтической группе препаратов, активизирующих обмен веществ и стимулирующих регенеративные процессы в тканях. Этот препарат является одним из спорных ЛС в мире с неизученным механизмом действия, так как содержит в своем составе более 200 природных веществ, включая широкий спектр низкомолекулярных компонентов клеточной массы и сыворотки крови с молекулярной массой 5000 Да (гликопротеиды, нуклеозиды и нуклеотиды, олигопептиды, аминокислоты), что затрудняет фармакокинетические и фармакодинамические исследования. Клиническая эффективность обусловлена синергизмом всех компонентов

препарата. Предполагают, что его основной мишенью является эндотелий, улучшение функции которого за счет активации протеасом может быть причиной многочисленных, в значительной степени неспецифических эффектов [191].

Солкосерил® активирует клеточный метаболизм за счет увеличения транспорта и накопления глюкозы и кислорода, а также повышения внутриклеточной утилизации. Препарат обладает ранозаживляющим эффектом и улучшает обменные процессы в коже, вследствие чего применяется для ускорения заживления ран, трофических язв, ожогов, обморожений.

Изучение активности депротеинизированных диализатов позволило выявить ряд ключевых фармакологических эффектов, обеспечивающих репаративные и регенерирующие свойства препарата: улучшение транспорта кислорода и глюкозы в зону ишемии, повышение синтеза внутриклеточного АТФ и увеличение доли окислительного фосфорилирования, вследствие чего активируются репаративные и регенеративные процессы в тканях, стимулируя пролиферацию фибробластов и восстановление коллагена в сосудистой стенке [190], а также пролиферацию мышечных клеток [173]. Под воздействием Солкосерила® уменьшается спазм артерий и артериол, происходит рост коллатеральных сосудов, увеличивается плотность капиллярной сети, повышается уровень микроциркуляции, что приводит к улучшению трофики тканей [156]. Усиление пролиферации и миграции фибробластов, повышение синтеза коллагена лежит в основе применения Солкосерила® при многих заболеваниях для усиления репаративного потенциала тканей. По литературным данным, Солкосерил® ускоряет заживление ран на 30% по сравнению с традиционно используемыми препаратами [25]. В форме мази препарат рекомендуют применять после появления грануляционной ткани и удаления раневого экссудата с целью образования защитной пленки на уязвимой поврежденной поверхности посредством содержащихся нейтральных фосфолипидных компонентов. Гелевая текстура, в свою очередь, способствует появлению свежих грануляций и ликвидации экссудата на начальной стадии лечения. Не рекомендуется применение Солкосерила® на некротизированных участках ран.

Действующее вещество *Метилурацила*[®] – диоксометилтетрагидропиримидин – обладает антикатаболическими свойствами, то есть, является обще клеточным стимулятором, активизирующим любой вид регенеративного процесса, как физиологический, так и репаративный, поэтому препарат включен в группу репаратантов и регенерантов. Метилурацил[®] обладает ранозаживляющими свойствами, стимулируя пролиферацию эпидермиса в зоне повреждения. Препарат активизирует внутриклеточные биосинтетические процессы, в частности, синтез нуклеиновых кислот и белков, улучшает регенерацию и стимулирует пролиферацию в клеточных популяциях, повышает рост и грануляционное созревание ткани [152].

Кроме того, препарат влияет на систему гуморального иммунитета, вызывая изменения клеточного состава периферической крови, проявляет противовоспалительное и фотопротекторное действие. Регенерирующие свойства Метилурацила[®] способствуют заживлению раневых и язвенных поверхностей, что делает рубец более эластичным, восстанавливая функцию ткани. Среди показаний к применению Метилурацила[®] имеются вялозаживающие поверхностные и глубокие раны, ожоги, в том числе лучевые, пролежни и трофические язвы, фотодерматиты.

Метилурацил (40 мг на 1 г) входит в состав многокомпонентной мази *Левомеколь*[®], содержащей также противомикробное средство Хлорамфеникол (7,5 мг на 1 г), и вспомогательные вещества, обеспечивающие равномерное распределение компонентов и облегчение нанесения и проникновения состава в ткани человека, – полиэтиленоксид-1500 – 190,5 мг, полиэтиленоксид-400 – 762 мг. Хлорамфеникол – антибиотик широкого спектра действия, нарушающий синтез белков микроорганизмов, со сравнительно медленным развитием резистентности к нему. Мазь представляет собой густую однородную массу молочно-белого цвета, легко смешивающуюся с водой и обладающую противовоспалительным, противоотечным и ранозаживляющим эффектами [69].

Акридерм[®] – отечественный глюкокортикостероид (ГКС) для местного применения с выраженным противовоспалительным, противоаллергическим,

противоотечным, противозудным действием, содержащий в своем составе бетаметазона дипропионат (Рисунок 2.4).

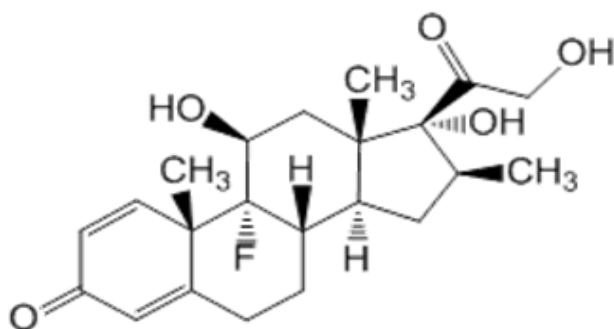


Рисунок 2.4 – Структурная формула бетаметазона дипропионата

Бетаметазон тормозит накопление лейкоцитов, высвобождение лизосомальных ферментов, медиаторов воспаления и снижает образование воспалительного отека. Препарат показан при дерматитах различной этиологии, экземе, псориазе, укусах насекомых, кожном зуде различного характера, уменьшает местную гиперемию и гипертермию кожи.

Механизм действия бетаметазона связан с усилением экспрессии липокортина, который угнетает фосфолипазу A_2 , блокирует образование арахидоновой кислоты и биосинтез эндоперекисей, простагландинов, лейкотриенов, способствующих развитию воспаления, аллергии и других патологических процессов. Препарат стабилизирует клеточные мембраны, предотвращает выход лизосомальных ферментов и уменьшает их концентрацию в очаге воспаления. Противоаллергический эффект развивается в результате снижения синтеза и секреции медиаторов аллергии, а также уменьшения количества тучных клеток, Т- и В-лимфоцитов.

Акридерм[®] при нанесении на кожу проявляет побочные эффекты: отечность лица, раздражение, жжение, сухость кожи, стероидные угри, стрии, истончение кожи, гипер- или гипопигментацию, петехии и экхимоз, замедленное заживление ран, повышенную потливость. При длительном применении могут развиваться атрофия кожи, местный гирсутизм, телеангиэктазия, пурпура, гипопигментация;

при нанесении на большие поверхности возможны системные проявления (гастрит и язвенное действие).

Метронидазол (2-(2-метил-5-нитро-1H-имидазол-1-ил)этанол) – синтетическое химиотерапевтическое средство, относится к 5-нитроимидазолам, обладает широким спектром действия в отношении анаэробных микроорганизмов и подавляет развитие простейших. Механизм действия заключается в ингибировании синтеза нуклеиновых кислот микроорганизмов восстановленной внутриклеточными транспортными протеинами анаэробных бактерий и простейших 5-нитрогруппой Метронидазола, что, в конечном счете, приводит к гибели микроорганизмов.

Как антибактериальное ЛС Метронидазол активен в отношении анаэробов: грамотрицательных, например, *Bacteroides spp.*, *Fusobacterium spp.* И грамположительных (чувствительные штаммы *Eubacterium spp.*, *Clostridium spp.*, *Peptococcus niger*, *Peptostreptococcus spp.*). Минимальная ингибирующая концентрация (МИК) для этих штаммов составляет 0,125-6,250 мкг/мл [18; 28].

Несмотря на то, что с момента синтеза Метронидазола прошло уже 60 лет, активно разрабатываются новые фармацевтические составы с Метронидазолом для лечения хронического эрозивного гастрита [47], синдрома избыточного бактериального роста в тонком кишечнике у больных СД 2 типа в сочетании с гастродуоденальным хеликобактериозом [45], предраковых и ранних стадий раковых заболеваний желудка [43; 44]. Метронидазол используют для профилактики развития инфекционно-воспалительных осложнений при трансанальной эндоскопической резекции прямой кишки по поводу опухолей [48], в офтальмологической практике для лечения блефаритов [52]. В сочетании с Мирамистином Метронидазол применяется для лечения экспериментальных гнойных ран [10; 62]. Метронидазол нашел применение в гинекологии в качестве ЛС с противовирусным, противомикробным, противопротозойным, иммуномодулирующим и противовоспалительным действием [15; 34; 38].

В стоматологии Метронидазол используется для лечения пародонтита [41; 42; 46], в фармацевтических композициях с другим лекарственными препаратами

– при воспалительных заболеваниях полости рта [11; 63].

Пентоксифиллин – производное метилксантина, ингибитор ФДЭ IV. Препарат улучшает реологические свойства крови, обладает противовоспалительным и антиоксидантным действием [175]. Изначально препарат применялся для лечения пациентов с перемежающей хромотой, что связано с его способностью снижать вязкость крови, улучшать процессы микроциркуляции и повышать оксигенацию тканей [158]. В дальнейшем спектр показаний существенно расширился и включил заболевания периферических сосудов, васкулиты и васкулопатии, обморожения, келоиды, рубцы, витилиго, лейшманиоз и др. [159]. Более 20 лет Пентоксифиллин используется для лечения осложнений, связанных с фиброзом [130]. Препарат также известен иммуномодулирующими, противовоспалительными, бронхолитическими и противовирусными свойствами [208]. Хорошая переносимость и безопасность, экономическая эффективность и минимальное лекарственное взаимодействие позволяют использовать его при многих дерматологических заболеваниях [159].

АСК – один из наиболее известных и изученных препаратов. В дозах ниже 300 мг препарат избирательно и необратимо ингибирует ЦОГ-1, что подавляет выработку простагландинов и тромбксана, и, таким образом, снижает воспаление и агрегацию тромбоцитов. Это позиционирует АСК как эффективное средство профилактики сердечно-сосудистых заболеваний [145]. Благодаря антитромботическим свойствам АСК предотвращает или уменьшает образование тромбов в артериях головного мозга или сердца, защищая от инсульта или инфаркта, но, в то же время, это может провоцировать потенциально опасные внутренние кровотечения.

Гепарин, используемый в медицине более 90 лет, представляет сложную смесь полисахаридов семейства гепарансульфатов с высокой степенью замещения сульфатом. Обнаруживается гепарин, главным образом, в гранулах тучных клеток. Фундаментальные и прикладные исследования гепарина выявили сложный фармакодинамический профиль, который выходит за рамки применения его в качестве антикоагулянта [197].

Структурные особенности гепарина позволяют избирательно взаимодействовать с множеством белков, что определяет, помимо антикоагулянтной, также противовирусную, противоопухолевую и противовоспалительную активность [107]. В ряде исследований продемонстрировано, что биомолекулы на основе гепарина способны связываться с VEGF, основным фактором роста фибробластов (bFGF), P-селектином, гепараназой, влияя, таким образом, на миграцию клеток, адгезию и ангиогенез [84; 89; 176].

2.4. Методы исследования

В проведенных нами исследованиях были применены общепринятые методы, подробно описанные в журнальных статьях, специальных руководствах или диссертациях.

2.4.1. Оценка острой накожной токсичности

Изучение местного раздражающего действия 1% гелей комплексов цинка на основе Na-КМЦ проводили при нанесении их на участок кожи крыс ($n = 6$) размером 4x4, составляющий около 5% общей поверхности кожи животных, из расчета 20 мг/см². За сутки до эксперимента выстригали шерсть по обе стороны от позвоночника, оставляя между участками шерстный покров шириной 2 см. Один бок служил для контроля, другой – для аппликации. Время экспозиции составляло 4 ч. Состояние кожных покровов оценивали через 1 и 16 ч после удаления остатков вещества с кожных покровов. Функциональные нарушения кожи оценивали по появлению эритемы различной степени выраженности [24].

2.4.2. Определение острой токсичности при внутрибрюшинном введении

Острую токсичность изучали на 120 белых нелинейных мышах-самцах

при однократном в/б введении водных растворов исследуемых веществ в возрастающих концентрациях. Каждую дозу испытывали на 6 животных массой 18-22 г. При отборе в эксперимент соблюдали метод случайной выборки с отбраковкой больных и некондиционных животных. Мыши содержались при постоянном доступе к воде и пище в индивидуальных клетках-ячейках. Учитывали динамику поведенческих реакций, характер, время возникновения, длительность и обратимость симптомов интоксикации. Регистрацию гибели животных осуществляли каждые 24 ч после введения веществ в течение 14 суток [69; 70]. LD₅₀ вычисляли по методу Миллера и Тейнтера [27; 54] и оценивали в соответствии с ГОСТом 12.1.007-76 [4; 69; 70].

2.4.3. Модель неинфицированной линейной раны

Модель неинфицированной линейной раны воспроизводили на 66 наркотизированных аутбредных крысах обоего пола массой 260-320 г. На участке спины животного шириной 20 мм и длиной 50 мм, недоступном для вылизывания, удаляли шерсть, после чего скальпелем наносили рану длиной 30 мм с точностью до 1 мм. Затем на равном расстоянии шелковой нитью накладывали 2 шва с таким расчетом, чтобы эпителий боковых краев раны не соприкасался, и эпителизация проходила от конечных краев раны (Рисунок 2.5) [33; 36; 37].



Рисунок 2.5 – Линейная рана у крысы после наложения швов

Животным опытных групп сразу после операции и далее однократно на протяжении 7 дней наносили на область раны 0,2 г гидрофильной основы (На-

КМЦ), 1% геля комплексных соединений цинка или референтные средства сравнения. У контрольных животных рана заживала «естественным» путем. Для оценки динамики заживления раны ежедневно в течение 7 суток измеряли ее размеры и отмечали состояние кожных покровов [36; 37].

2.4.4. Модель неинфицированной плоскостной раны

Для воспроизведения модели плоскостных кожных ран у 42 крыс обоего пола массой 250-320 г, находящихся под наркозом, выстригали шерсть и подшерсток на участке спины, недоступном для вылизывания, после чего вырезали кожный лоскут площадью 706,86 мм², удаляя также подкожную жировую клетчатку (Рисунок 2.6).



Рисунок 2.6 – Плоскостная рана у крысы (диаметр 300 мм)

Дефекты кожи оставляли открытыми на протяжении всего периода наблюдений. Заживление раневых повреждений у крыс оценивали, периодически снимая выкройки ран на кальку, затем взвешивая на аналитических весах. Местное консервативное лечение ран проводили открытым способом (без повязки) путем равномерного нанесения исследуемых веществ на раневую поверхность один раз в день в течение 28 суток [56; 97]. Измерение площади ран проводили 2 раза в неделю. Определяли среднюю массу «площади раны» путем взвешивания на аналитических весах плотного ватмана, размеры которого соответствовали размерам раны [56; 97].

Характер воспалительного процесса в каждой группе животных оценивали визуально. По результатам проведенных измерений рассчитывали процент сокращения площади ран по следующей формуле:

$$(S - S_n) / S \cdot 100\%,$$

где S – исходная площадь раны; S_n – площадь раны в день измерения [56; 97; 151].

2.4.5. Модель контактного дерматита

Для оценки противоаллергических свойств исследуемых веществ использовали модель экспериментального КД у крыс согласно «Руководству по проведению доклинических исследований лекарственных средств» (2012) [57]. В качестве аллергена применяли 2,4-динитрохлорбензол (2,4-ДНХБ, Sigma-Aldrich, США) в концентрации 5% в смеси 95% этилового спирта и ацетона осч (2:1), который наносили в течение 4 суток 2 раза в день с интервалом в 12 ч по 0,125 мл.

Реактивность кожи выражали в баллах от 0 до 5 по шкале кожных проб: 0 – отсутствие реакции; 0,5 – появление локальных очагов гиперемии; 1 – выраженная гиперемия; 2 – гиперемия и отечность; 3 – резкое покраснение и отек; 4 – образование эрозий; 5 – геморрагическая корка [59].

В контроле применение 2,4-ДНХБ вызывало уже после первой накожной аппликации у всех животных умеренную гиперемию (1-3 балла), а у части из них – отек тканей, что подтверждало развитие КД. После каждого последующего нанесения 2,4-ДНХБ тяжесть местных проявлений усугублялась, и к 5 дню было отмечено резкое повреждение кожных покровов с образованием геморрагической корки (4-5 баллов) (Рисунок 2.7).

Нанесение комплексов цинка и препарата сравнения Акридерм® начиналось на 5 день эксперимента и продолжалось 14 суток. По специальной шкале оценивали степень воспаления по специальной шкале и штангенциркулем на месте нанесения 2,4-ДНХБ измеряли толщину кожной складки (Рисунок 2.8.).

На 15 сутки эксперимента животные были выведены из эксперимента, после чего были взяты лоскуты кожи для гистологического исследования.



А

Б

Рисунок 2.7 – Состояние кожного покрова лабораторных животных.
А) до и Б) после 4-х дневных аппликаций раствора 2,4-ДНХБ



Рисунок 2.8 – Измерение толщины кожной складки у крыс при моделировании КД

2.4.6. Изучение противомикробной активности

2.4.6.1. Метод двукратных серийных разведений *in vitro*

При изучении бактериостатической и фунгистатической активности в опытах *in vitro* использовали метод двукратных серийных разведений в жидких питательных средах с последующим определением МИК² [18; 67].

²Исследования проведены в лаборатории микробиологических исследований ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений» Минобрнауки России (г. Москва) в рамках действующего договора о сотрудничестве № 22-С от 19.02.2020 г.

Микроорганизмы. В качестве тест-микроорганизмов использовали патогенные грамположительные бактерии *S. aureus* 209-P (ATCC 6538), грамотрицательные бактерии *E. coli* ATCC 25922, *Pt. vulgaris* ATCC 6896 и *P. aeruginosa* ATCC 9027, дрожжеподобные грибы *C. albicans* ATCC 10231 и мицелиальные грибы *M. canis* 352 [18; 67].

Питательные среды. При определении бактериостатической активности исследуемых образцов использовали мясо-пептонный бульон (МПБ), фунгистатической активности – жидкую среду Сабуро [18; 67].

Определение бактериостатической активности. Навеску субстанции или средства сравнения 32 мг взвешивали на лабораторных весах CAS CAUX 120, переносили в стерильную пробирку и стерилизовали в течение 1 часа 96% этиловым спиртом (смачивали поверхность субстанции). Затем в эту пробирку добавляли соответствующую питательную среду в количестве 4 мл, необходимым для создания исходной концентрации препарата – 8000 мкг/мл [18; 67].

Готовили ряд опытных пробирок с 2 мл питательной среды (МПБ). Затем, путем последовательного разведения образцов в питательной среде в 2 раза, готовили ряд убывающих концентраций. Последняя пробирка с чистой средой служила контролем. Затем все пробирки засеивали культурами микроорганизмов. Взвеси грамположительных и грамотрицательных бактерий готовили в изотоническом растворе натрия хлорида по бактериальному стандарту мутности ОСО 42-28-85-2020 (10 МЕ) (10^9 микробных тел/мл). Из первой пробирки, содержащей 10^9 микробных тел/мл, путем десятикратных разведений в изотоническом растворе натрия хлорида готовили ряд убывающих концентраций микроорганизмов: 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 . Затем в каждую опытную пробирку вносили по 0,2 мл взвеси, содержащей 10^4 микробных тел/мл (рабочая микробная нагрузка). Посевы инкубировали в термостате при температуре 37°C в течение 24 ч. Опыты проводили в трех параллелях [18; 67].

Определение фунгистатической активности. Образцы готовили так же, как и для определения бактериостатической активности, но использовали питательную среду Сабуро. Поскольку гриб *M. canis* имеет кожистую структуру,

сначала растирали культуру в стерильной фарфоровой ступке, смывали 2-3 мл изотонического раствора натрия хлорида и помещали в стерильную пробирку, а затем из полученной густой массы готовили взвесь грибов в изотоническом растворе натрия хлорида по бактериальному стандарту мутности ОСО 42-28-85-2020 (10 МЕ) (10^9 микробных тел/мл), после чего полученную взвесь разводили изотоническим раствором натрия хлорида в 20 раз. В опытные и контрольные пробирки засеивали по 0,2 мл полученной взвеси. Посевы инкубировали при температуре 30-32°C: дрожжеподобные грибы – 48 ч, мицелиальные грибы – 10-14 суток. Опыты проводили в трех параллелях [18; 67].

2.4.6.2. Раневая модель моноинфекции *in vivo*

При изучении антибактериального действия металлокомплексов цинка *in vivo* использовали *раневую модель моноинфекции, вызванную синегнойной палочкой*³.

Характеристика модельного штамма. В исследовании использовали штамм *P. aeruginosa* Ts 38-16, полученный из коллекции лаборатории Трансляционной биомедицины НИЦ эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи (г. Москва, Россия), выделенный из мокроты пациента в 2014 г. Штамм обладает устойчивостью к целому ряду антибиотиков.

Изучение МИК субстанций в отношении модельного штамма. Для определения МИК был использован метод микроразведений в бульоне. Бактериальный штамм *P. aeruginosa* Ts 38-16 выращивали на плотной питательной среде (агар Мюллера-Хинтона) в течение 20 часов при 37°C. Несколько (3-5) колоний исследуемого бактериального штамма собирали петлей и ресуспендировали в стерильном фосфатно-солевом буфере, чтобы мутность полученной суспензии соответствовала стандарту мутности МакФарланда $0,5 \times 10^8$

³Исследования проведены в лаборатории механизмов популяционной изменчивости патогенных микроорганизмов ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации (г. Москва) в рамках действующего договора о сотрудничестве № 47-С от 28.02.2023 г.

КОЕ/мл. Далее бактериальную культуру разбавляли в 100 раз жидкой питательной средой Мюллера-Хинтона (получается около 5×10^5 КОЕ/мл в лунке). Далее в лунках планшета титровали растворы исследуемых соединений от 4096 мкг/мл до 8 мкг/мл в бульоне Мюллера-Хинтона в объеме 50 мкл и добавляли 50 мкл подготовленной суспензии бактерии. Из лунок контроля роста бактерий сразу после смешивания проб отбирали аликвоту 10 мкл, делали 100-кратное разведение и высевали 100 мкл на чашки Петри с агаризованной средой Мюллера-Хинтона. Полученные смеси и чашки Петри инкубировали при 37°C в течение 16 ± 4 ч и определяли МИК, измеряя оптическую плотность OD600.

Приготовление питательной среды P. Medium B (PMB). На 1 л среды: пептона 20,0 г, глицерина 10,0 г, магния сульфата семиводного 1,5 г, агара бактериологического 1,5 г, гидрофосфата калия 1,5 г.

Приготовление раствора гидрофосфата калия 1,5%. В 100 мл воды растворяли 1,5 г гидрофосфата калия и автоклавировали в режиме 1 атм., 121°C 15 мин.

Приготовление среды. Пептон, глицерин и магния сульфат семиводный растворили в 900 мл воды, добавили агар, перемешали и автоклавировали в режиме: 1 атм., 121°C 15 мин. После остывания асептически добавили стерильный раствор гидрофосфата калия 1,5% и разливали по 15 мл в пластиковые чашки Петри.

Подготовка животной модели. Мышам за сутки до начала эксперимента удаляли шерстный покров машинкой для стрижки. По два раневых дефекта наносили на спинах животных под наркозом (Золетил, 45 мг/кг + Ксилазин, 7,5 мг/кг) специальным инструментом для биопсии ($d = 8$ мм, Medax, Italy). Через 5 минут на поверхность раны наносили по 50 мкл бактериальной суспензии *P. Aeruginosa* Ts 38-16 с содержанием 2×10^9 КОЕ/мл. При таком нанесении заражающая доза составила 10^8 КОЕ/рана.

Животные были разделены на 4 группы ($n = 6$): 1 группе наносили 1% гель Пилима-1, 2 группе – 1% гель Аллила, 3 группе – Na-КМЦ, 4 группе – референтный препарат Левомеколь®. Лечение начинали спустя 24 ч после

операции и заражения раны. На каждую рану наносили по 100 мкл соответствующего вещества, дозируя инсулиновым шприцем без иглы. Гели распределяли по поверхности раны полимерным наконечником для автоматических пипеток. Мазь Левомеколь® наносили полимерным наконечником «на глаз» ввиду невозможности точной дозировки препарата инсулиновыми шприцем или автоматической пипеткой. Общий осмотр животных в клетке проводили один раз в день в первой половине дня для выявления смертности и тяжелого состояния. Животных взвешивали раз в неделю. На 1 (до начала лечения), 3, 7, 14 сутки после заражения изучали патоморфологические изменения раневой поверхности и определяли ее площадь (планиметрия). Для этого штангенциркулем измеряли длину и ширину раневого дефекта, а затем высчитывали площадь по формуле площади эллипса (через оси):

$$S = \pi \frac{ab}{4}$$

Обсеменённость раневых поверхностей. На 1 (до начала лечения), 3, 7, 14 сутки делали смывы с раневой поверхности. Для этого по раневой поверхности 10 раз проводили зондом с ватным наконечником, смоченным в фосфатно-солевом буфере (PBS), и высевали разведения в объеме 100 мкл на среду РМВ с дальнейшим культивированием при температуре 37°C в течение 16±4 ч для оценки их обсемененности.

Некропсия. На 14 сутки у наркотизированных животных отбирали образцы крови пункцией сердца для оценки системной инфекции. Далее проводили эвтаназию животных методом цервикальной дислокации, извлекали кожные лоскуты области раневого дефекта. Свежеотобранную кровь в объёме 100 мкл высевали на чашки Петри с агаризованной средой РМВ, инкубировали в течение 16±4 ч при 37° С.

Один раневой дефект с прилегающей тканью погружали в стерильный раствор PBS со стальным шариком и подвергали механической гомогенизации (TissueLyser LT в режиме: 20 Гц, 3,5 мин). Гомогенаты центрифугировали в режиме 3000 g 5 мин и высевали разведения супернатантов на плотную

питательную среду. Чашки с посевами инкубировали в течение 16 ± 4 ч при 37°C . Второй раневой дефект фиксировали в течение 24 ч в 10% растворе формалина, после чего передавали для гистологического анализа. Подсчёт колоний во всех образцах осуществляли в два этапа: 1) общий подсчёт колоний; 2) подсчёт колоний, флуоресцирующих в УФ-свете.

2.4.7. Гистоморфологические исследования

Гистологическое изучение биоптатов кожи производили на 8 сутки от начала лечения (линейная рана), 14 сутки (инфицированная рана), 15 сутки (КД), 29 сутки (плоскостная рана). Забор материала осуществляли путем иссечения участка мягких тканей дна и прилежащего края раны. Взятый материал сразу фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина с последующей проводкой по восходящим спиртам и заливкой в парафин по стандартной методике. Затем изготавливали гистологические срезы толщиной 5-7 мкм и окрашивали их гематоксилином и эозином или по Ван-Гизону [56; 97].

На гистологических срезах раневых биоптатов кожи оценивали зрелость грануляционной ткани, степень эпителизации и ангиогенеза, выраженность лейкоцитарной реакции, наличие кровоизлияний с оценкой каждого показателя по баллам. Зрелость грануляционной ткани и степень ангиогенеза оценивали по 3-балльной шкале: 0 – нет, 1 – слабо выражена, 2 – умеренно выражена, 3 – выражена. Полную эпителизацию оценивали в 3 балла, неполную – 0 баллов. Выраженность лейкоцитарной реакции оценивали по наличию (0 баллов) или отсутствию нагноения (1 балл), отсутствие кровоизлияний – 1 балл, наличие – 0 баллов [33].

На гистологических срезах кожных лоскутов при КД оценивали степень заживления по таким морфологическим признакам, как образование или отсутствие эрозии и некроза, наличие грануляционной ткани и ее зрелость, эпителизация, присутствие и характер воспалительного инфильтрата [13].

2.4.8. Оценка процессов микроциркуляции⁴

Исследование процессов кожной микроциркуляции проводили через 15, 30 и 45 мин после в/б введения исследуемого вещества в дозе 20 мг/кг. Для эксперимента было отобрано 14 крыс-самцов одинакового возраста со средней двигательной активностью и низкой эмоциональностью (согласно теста «открытое поле»), которые были разделены на 2 группы ($n = 7$): контрольная, животным которой однократно в/б вводили физиологический раствор объёмом 0,2 мл и экспериментальная, животным которой вводили в/б исследуемое вещество в дозе 20 мг/кг. Регистрацию микроциркуляции проводили при помощи лазерного анализатора кровотока «Лазма-МЦ» (НПП «Лазма», Россия) (Рисунок 2.9) [29].

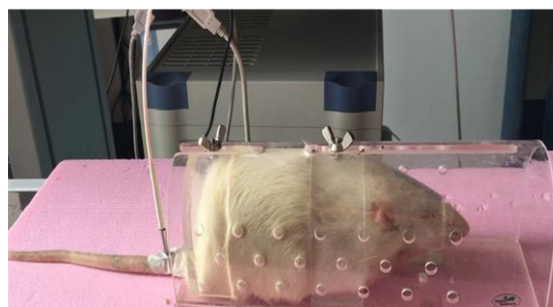
В качестве параметров, анализируемых методом лазерной доплеровской флоуметрии (ЛДФ), регистрировали показатель перфузии (ПМ, перф. Ед.) и определяли амплитуды колебаний кровотока разных частотных диапазонов. Наиболее низкая частота (0,0095-0,02 Гц) характерна для эндотелиальных колебаний, обусловленных периодическими сокращениями цитоскелета эндотелиоцитов [53].

Эндотелиальные колебания отражают воздействие гуморально-метаболических факторов на микрососудистое русло и характеризуют состояние nutritивного кровотока. Колебания в частотах 0,07-0,15 Гц, или миогенные колебания, обусловлены периодической активностью гладкомышечных волокон артериол, приводящих к изменению диаметра их просвета (вазомоции). На такую периодичность констрикции и дилатации микрососудов накладываются нейрогенные колебания (0,02-0,046 Гц), отражающие симпатическую регуляторную активность [53].

⁴Исследования проведены на базе Центра коллективного пользования научным оборудованием «Экспериментальная физиология и биофизика» кафедры физиологии человека и животных и биофизики Крымского Федерального Университета имени В.И. Вернадского (г. Симферополь).



А



Б

Примечание: А – Внешний вид лазерного анализатора кровотока Лазма МЦ-1. Б – Оптоволоконный зонд на хвосте крысы

Рисунок 2.9 – Регистрация параметров микроциркуляции у крысы

К высокочастотным относятся дыхательные (0,15-0,4 Гц) и пульсовые (0,8-0,16 Гц) колебания. Дыхательные волны представлены периодическими изменениями давления в венозном отделе сосудистого русла, вызываемыми дыхательными экскурсиями грудной клетки. Пульсовые колебания кровотока обусловлены перепадами внутрисосудистого давления, которые в большей или меньшей степени синхронизированы с кардиоритмом [20; 53].

Ввиду разброса колебаний амплитуд ритмов (А), их нормированные характеристики анализировали по формуле:

$$A_{\text{норм}} = A/3\sigma,$$

где А – амплитуда колебаний в диапазоне 0,02-2 Гц, что позволяет исключить влияние нестандартных условий проведения исследований [20; 22; 29].

2.4.9. Определение ферментов антиоксидантной системы

При изучении ферментов антиоксидантной системы чаще всего анализируется динамика изменения активности каталазы и пероксидазы [7].

Активность *каталазы* измеряли спектрофотометрическим методом по убыванию оптической плотности в области светопоглощения пероксида водорода при 240 нм. Измерения проводили против контрольной пробы, не содержащей перекиси, на спектрофотометре Beckman DU-50B [69].

Активность *пероксидазы* определяли по реакции с йодидом калия. Течение йодпероксидазной реакции наблюдали в течение 20 мин, регистрируя накопление продукта окисления йодида – трийодида (I_3^-) – по увеличению оптической плотности при длине волны 280 нм на спектрофотометре Beckman DU-50 [69].

2.4.10. Оценка системы гемостаза⁵

Изучение показателей коагулограммы, активации и агрегации тромбоцитов проведены *in vitro* на крови здоровых мужчин-доноров ($n = 32$) в возрасте 18-24 лет. Забор крови проводили из кубитальной вены с использованием систем вакуумного забора крови BD Vacutainer® (Becton Dickinson and Company, США). В качестве стабилизатора венозной крови использовали 3,8% раствор цитрата натрия в соотношении 9:1 [26].

Все тесты проводили на обогащенной или обедненной тромбоцитами плазме. Образцы богатой тромбоцитами плазмы получали центрифугированием цитратной крови при 1000 об/мин в течение 10 мин, бестромбоцитарной плазмы – путем центрифугирования при 3000 об/мин в течение 20 мин [26].

Исследование влияния на агрегацию тромбоцитов проводили по методу Born на агрегометре «АТ-02» (НПФ «Медтех», Россия). В качестве индукторов

⁵Исследования проведены на базе ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (г. Уфа) в рамках действующего договора о сотрудничестве № 11/73.01-12/2022-ЦКТ от 21.11.2022 г.

агрегации использовали аденозиндифосфат (АДФ) в концентрации 20 мкг/мл и коллаген в концентрации 5 мг/мл («Технология-Стандарт», Россия). Оценивали максимальную амплитуду агрегации, скорость агрегации, время достижения максимальной амплитуды и дезагрегацию в присутствии изучаемых веществ при агрегации тромбоцитов, индуцированной АДФ. При коллаген-индуцированной агрегации тромбоцитов оценивали латентный период, во время которого происходит активация фосфолипазы C, что приводит к образованию вторичных посредников, вследствие чего развивается секреция тромбоцитарных гранул и синтез тромбоксана A₂ [26].

Маркер активации тромбоцитов CD62p (P-селектин) измеряли цитофлуориметрическим методом на приборе NovoCyte (Agilent, США) с использованием оригинального программного обеспечения. Для этого образцы богатой тромбоцитами плазмы разводили в 100 раз 0,15 М фосфатно-солевым буферным раствором Рн 7,0-7,5, вносили исследуемые вещества в конечной концентрации 2×10^{-3} моль/л и инкубировали в течение 5 мин. Для активации тромбоцитов в пробы на 15 мин вносили АДФ до конечной концентрации 20 мкг/мл, после чего клетки фиксировали добавлением 1% раствора формалина [26].

После инкубации образцы богатой тромбоцитами плазмы окрашивали 20 мин при комнатной температуре мышиными моноклональными антителами CD62, меченными алофикоцианином (Becton Dickinson, США) согласно рекомендациям производителя. Для каждой пробы собирали не менее 10 тыс. событий. «Тромбоцитарное окно» выделяли по параметрам прямого (FCS) и малоугольного (SSC) светорассеяний в логарифмической шкале координат. Количество CD62-позитивных клеток оценивали в %. Определение антикоагуляционной активности проводили общепризнанными клоттинговыми тестами на турбидиметрическом гемокоагулометре Solar CGL 2110 (ЗАО «СОЛАР», Россия). Измеряли показатели активированного частичного тромбопластинового времени (АПТВ), протромбинового времени (ПВ) и концентрации фибриногена по А. Clauss. Определение антикоагулянтной

активности исследуемых веществ проводили в концентрации 5×10^{-4} г/л. В работе использовали реактивы производства «Технология-Стандарт» (г. Барнаул, Россия) [26].

2.4.11. Статистическая обработка экспериментальных данных

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью компьютерной программы Microsoft Excel XP в среде Windows XP и STATISTICA 10,0 (StatSoft Inc, США). Для вариационного ряда выборки вычисляли среднюю арифметическую величину (M) и ее ошибку (m) [69; 70]. Нормальность выборок проверяли по критерию Шапиро-Уилка. Так как выборки имели близкое к нормальному распределение, значимость различий между экспериментальными группами определяли с помощью одномерного дисперсионного анализа с дальнейшей обработкой методом множественных сравнений Стьюдента с поправкой Бонферрони.

Статистическая обработка результатов раневой модели моноинфекции осуществлялась в программах GraphPad Prism 9.3.1 и Microsoft Excel. Для статистической обработки параметров микроциркуляции и гемостаза применялись непараметрические методы статистики, поскольку распределение значений переменных отличалось от нормального [53].

Достоверность статистических различий параметров микроциркуляции между контрольной и экспериментальной группами с различным интервалом измерений (15, 30 и 45 мин) определяли с помощью критерия Манна-Уитни при $p \leq 0,05$. Результаты по гемостазу представлены в виде медианы, 25 и 75 перцентилей. Дисперсионный анализ проводили с помощью критерия Краскела-Уоллиса. Критический уровень значимости p для статистических критериев принимали равным 0,05 [26].

ГЛАВА 3. ОЦЕНКА ТОКСИЧНОСТИ И ДЕРМАТОТРОПНОГО ДЕЙСТВИЯ МЕТАЛЛОКОМПЛЕКСОВ ЦИНКА ПРОИЗВОДНЫХ N-АЛКЕНИЛИМИДАЗОЛОВ

3.1. Оценка токсичности металлокомплексов цинка производных N-алкенилимидазолов

Определение токсичности является важным этапом доклинических исследований, позволяющим определить безопасность и степень повреждающего действия ЛВ. В наших исследованиях изучали токсичность шести металлокомплексов цинка производных N-алкенилимидазолов при нанесении на кожу крыс и LD₅₀ при в/б введении мышам двух комплексов под шифрами Аллим-2 и Пропаргил-2.

3.1.1. Оценка токсичности металлокомплексов цинка производных N-алкенилимидазолов при накожном нанесении

Оценка состояния кожных покровов крыс через 1 и 16 ч после нанесения 1% гелей Ацизола, Пилима-1, Аллила, Аллила-2, Аллима-2 и Пропаргила-2 на основе Na-КМЦ не выявила появлений эритемы, отека и других признаков воспаления или раздражающего действия.

3.1.2. Оценка острой токсичности металлокомплексов цинка производных N-алкенилимидазолов при внутрибрюшинном введении

Острую токсичность Аллила-2 и Пропаргила-2 определяли на 120 белых нелинейных мышах-самцах массой 18-20 г при однократном в/б введении. LD₅₀ составили 160 и 125 мг/кг для Аллила-2 и Пропаргила-2 соответственно. Согласно классификации химических веществ соединения относятся к умеренно токсичным [4; 69; 70].

3.2. Сравнительное изучение ранозаживляющего действия металлокомплексов цинка производных N-алкенилимидазолов

Изучение ранозаживления инфицированной и неинфицированной кожных ран представляет определенный интерес и является предметом настоящего исследования. Описанные выше молекулярные механизмы регенерации и репарации кожи, в которых цинк играет одну из главных ролей, позволяет предположить наличие ранозаживляющего действия у комплексов цинка производных N-алкенилимидазолов. Для проверки своей гипотезы мы изучили влияние шести соединений на скорость заживления линейных и плоскостных кожных ран у крыс.

3.2.1. Оценка ранозаживляющего действия на модели неинфицированной линейной раны

Эксперименты проведены на 66 крысах, которые были разделены на 11 групп по 6 животных в каждой с равномерным распределением по полу. В течение 2-3 суток после проведения операции у животных в области раны отмечалась гиперемия, грануляционная ткань темно-красного цвета, грубая и жесткая корка струпа. Масса тела крыс опытных групп (267-320 г) статистически значимо не изменялась в течение 8 дней эксперимента по сравнению с контрольными животными (Таблица 3.1).

Для оценки состояния регенеративных процессов при заживлении линейной раны проводили ежедневное измерение ее длины. Внешний вид раны на 8-е сутки наблюдения представлен на Рисунке 3.1.

Ранозаживляющее действие комплексов цинка сравнивали с группой, получавшей Na-КМЦ, а референтных препаратов – с контрольной группой животных, у которых рана заживала естественным путем. В экспериментальных группах не наблюдали рецидива воспаления, негативных местных и общих реакций.

Таблица 3.1 – Изменение массы тела крыс при моделировании линейной раны

Вещества	Время эксперимента, сутки			
	1	3	5	8
Контроль	300,3±35,66	297,3±36,64	302,4±45,45	310,4±49,00
Na-КМЦ	306,5±40,21	297,7±33,50	301,3±50,48	315,7±44,03
Ацизол	296,3±44,34	290,4±46,66	300,3±48,12	310,5±45,06
Пилим-1	286,3±35,76	290,5±43,47	296,9±43,76	299,5±56,07
Аллил	302,5±30,36	290,6±36,46	299,9±35,04	308,5±46,46
Аллил-2	267,4±36,51	270,4±37,34	277,5±46,57	280,5±46,67
Аллим-2	320,4±43,56	310,3±45,34	315,3±54,74	324,4±45,56
Пропаргил-2	274,4±45,64	277,4±34,60	280,4±45,68	290,4±35,67
Сульфат цинка	320,4±38,65	317,4±39,81	316,3±34,56	318,5±47,55
Солкосерил®	267,3±36,54	269,7±39,56	275,4±49,00	278,4±47,87
Метилурацил®	288,4±26,31	280,4±33,26	287,8±36,97	290,8±51,37

Примечание. Различия недостоверны ($p > 0,05$) (t-критерий Стьюдента).

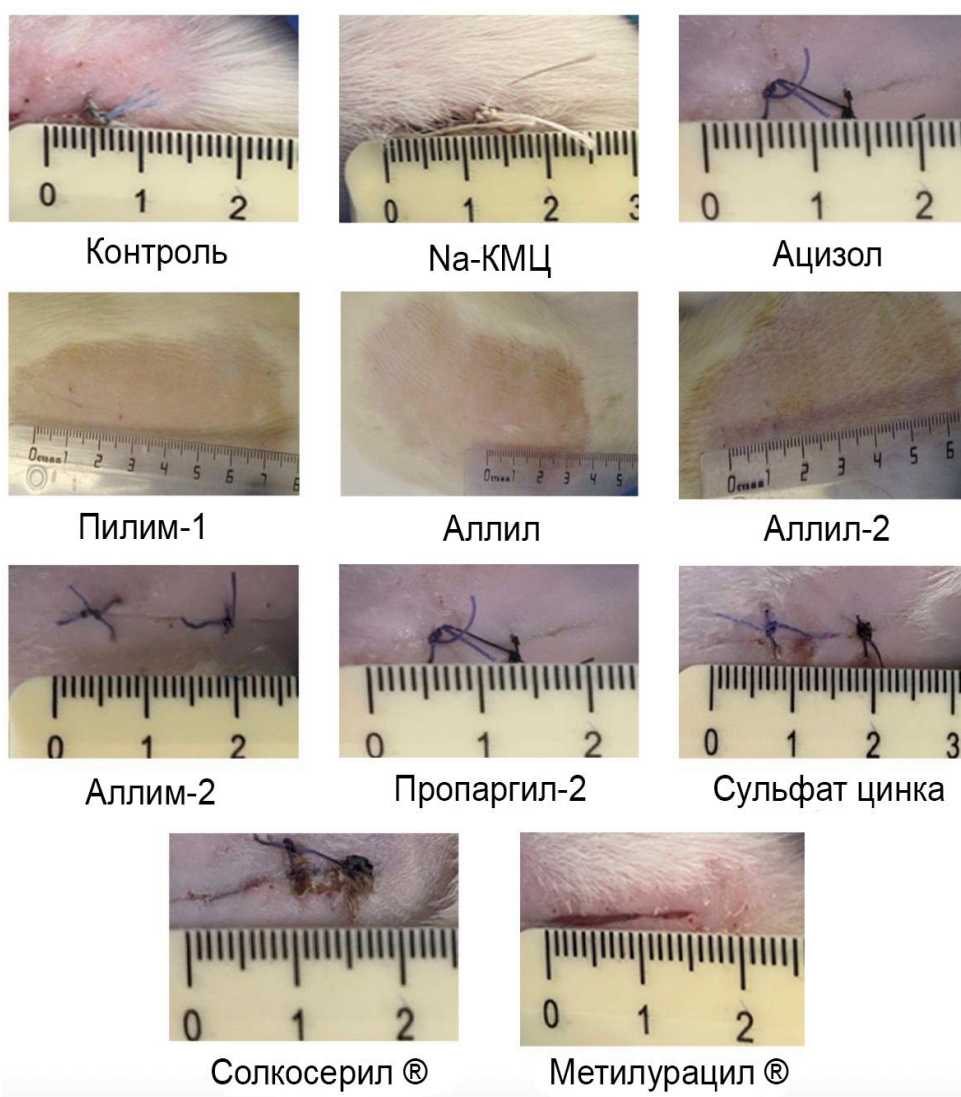


Рисунок 3.1 – Внешний вид линейной раны на 8 сутки наблюдения [97]

Начиная с 5 суток после операции во всех группах, получавших комплексные соединения цинка, наблюдалось статистически значимое уменьшение размеров раны по сравнению с группой Na-КМЦ (Таблица 3.2).

Таблица 3.2 – Изменение длины (L, мм) линейной раны (n = 6)

Показатели	Время эксперимента, сутки						
	2	3	4	5	6	7	8
Контроль							
L раны, мм	30,0±0,05	29,0±0,70	27,8±1,24	26,8±0,7	17,5±1,77	12,7±2,29	3,7±1,06
% заживления	0	3	7	11	42	58	88
Na-КМЦ							
L раны, мм	29,2±0,54	27,5±1,23	26,2±1,54	26,0±1,51	22,2±2,15	12,2±2,15	9,8±1,92
% заживления	3	8	13	13*	26*	59*	67*
Ацизол							
L раны, мм	29,5±0,54	26,5±0,81	24,7±0,61	18,3±1,23	11,3±2,65	3,7±1,51	1,3±0,71
% заживления	2	12	18	39*	62*	88*	96*
Пилим-1							
L раны, мм	28,5±0,56	27,8±0,48	26,5±0,22	12,7±2,29	7,2±1,87	2,2±0,95	0,8±0,54
% заживления	5	7	12	58*	76*	93*	97*
Аллил							
L раны, мм	28,3±0,84	26,2±0,75	25,3±0,84	8,3±1,45	3,0±1,21	0,8±0,48	0
% заживления	6	13	16	72*	90*	97*	100*
Аллил-2							
L раны, мм	29,5±0,54	27,8±0,87	26,0±0,86	14,8±2,21	7,2±1,05	3,5±1,23	1,0±0,82
% заживления	2	7	13	51*	76*	88*	97*
Аллим-2							
L раны, мм	27,5±0,42	26,7±0,84	22,5±1,69	15,2±1,19	11,3±1,61	4,0±1,83	2,2±1,10
% заживления	8	11	25	49*	62*	87*	93*
Пропаргил-2							
L раны, мм	28,5±2,17	27,8±2,4	26,8±3,97	23,3±3,93	9,8±3,05	6,0±2,08	2,5±1,50
% заживления	5	7	11	22	67*	80*	92*
Цинка сульфат							
L раны, см	29,8±0,17	27,2±0,70	26,3±0,88	21,5±3,23	12,3±2,4	10,0±3,6	4,3±1,69
% заживления	1	9	12	28	59	67	86
Солкосерил®							
L раны, см	29,8±0,18	28,5±0,88	26,0±0,70	22±1,77	9,5±1,41	7,3±1,41	5,0±1,24
% заживления	1	5	13	27*	68*	76	83
Метилурацил®							
L раны, см	30,0±0,05	28,0±1,06	26,5±1,77	19,5±1,59	10,5±1,59	9,3±1,94	4,3±1,59
% заживления	0	7	12	35*	65*	69	86
Примечание. Результаты в таблице представлены как средняя величина ± стандартная ошибка среднего ($M \pm m$). * – статистически значимые различия ($p \leq 0,05$) по отношению к контролю или Na-КМЦ. % заживления представлен по отношению к исходной длине раны [36; 37].							

На 8 сутки уменьшение длины раны в группах животных, получавших Ацизол, Пилим-1, Аллил, Аллил-2, Аллим-2 и Пропаргил-2 составило 96, 97, 100,

97, 93, 92% соответственно по сравнению с исходными размерами. Полной регенерации раны в группе Na-КМЦ к концу срока наблюдения не наблюдалось, заживление раны составляло 67% от исходной длины [33; 36; 37]. У животных, которым обрабатывали раны 0,5% гелем Цинка сульфата, Солкосерилом[®] и Метилурацилом[®], заживление на 8 сутки наблюдения составило 86, 83 и 86% соответственно, в контрольной группе – 88%. На 5 и 6 сутки в группе животных, получавших Солкосерил[®] и Метилурацил[®], наблюдались значимые различия с контрольной группой. Заживление ран в этих группах составило 27 и 68% (Солкосерил[®]), 35 и 65% (Метилурацил[®]) соответственно [33]. Следовательно, изученные нами комплексные соединения цинка демонстрируют более выраженный (на 92-100% от исходного размера раны) ранозаживляющий эффект, чем референтные средства сравнения (83-86%) [23; 36; 37; 97].

3.2.2. Оценка ранозаживляющего действия на модели неинфицированной плоскостной раны

Эксперименты проведены на 42 крысах, которые были разделены на 7 групп по 6 животных в каждой. Ранозаживляющее действие металлокомплексов цинка Ацизола, Пилима-1, Аллила, Аллила-2 сравнивали с группой животных, получавшей Na-КМЦ, эффект Метилурацила[®] и 0,5% геля Цинка сульфата – с контрольной группой животных, у которых рана заживала естественным путем. Аллим-2 и Пропаргил-2 мы исключили из дальнейшего изучения, так как на модели линейной раны у них был менее выраженный эффект, чем у остальных соединений цинка. Масса тела крыс опытных групп статистически значимо не изменялась в течение эксперимента по сравнению с контрольными животными (Таблица 3.3).

К 10 суткам эксперимента отмечалась положительная динамика в процессе регенерации во всех исследуемых группах животных (Таблица 3.4). Фоторяд, демонстрирующий внешний вид плоскостных ран у крыс в процессе наблюдения, представлен в Приложении А.

Таблица 3.3 – Изменение массы тела крыс при моделировании плоскостной раны

Вещества	Время эксперимента, сутки				
	3	10	17	24	29
Контроль	269,5±32,40	271,7±37,37	278,3±34,92	280,5±35,46	282,7±54,35
Na-КМЦ	320,3±34,46	326,5±36,78	327,5±33,56	330,3±33,45	332,4±36,78
Ацизол	269,1±32,40	271,6±37,66	278,3±34,91	282,3±32,56	284,5±33,38
Пилим-1	253,0±23,28	268,5±35,26	272,1±33,94	275,2±36,78	276,9±34,70
Аллил	282,2±45,34	285,4±34,78	288,8±37,98	289,1±45,24	292,8±35,67
Аллил-2	290,3±34,56	292,5±36,76	296,9±45,89	299,5±34,98	301,6±37,76
Цинка сульфат	288,5±45,43	290,8±37,87	292,6±36,45	294,6±33,56	298,7±38,90
Метилурацил®	253,7±23,28	268,5±35,25	272,2±33,94	275,4±39,45	277,8±40,12

Примечание. Различия недостоверны ($p > 0,05$) (t-критерий Стьюдента).

Таблица 3.4 – Изменение площади (S , мм²) плоскостных ран у крыс ($n = 6$)

Показатели	Время эксперимента, сутки							
	3	7	10	14	17	21	24	29
Контроль								
S , мм ²	743,4±103,1	353,4±48,59	190,9±16,7	114,3±6,56	77,8±17,79	30,6±4,71	22,4±5,89	12,9±2,14
%	-5	50	73	83	89	96	97	98
Na-КМЦ								
S , мм ²	659,6±104,9	461,9±90,95	279,2±25,2	92,4±13,50	75,1±6,54	42,6±6,54	18,2±7,07	2,6±0,53
%	8	35	60	87	89	94	97	99
Ацизол								
S , мм ²	780,1±121,2	799,3±136,7	338,4±35,3	140,6±18,04	96,0±7,07	56,6±2,65	17,1±6,01	0,5±0,20
%	-10	-21*	52	80	86	92	98	100*
Пилим-1								
S , мм ²	625,9±97,04	455,7±87,45	176,5±68,6	70,1±13,08	63,8±17,5	21,3±7,60	2,1±0,33	0
%	11	36	75*	90	91	97*	100*	100*
Аллил								
S , мм ²	806,0±208,0	466,6±89,03	244,6±67,0	103,3±17,5	70,6±8,66	5,5±2,47	2,0±0,33	0,5±0,10
%	-14	34	65	85	90	99*	100*	100*
Аллил-2								
S , мм ²	632,0±46,79	375,2±63,84	153,7±9,68	125,5±10,59	60,1±11,17	27,0±6,17	15,9±3,62	3,5±1,29
%	11	47	78	82	91	96	98	99
Цинка сульфат								
S , мм ²	841,2±196,4	652,1±206,6	358,7±79,43	130,8±23,44	87,8±18,15	43,0±6,48	21,8±4,51	13,5±5,19
%	-[]	8	49	81	88	93	96	98
Метилурацил®								
S , мм ²	855,8±245,8	612,9±244,7	274,0±99,5	126,1±13,08	123,5±9,5	80,4±13,08	34,3±12,0	6,7±0,5
%	-21	13	61	82	83*	89*	95	99

Примечание. Результаты в таблице представлены как средняя величина ± стандартная ошибка среднего ($M \pm m$). * – статистически значимые различия ($p \leq 0,05$) по отношению к контролю или Na-КМЦ. % заживления представлен по отношению к исходной площади раны [97].

Увеличение площади раны по сравнению с исходным значением на 3 сутки в контрольной группе и в группах животных, получавших лечение Метилурацилом[®], 0,5% гелем Цинка сульфатом и Аллилом, и на 3, 7 сутки в группе Ацизола может быть связано с индивидуальной гиперреактивной реакцией отдельных особей на стадии острого воспаления, проявившейся в виде сильной отечности участка поражения интактных тканей, вследствие чего края раны значительно увеличились в размерах [56; 97].

Начиная с 21 суток лечения, в группах Пилима-1 и Аллила наблюдались статистически значимые положительные различия по сравнению с группой Na-КМЦ. У животных, получавших Пилим-1, более значимое заживление (75% от исходного размера раны) по сравнению с этой группой наблюдалось на 10 сутки лечения. 100% заживление раны в этих группах наблюдалось на 24 сутки после начала лечения [56].

Следовательно, местное применение 1% гелей комплексов цинка с N-алилимидазолом и N-изопропенилимидазолом сокращает время заживления неинфицированной плоскостной кожной раны у крыс [97].

3.3. Сравнительное изучение активности металлокомплексов цинка производных N-алкенилимидазолов на модели контактного дерматита

Длительный и выраженный воспалительный процесс создает риск замедленного заживления ран. Воспаление способствует очищению раны от поврежденных клеток, расширению сосудов и экстравазации воспалительных клеток. Однако образование большого количества макрофагов и нейтрофилов в течение длительного времени может привести к переходу воспаления в хроническую форму. В связи с этим, применение веществ с противовоспалительным действием способствует ускорению процессов ранозаживления. В настоящее время с этой целью чаще всего используют ГКС благодаря их выраженным противовоспалительным, противоаллергическим, противозудным и другим положительным эффектам. Однако вероятность

развития серьезных нежелательных явлений при их применении порождает необходимость поиска новых безопасных средств, направленных на восстановление барьерной функции эпидермиса, и обладающих противовоспалительным эффектом.

Для Пилима-1 показана сопоставимая с Диклофенаком способность ингибировать экссудативное воспаление, индуцированное каррагенином и ПАФ [193]. Кроме того, известно, что цинксодержащие препараты обладают противовоспалительным и противоаллергическим действием и в некоторых случаях при умеренно выраженном течении КД оказываются эффективными даже при монотерапии, поэтому представляло определенный интерес изучить действие металлокомплексов цинка на модели КД у крыс.

Эксперименты проведены на 54 крысах-самцах. Активность металлокомплексов цинка производных N-алкенилимидазола на модели КД при накожном нанесении сравнивали с действием Акридерма[®]. Спустя 4 суток после аппликаций раствора 2,4-ДНХБ у животных образовался очаг воспаления с признаками КД, проявившегося появлением плотных геморрагических корок. Кожа вокруг очага поражения приобрела гиперемированный и отечный вид (Приложение Б).

Размеры кожной складки после нанесения 2,4-ДНХБ в течение 4 суток приведены в таблице 3.5. На 5 сутки после моделирования КД у животных всех групп толщина кожной складки статистически значимо уменьшалась по сравнению с исходными размерами (Таблица 3.6). В опытных группах сохранялась картина развитой патологии, при этом полученные результаты статистически не отличались от данных в группе Na-КМЦ. Аппликации Акридерма[®] уменьшали толщину кожной складки у крыс на 52% по сравнению с исходной величиной, что статистически значимо отличалось от контрольной группы.

На 10 сутки лечения толщина кожной складки в группах животных, получавших комплексы цинка, также статистически значимо не отличалась от группы Na-КМЦ.

Таблица 3.5 – Толщина кожной складки у крыс после аппликаций 2,4-ДНХБ (n=6)

Исследуемые вещества	Толщина кожной складки, мм		
	Поперечная	Продольная	Сумма
Контроль	8,3±1,43	10,2±2,32	18,5±2,22
На-КМЦ	8,0±0,46	9,1±1,32	17,1±2,42
Ацизол	9,3±1,45	8,7±1,23	18,0±1,12
Пилим-1	10,1±2,01	9,7±1,76	19,8±1,78
Аллил	9,5±1,45	9,0±1,32	18,5±1,36
Аллил-2	8,8±1,37	8,3±2,02	17,1±1,86
Аллим	8,7±1,24	8,4±1,13	17,1±3,15
Пропаргил-2	7,4±1,65	8,8±1,23	16,2±1,44
Акридерм®	10,7±1,45	9,3±1,35	20,0±1,64

Примечание. Данные представлены как $M \pm m$. M – значение средней толщины кожной складки, мм, m – ошибка средней.

Таблица 3.6 – Изменение толщины кожной складки у экспериментальных животных на модели КД (n = 6)

Вещества	Толщина (продольная + поперечная) кожной складки, мм				
	Исходная	5-е сутки		10-е сутки	
	$M \pm m$	$M \pm m$	%	$M \pm m$	%
Контроль	18,5±2,22	12,0±2,11	65	7,8±0,75	42
На-КМЦ	17,1±2,42	10,5±1,41	61	7,6±0,68	45
Ацизол	18,0±1,12	12,7±2,01	71	6,9±0,88	36
Пилим-1	19,8±1,78	11,7±1,65	59	7,2±0,95	36
Аллил	18,5±1,36	12,9±1,45	70	8,0±1,12	43
Аллил-2	17,1±3,15	11,3±0,41	66	8,7±0,46	51
Аллим-2	18,7±4,21	16,7±3,25	89	8,9±1,16	48
Пропаргил-2	16,2±2,33	10,1±1,33	62	11,1±2,43	69
Акридерм®	20,0±1,64	9,6±1,23	48*	5,4±0,89	27*

Примечание. M – значение средней толщины кожной складки, мм, m – ошибка средней, % по отношению к исходной толщине кожной складки. Различия достоверны по сравнению с исходной толщиной кожной складки, принятой за 100% ($p \leq 0,05$). * – достоверные различия по сравнению с контролем, принятым за 100% ($p \leq 0,05$).

У животных, которым наносили аппликации Акридерма®, наблюдалось отхождение геморрагической корки и регенерация пораженного участка кожи. Толщина кожной складки уменьшалась на 73%, что статистически достоверно отличалось от контрольной группы.

Состояние кожного покрова у крыс на 10 сутки лечения демонстрирует фоторяд (Приложение В).

Следовательно, на модели КД у крыс комплексные соединения цинка не оказывали защитного действия в сравнении с референтным препаратом Акридерм[®], обладающим выраженным противоаллергическим и противовоспалительным действием. Однако, учитывая имеющиеся многочисленные данные о противовоспалительном действии цинка, изучение влияния этих соединений на развитие воспаления на других моделях представляет интерес.

ГЛАВА 4. ИЗУЧЕНИЕ ПРОТИВОМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ МЕТАЛЛОКОМПЛЕКСОВ ЦИНКА ПРОИЗВОДНЫХ N-АЛКЕНИЛИМИДАЗОЛОВ

Раневое повреждение кожи может сопровождаться различными осложнениями, в первую очередь, инфицированием раны. Наличие у препаратов, обладающих ранозаживляющим действием, противомикробных свойств в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также патогенных грибов является важным преимуществом.

Антибактериальная активность ионов металлов привлекает все больше внимания, поскольку устойчивость бактерий к ним еще не обнаружена. Металлопрепараты, особенно металлкоординационные комплексы, представляют широкий спектр кандидатов для борьбы с бактериальными инфекциями [230]. Существует мнение, что использование эссенциальных элементов в составе антимикробных препаратов является областью, требующей пристального изучения [58]. В связи с растущей проблемой антибиотикорезистентности подобные исследования особенно актуальны.

Течение регенеративных процессов в кожной ране зависит от микробного обсеменения раневой поверхности. Препараты, которые в настоящее время пользуются спросом на отечественном и зарубежных рынках, не являются универсальными, а их эффект далек от оптимального. Поэтому возникает потребность в поиске и разработке совершенных и инновационных средств с комплексным действием на кожные покровы, обладающих ранозаживляющим, антимикробным действием, и способствующих усилению естественной защитной функции кожи.

Известна противомикробная активность цинксодержащих препаратов: Цинка пиритиона, Цинка сульфата, Цинка оксида. Все больше внимания в качестве антибактериальных средств привлекают координационные соединения цинка [77], а также наночастицы цинка, способные образовывать АФК, повреждающие клетки бактерий [116]. Последние разработки

продемонстрировали, что многообещающей стратегией антибактериальной терапии может быть трансмембранный транспорт ионов цинка производными 8-аминохинолина [170]. Антибактериальная активность продемонстрирована для комплексов цинка с аминокислотами [225], комплексов иминопиридина с цинком [230] и ряда других соединений и наноконструкций.

Учитывая вышесказанное, изучение противомикробной активности комплексов цинка производных N-алкенилимидазолов представляет особый интерес.

4.1. Изучение бактерио- и фунгистатической активности комплексных соединений цинка производных N-алкенилимидазолов в опытах *in vitro*

Оценку антимикробной активности комплексных соединений цинка с производными N-алкенилимидазолов под шифрами Пилим-1 и Аллил проводили в сравнении с субстанциями Метронидазола и Цинка сульфатом. В результате изучения установлено, что Пилим-1 и Аллил обладают практически одинаковой умеренной бактериостатической активностью в отношении *S. aureus* 209-P (МИК составила 125 мкг/мл), *E. coli* ATCC 25922, *Pt. vulgaris* ATCC 6896 (МИК – 250 мкг/мл), *P. aeruginosa* ATCC 9027 (МИК – 500 мкг/мл).

На культурах грибов была выявлена слабая фунгистатическая активность Пилима-1 и Аллила в отношении *C. albicans* ATCC 10231 и *M. canis* 352 в концентрациях 1000 мкг/мл и 1000-2000 мкг/мл соответственно.

Метронидазол проявлял в 2 раза меньшую активность в отношении всех изученных штаммов микроорганизмов, а противомикробная активность Цинка сульфата и Na-КМЦ была в 4-8 раз меньше по сравнению с Пилимом-1 и Аллилом (Таблица 4.1).

Следовательно, в опытах *in vitro* установлена умеренная антибактериальная активность Пилима-1 и Аллила в отношении *S. aureus* 209-P, *E. coli* ATCC 25922, *Pt. vulgaris* ATCC 6896, *P. aeruginosa* ATCC 9027 и слабая фунгистатическая активность в отношении *C. albicans* ATCC 10231 и *M. canis* 352.

Таблица 4.1 – Антимикробная активность Пилима-1 и Аллила в опытах *in vitro* (МИК, мкг/мл)

Исследуемые вещества	Штаммы микроорганизмов					
	<i>S. aureus</i> 209 P	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. vulgaris</i> ATCC 6896	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	<i>M. canis</i> 352
Пилим-1	125	250	250	500	1000	1000
Аллил	250 част. 125	250	250	500	1000	2000
Цинка сульфат	4000 част. 2000	2000	4000 част. 2000	4000	2000	2000
Na-КМЦ	4000	1000	4000	4000	8000	8000 част. 4000
Метронидазол	500	500	500	1000	4000	4000 част. 2000

Полученные результаты превышали противомикробную активность Метронидазола и Цинка сульфата [97].

4.2. Изучение антибактериального действия комплексов цинка производных N-алкенилимидазолов на раневой модели моноинфекции, вызванной *Pseudomonas aeruginosa* Ts 38-16

Противомикробное действие, установленное *in vitro*, требует подтверждения на лабораторных животных, поскольку не всегда совпадает с активностью в живом организме. Проведенные нами исследования продемонстрировали ранозаживляющий эффект соединений Пилим-1 и Аллил на моделях неинфицированных ран, а также антимикробную активность *in vitro*. Представляло определенный интерес изучить антибактериальное и ранозаживляющее действие этих веществ на модели инфицированной раны. В качестве инфицирующего агента нам был предложен модельный

полирезистентный штамм *P. aeruginosa* Ts 38-16 из коллекции лаборатории Трансляционной биомедицины НИЦ эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи (г. Москва), выделенный в 2014 г. из мокроты пациента в г. Москве.

4.2.1. Оценка антибактериального действия Пилима-1 и Аллила *in vitro*

МИК комплексов цинка Пилима-1 и Аллила, полученная методом микроразведений для клинического изолята *P. aeruginosa* Ts 38-16, составила для обеих субстанций 2048 мкг/мл. Измерение оптических плотностей показало, что при данной концентрации комплексов цинка отсутствует видимый рост синегнойной палочки (Рисунок 4.1).

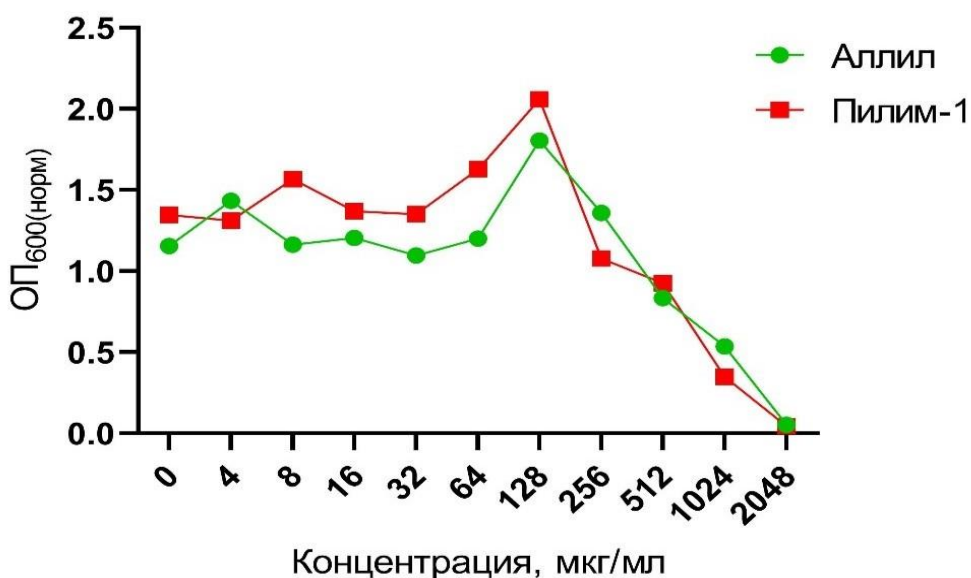


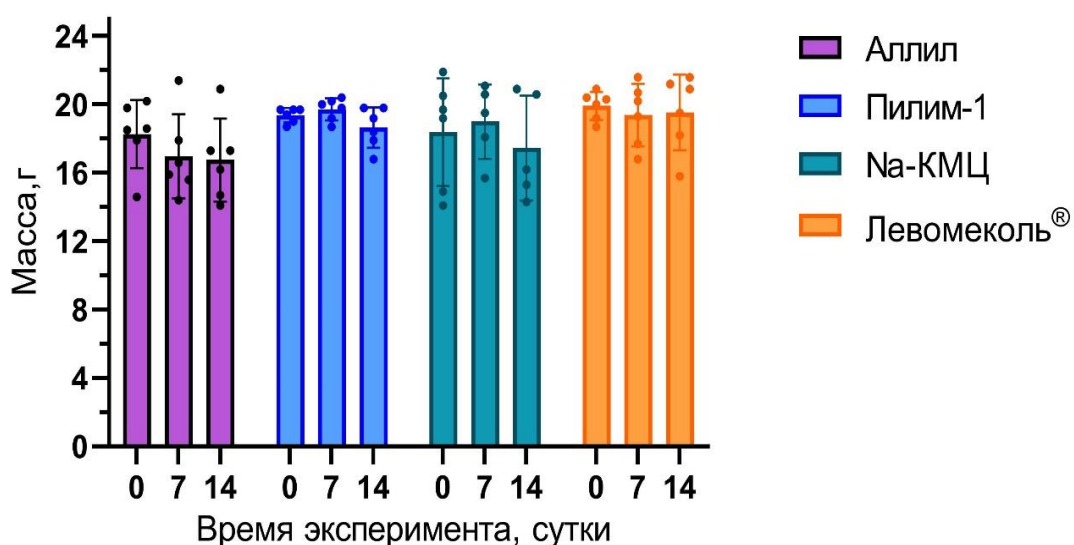
Рисунок 4.1 – Изменение оптических плотностей культур бактерий изолята *P. aeruginosa* Ts 38-16 после инкубации с различными концентрациями исследуемых субстанций

4.2.2 Оценка антибактериального действия Пилима-1 и Аллила на модели раневой моноинфекции *in vivo*, вызванной *P. aeruginosa* Ts 38-16

Исследование проведено на 24 мышах-самках BALB/c массой 18-20 г. Животные были разделены на 4 группы (n = 6): 1 и 2 группам наносили 1% гели

Пилима-1 и Аллила на основе Na-КМЦ, 3 группе – Na-КМЦ, 4 группе – референтный препарат Левомеколь®.

Оценка общего состояния и массы тела животных. На протяжении всего периода исследования оценивалось общее состояние животных. Спустя сутки после заражения поведение мышей во всех группах было вялым, наблюдались признаки боли и вокализации, состояние шерсти было взъерошенным. У всех животных была сформирована раневая поверхность, после нанесения культуры наблюдалось развитие инфекционного процесса: гиперемия места заражения, образование нагноения. Общее состояние мышей в группе Аллила было хуже, чем у остальных животных, раневые поверхности содержали большее количество гноя, кроме того, отдельные дефекты покрывались плотными черными корками в процессе заживления. Измерение веса животных в течение эксперимента не выявило статистически значимых различий между группами животных (Рисунок 4.2).

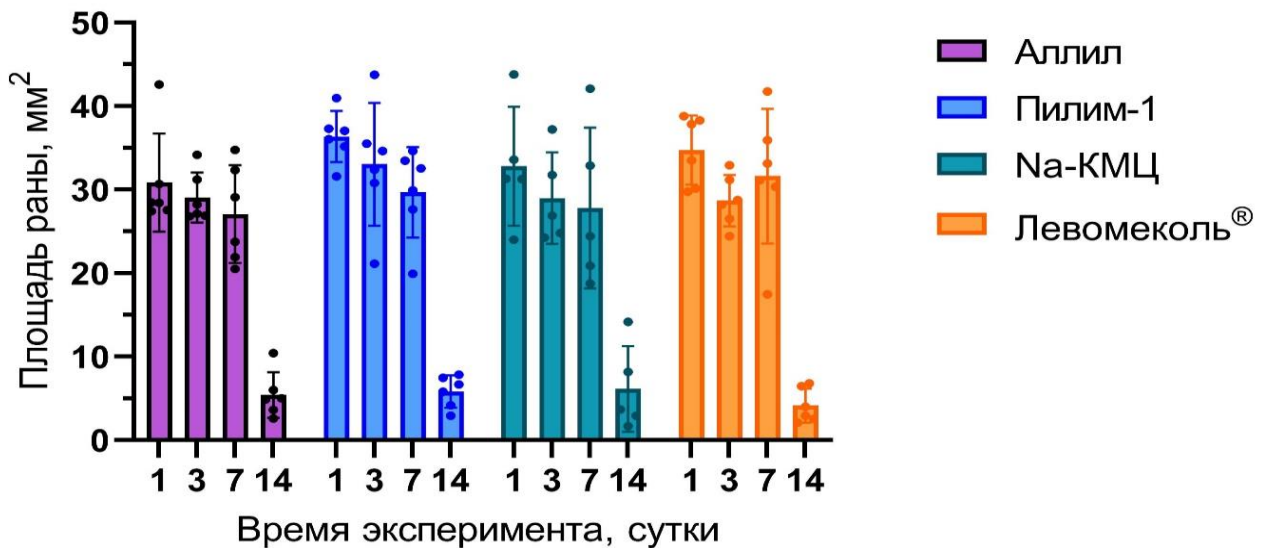


Примечание: Представлены индивидуальные и средние значения \pm SD

Рисунок 4.2 – Изменение массы тела животных при моделировании раневой моноинфекции

Ранозаживление. Изучение патоморфологического состояния ран в течение эксперимента показало, что к 3 суткам раневая поверхность у животных всех

групп покрывалась жесткой коркой, спаянной с подлежащими тканями. Нагноение сохранялось до 7 суток. Измерение площадей раневых поверхностей на 1, 3, 7 и 14 сутки показало отсутствие статистически значимых отличий между группами (Рисунок 4.3).



Примечание: Представлены индивидуальные и средние значения \pm SD

Рисунок 4.3 – Динамика заживления раны, инфицированной *P. aeruginosa* Ts 38-16

Также спустя 7 суток во всех группах наблюдалась фаза регенерации, образования и созревания грануляционной ткани с отслоением края раневой корки (Рисунки 4.4–4.7).

В первые сутки размер ран составлял $30,9 \pm 5,9$ мм² в группе Аллила; $36,4 \pm 3,1$ мм² в группе Пилима-1; $32,8 \pm 7,1$ мм² в группе Na-КМЦ; $34,7 \pm 3,1$ мм² в группе Левомеколь®. Активное ранозаживление происходило во вторую неделю эксперимента, в течение которой раны практически затянулись. На 14 сутки размер раневой поверхности составлял $5,4 \pm 2,7$ мм² в группе Аллила; $5,8 \pm 1,9$ мм² в группе Пилима-1; $6,1 \pm 5,1$ мм² в группе Na-КМЦ и $4,1 \pm 2,0$ мм² в группе Левомеколь®.

Обсеменённость раневых поверхностей. На 1, 3, 7 и 14 сутки эксперимента были сделаны смывы с раневой поверхности.



Рисунок 4.4 – Динамика заживления ран у мышей группы, получавшей Na-KMЦ (n = 6, 1 животное погибло)



Рисунок 4.5 – Динамика заживления ран у мышей группы, получавшей 1% гель Аллила (n = 6)

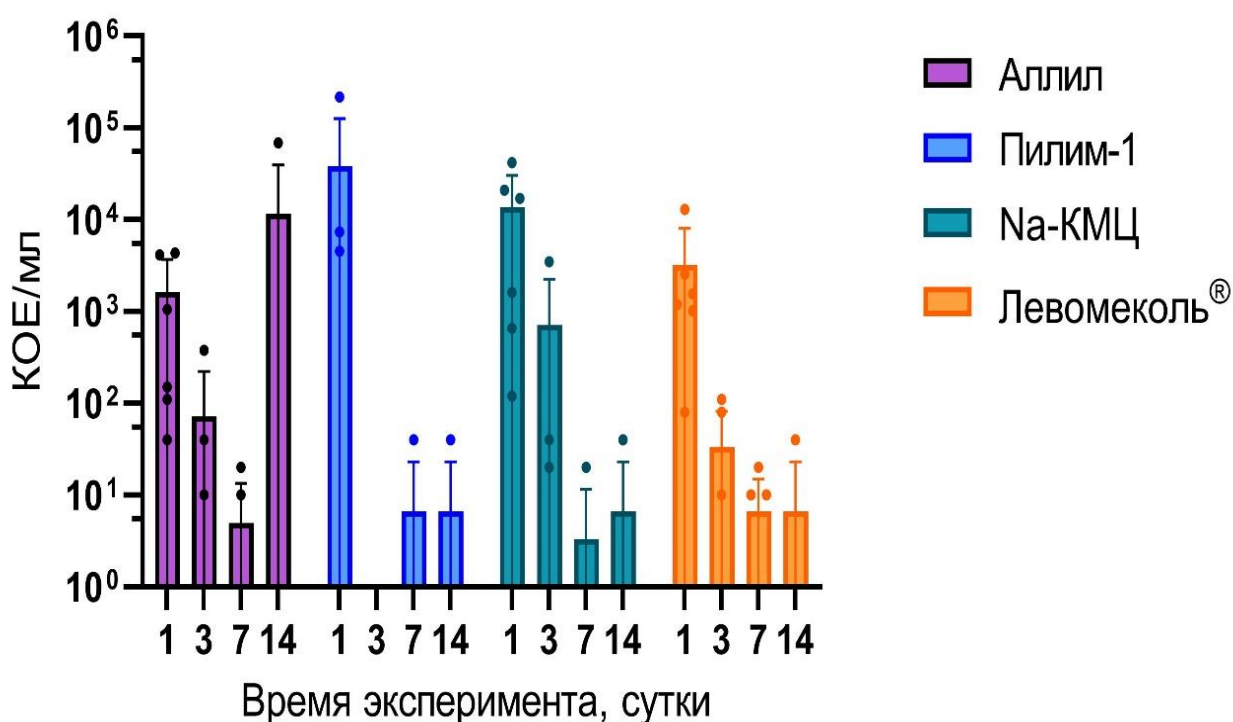


Рисунок 4.6 – Динамика заживления ран у мышей группы, получавшей 1% гель Пилима-1 (n = 6)



Рисунок 4.7 – Динамика заживления ран у мышей группы, получавшей Левомеколь® (n = 6)

При этом было отмечено, что все животные были равномерно заражены на 1 сутки до начала лечения, средние значения высевов составляли $1,6 \times 10^3$ – $3,8 \times 10^4$ КОЕ/мл. На 3, 7 и 14 сутки у большей части животных во всех группах с поверхности ран живые бактерии не высевались, у отдельных животных наблюдались высевы от 10 до $3,5 \times 10^3$ КОЕ/мл, статистической разницы между группами не было (Рисунок 4.8).



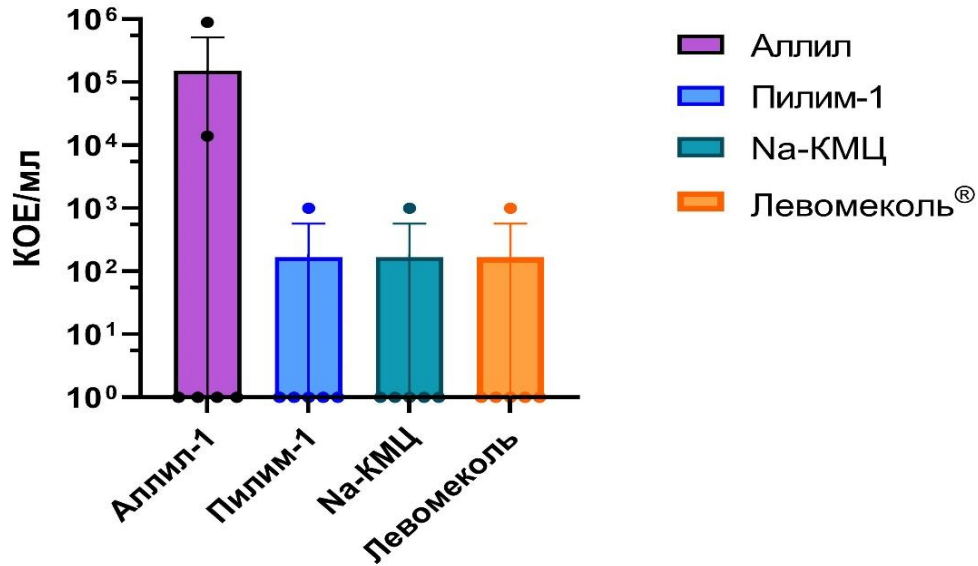
Примечание: Представлены индивидуальные и средние значения \pm SD

Рисунок 4.8 – Высевы смывов с раневой поверхности

Высевы крови и гомогенатов кожи. На 14 сутки животные были выведены из эксперимента, извлечены образцы крови и кожные лоскуты места раневого дефекта.

В крови животных всех групп не было роста синегнойной палочки, отсутствовала систематизация инфекции. Оценка обсемененности кожных лоскутов показала, что в конечной точке эксперимента значения между группами статистически не различались. Средние значения высевов составили $1,5 \times 10^5$

КОЕ/мл в группе Аллила, $1,7 \times 10^2$ КОЕ/мл в группе Пилима-1, $2,0 \times 10^2$ КОЕ/мл в группе Na-КМЦ и $1,7 \times 10^2$ КОЕ/мл в группе Левомеколь® (Рисунок 4.9).



Примечание: Представлены индивидуальные и средние значения \pm SD

Рисунок 4.9 – Обсеменённость гомогенатов раневых дефектов

Следовательно, в результате проведенного исследования не было выявлено антибактериального действия металлокомплексов Аллил и Пилим-1 в виде 1% гелей на основе Na-КМЦ на модели инфицированной полирезистентным штаммом *P. aeruginosa* Ts 38-16 плоскостной раны у мышей при лечении в течение 14 суток [97].

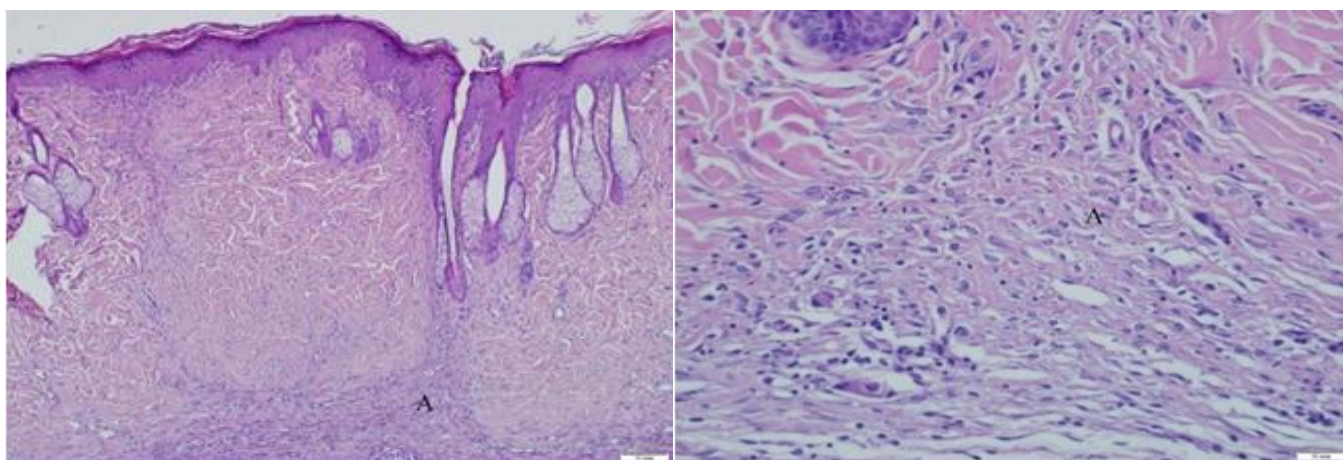
ГЛАВА 5. ГИСТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ДЕРМАТОТРОПНОГО ДЕЙСТВИЯ МЕТАЛЛОКОМПЛЕКСОВ ЦИНКА ПРОИЗВОДНЫХ N-АЛКЕНИЛИМИДАЗОЛОВ

5.1. Гистоморфологические исследования раневых отпечатков

Уменьшение размеров кожного дефекта является основным критерием процесса ранозаживления. Гистологическое исследование раневых отпечатков позволяет оценить характер заживления, процессы репарации, наличие гнойного воспаления и другие важные критерии.

5.1.1. Раневые биоптаты неинфицированной линейной раны

В контрольных образцах линейной раны отмечали как полную эпителизацию, так и ее отсутствие, обнаруживали некротический детрит, окружённый выраженной лейкоцитарной инфильтрацией. В подлежащих тканях грануляционная ткань была представлена новообразованными сосудами и клеточными инфильтратами, между которыми наблюдались тонкие прослойки коллагеновых волокон [33] (Рисунок 5.1).



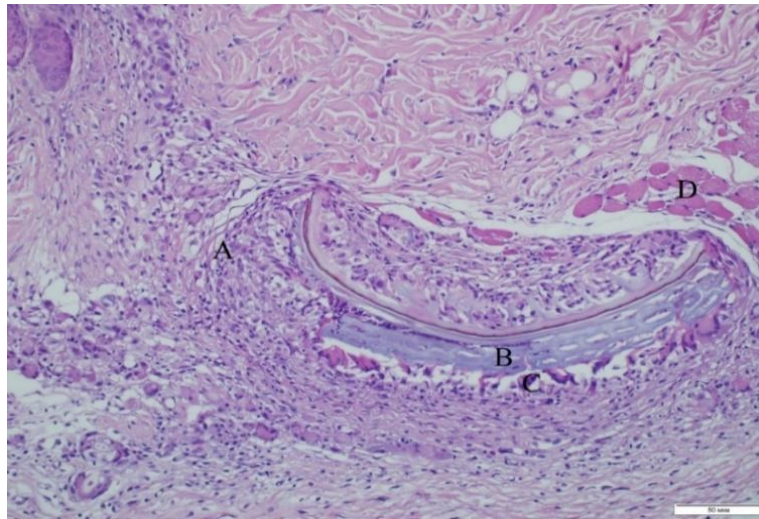
Грануляционная ткань (А). Ув. x100

Грануляционная ткань (А). Ув. x200

Рисунок 5.1 – Микропрепараты линейной раны кожи крыс контрольной группы.
Окраска гематоксилином и эозином

Грануляционная ткань – незрелая соединительная ткань, формирующаяся в ответ на воспаление и повреждение. Она создает своеобразный барьер по границам раны от распространения инфекции, отграничивает мертвые ткани от некротических, заполняет полость раны, способствует рубцеванию и защищает организм от проникновения вторичной инфекции.

В ответ на чужеродные компоненты в образцах отмечали появление гигантских клеток инородных тел (ГКИТ), что является своеобразным индикатором тканевых реакций, в частности, гранулематозного воспаления (Рисунок 5.2).

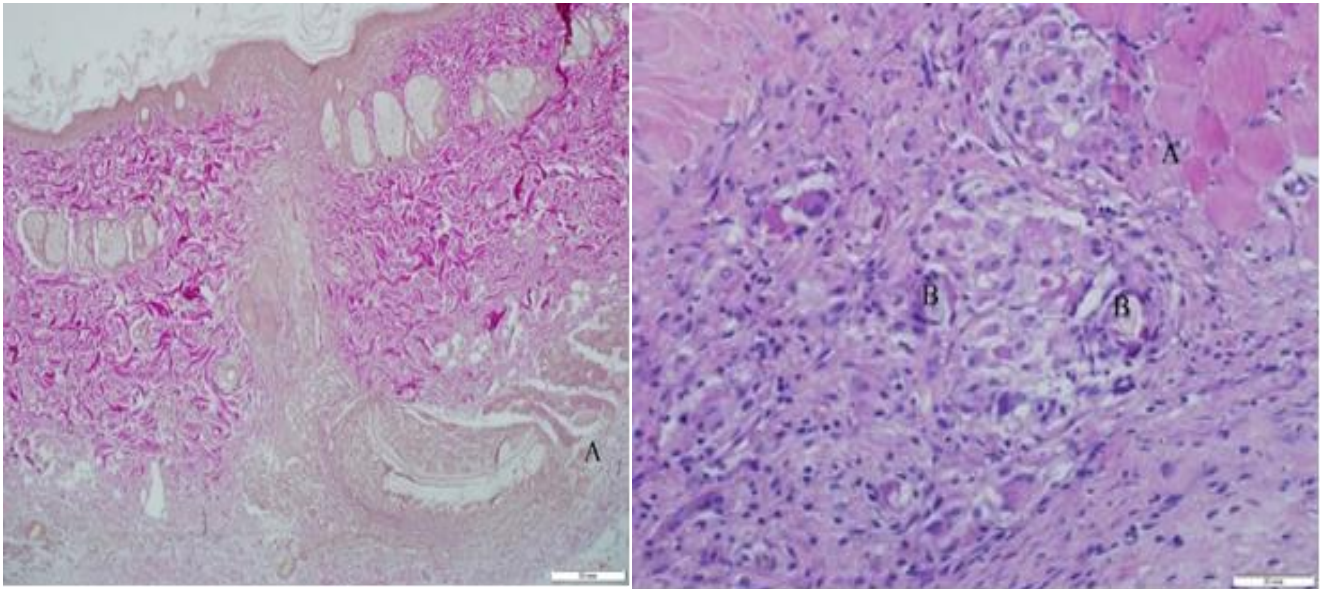


Грануляционная ткань (А). Остатки волоса (В). Гигантоклеточная реакция (С).
Гладкомышечные клетки (D)

Рисунок 5.2 – Микропрепарат линейной раны кожи крыс контрольной группы.
Окраска гематоксилином и эозином. Ув. x200

В отдельных образцах отмечался умеренный ангиогенез. Рана была заполнена волокнами, в эпителии отмечались признаки паракератоза и гранулематозного воспаления.

В образцах раневых отпечатков группы Na-КМЦ обнаруживали участки эпителизации в ранах, при этом наблюдались дистрофические изменения в виде паракератоза. В дерме присутствовала грануляционная ткань, замещающая поврежденные мышцы [33] (Рисунок 5.3).

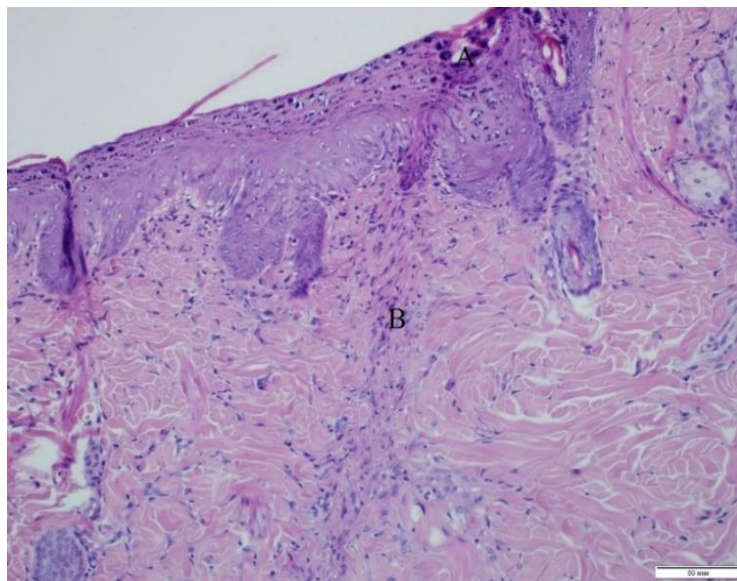


Гладкомышечные клетки замещаются грануляционной тканью (А). Ув. х200

Гладкомышечные клетки (А). Инородные элементы, остатки волоса (В). Ув. х200

Рисунок 5.3 – Микропрепараты линейной раны кожи крыс группы Na-КМЦ. Окраска гематоксилином и эозином

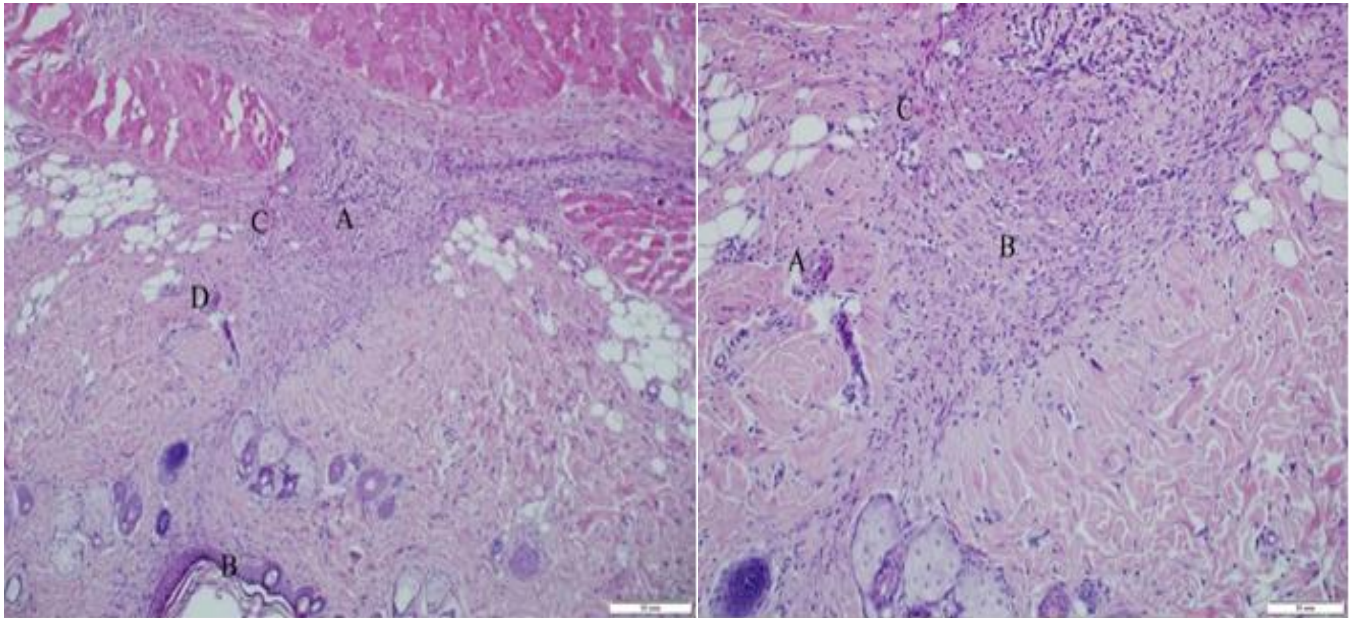
В области ран отмечался некротический детрит с лейкоцитарной инфильтрацией. Грануляционная ткань была средней степени зрелости, плотная, с небольшим количеством клеточных элементов (Рисунок 5.4).



Некротический детрит в области раны (А). Грануляционная ткань с признаками зрелости (В)

Рисунок 5.4 – Микропрепарат линейной раны кожи крыс группы Na-КМЦ. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. х200

У животных, получавших аппликации 1% гелем с Ацизолом, результаты гистологических исследований показали полную эпителизацию без нагноений, большое количество грануляционной ткани средней степени зрелости, умеренный ангиогенез, наличие фибробластов, лимфоцитов и отсутствие ГКИТ (Рисунок 5.5).



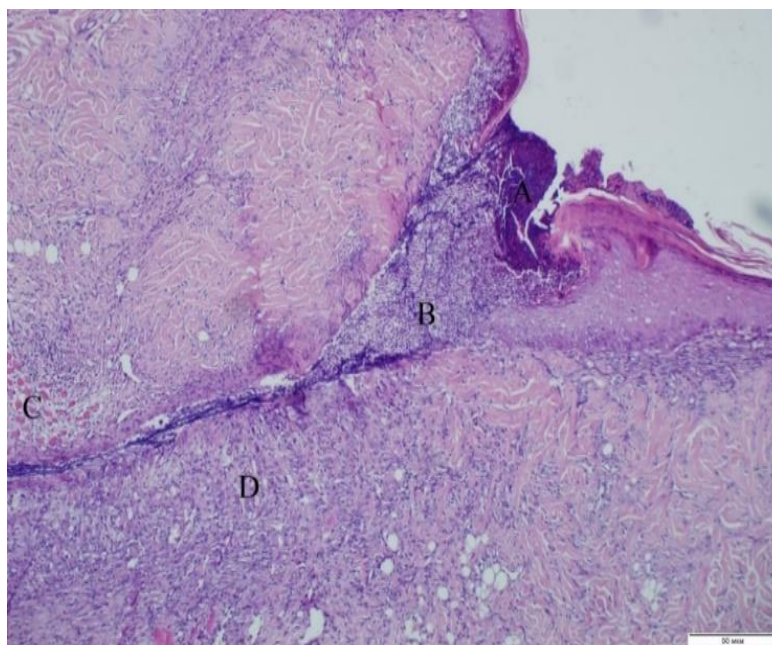
Большое количество грануляционной ткани (А).
Полная эпителизация (В). Диапедез, умеренный
ангиогенез (С). Артериола с утолщенной
стенкой (D). Ув. х200.

Артериола с утолщенной стенкой (А).
Большое количество грануляционной ткани
(В). Диапедез, умеренный ангиогенез (С).
Ув. х200

Рисунок 5.5 – Микропрепараты линейной раны кожи крыс группы Ацизол.
Окраска гематоксилином и эозином

У одного животного на гистологическом срезе наблюдалось гнойное воспаление, наличие лейкоцитов и некротического детрита. Нарастающий эпителий разрушался гноем, накапливался фибринозно-гнойный экссудат, характеризующийся высоким содержанием нейтрофилов, погибшими клетками поврежденных тканей, а также фибриногена вследствие повышения проницаемости сосудов.

Эпителизация не состоялась, грануляционная ткань была незрелая, хорошо выраженная. ЭЦМ, в норме образующий механический каркас для клеток, рыхлый. Отмечался выраженный ангиогенез (Рисунок 5.6).



Некротический детрит (А). Инфильтрация области раны нейтрофилами (В). Гладкомышечные клетки (С). Грануляционная ткань (D)

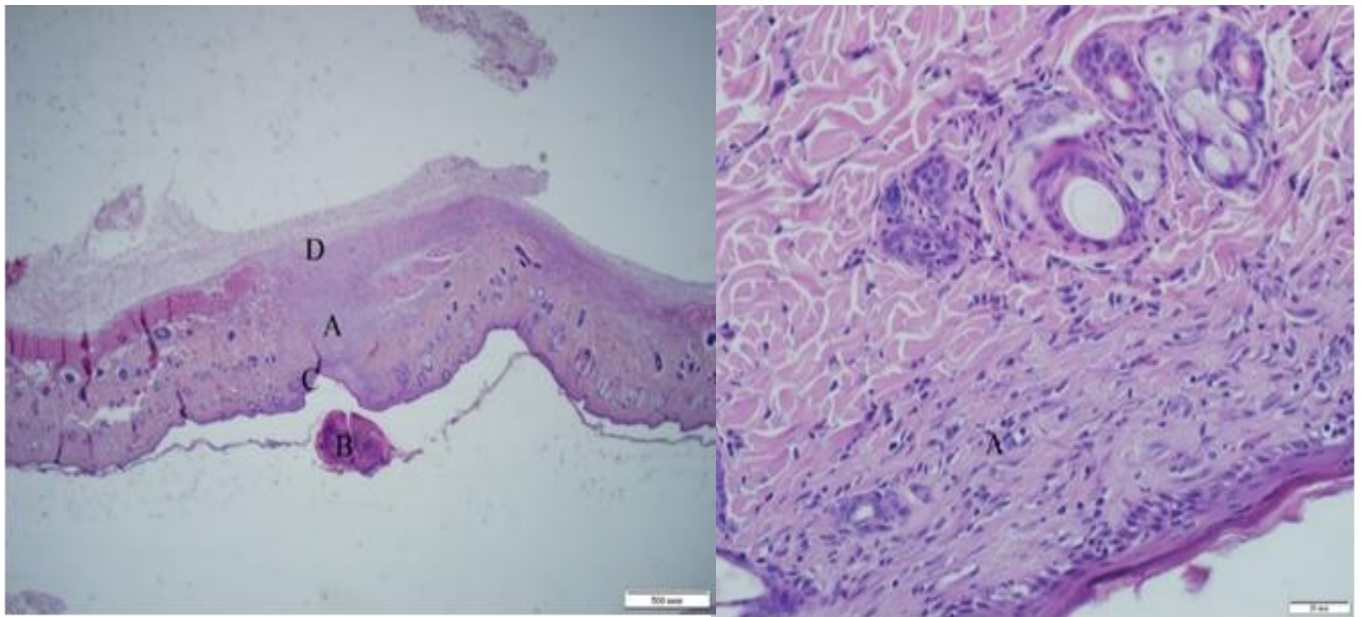
Рисунок 5.6 – Микропрепарат линейной раны кожи крыс группы Ацизол. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. x200

Гистологический анализ образцов раневых биоптатов кожи крыс, получавших лечение 1% гелем Пилима-1 показал, что процесс эпителизации завершился полностью. В дерме отмечалось небольшое количество грануляционной ткани разной степени зрелости [33].

Некротический детрит (корочка) не содержал дефектов, кровоизлияния отсутствовали (Рисунки 5.7, 5.8).

На гистологических срезах ран, обработанных 1% гелем Аллила, отмечался тонкий слой зрелой грануляционной ткани. Дерма была полностью восстановлена, фиброз отсутствовал. Наблюдалась полная эпителизация, невыраженный ангиогенез, подкожная жировая клетчатка без признаков воспаления (Рисунок 5.9).

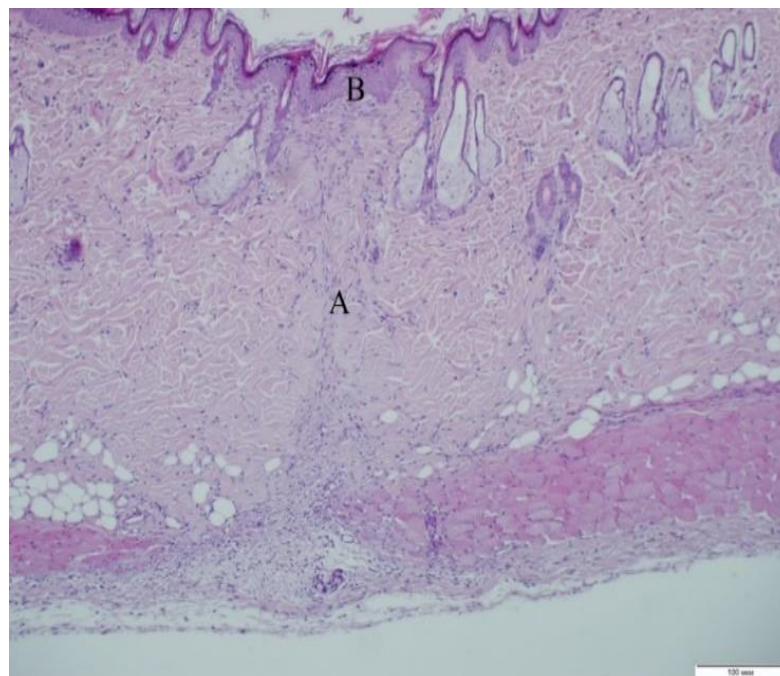
У животных, получавших 1% гель Аллила-2, на гистологических срезах отмечались полная эпителизация и фиброзирование, грануляционная ткань разной степени зрелости. Нагноение отсутствовало, но характерен выраженный ангиогенез и кровоизлияния (Рисунок 5.10).



Большое количество незрелой грануляционной ткани (А). Некротический детрит (В). Полная эпителизация (С). Грануляционная ткань в подкожной жировой клетчатке (D). Ув. х200 [33]

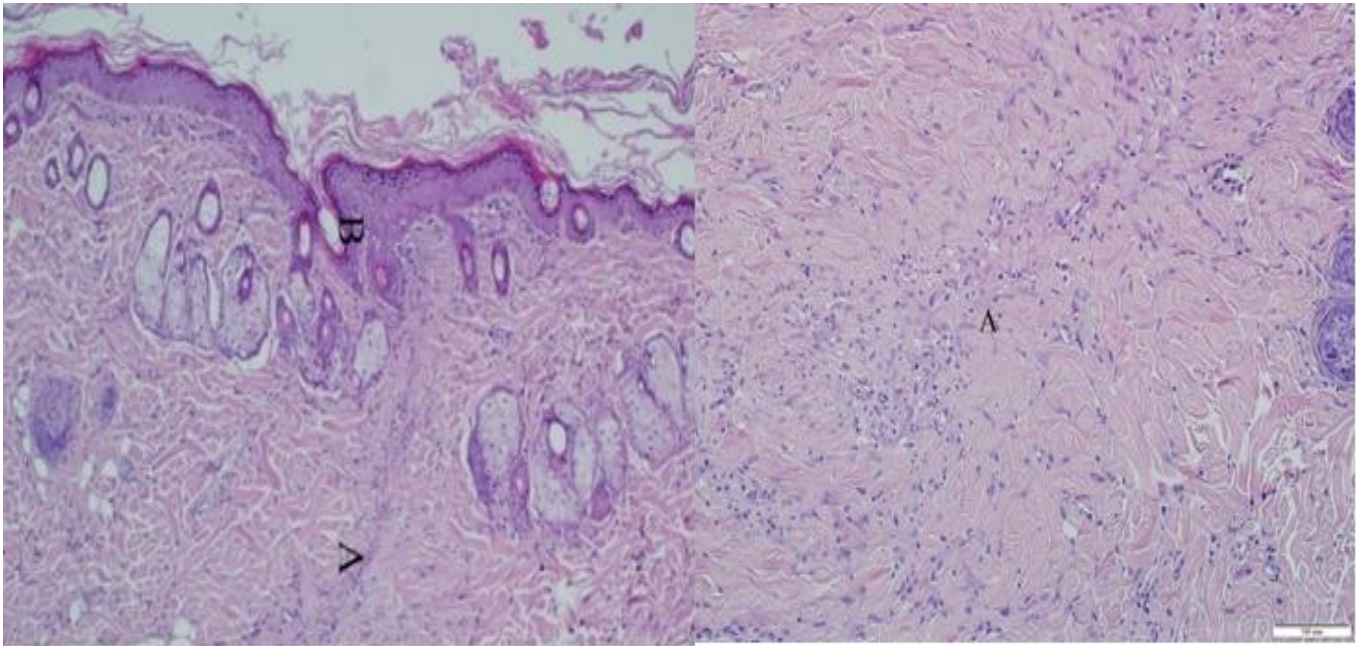
Зрелая грануляционная ткань, малое количество клеточных элементов, большое количество компонентов ЭЦМ. Ув. х200

Рисунок 5.7 – Микропрепараты линейной раны кожи крыс группы Пилим-1. Окраска гематоксилином и эозином



Грануляционная ткань с признаками зрелости (А). Полная эпителизация (В) [33]

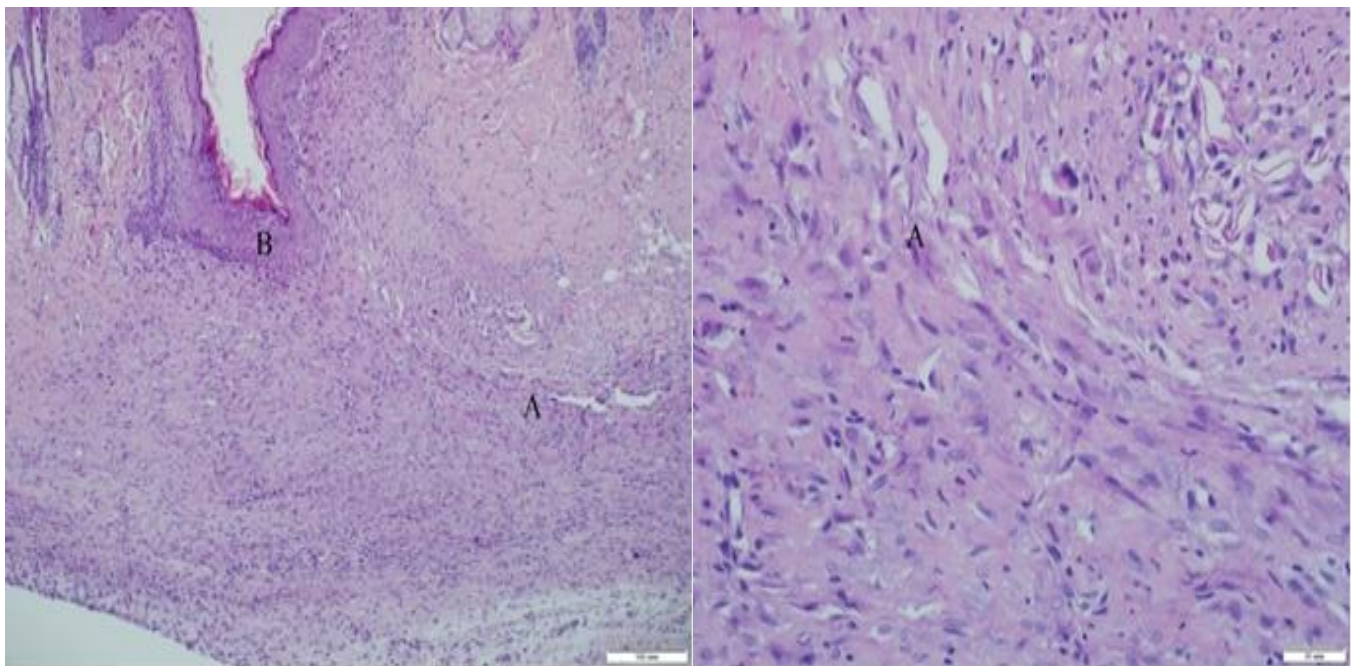
Рисунок 5.8 – Микропрепарат линейной раны кожи крыс группы Пилим-1. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. х200



Зрелая грануляционная ткань (А). Полная эпителизация (В). Ув. x200

Зрелая грануляционная ткань (А). Ув. x100

Рисунок 5.9 – Микропрепараты линейной раны кожи крыс группы Аллил. Окраска гематоксилином и эозином



Незрелая грануляционная ткань, большое количество клеточных элементов (А). Полная эпителизация (В). Ув. x100

Диapedез, признаки активного процесса ангиогенеза (А). Ув. x200

Рисунок 5.10 – Микропрепараты линейной раны кожи крыс группы Аллил-2. Окраска гематоксилином и эозином

Образцы кожи крыс, получавших 1% гель Аллим-2, практически не отличались от группы Аллил-2 (Рисунок 5.11).

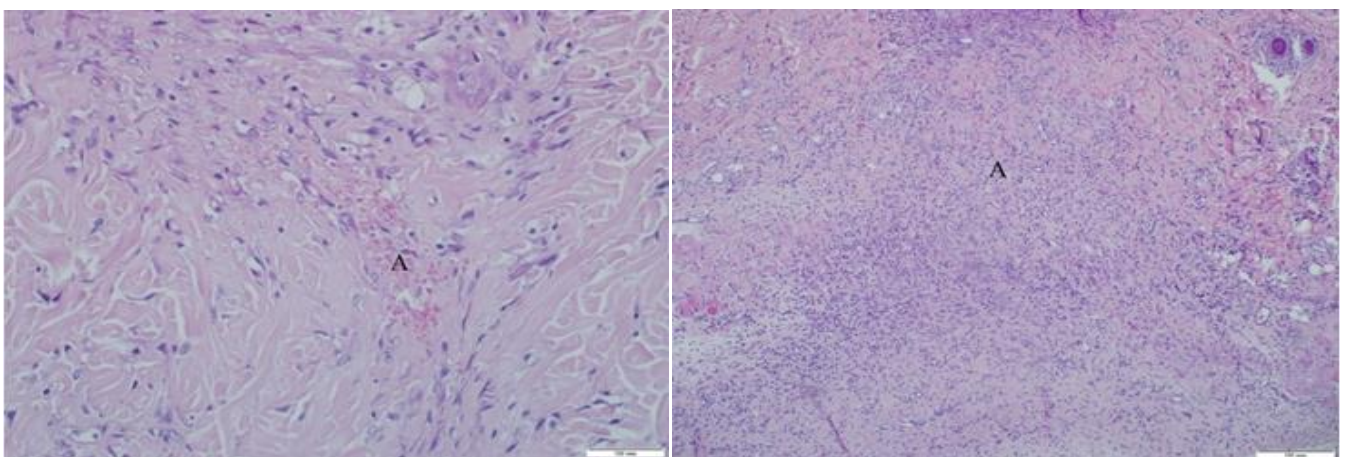


Диapedез (А). Сосуды с эндотелиальными клетками, признаки активного процесса ангиогенеза (В). Ув. x200

Диapedез (А). Зрелая грануляционная ткань (В). Полная эпителизация (С). Ув. x100

Рисунок 5.11 – Микропрепараты линейной раны кожи крыс группы Аллим-2. Окраска гематоксилином и эозином

В образцах группы Пропаргил-2 отмечались признаки ангиогенеза и незрелая грануляционная ткань (Рисунок 5.12).

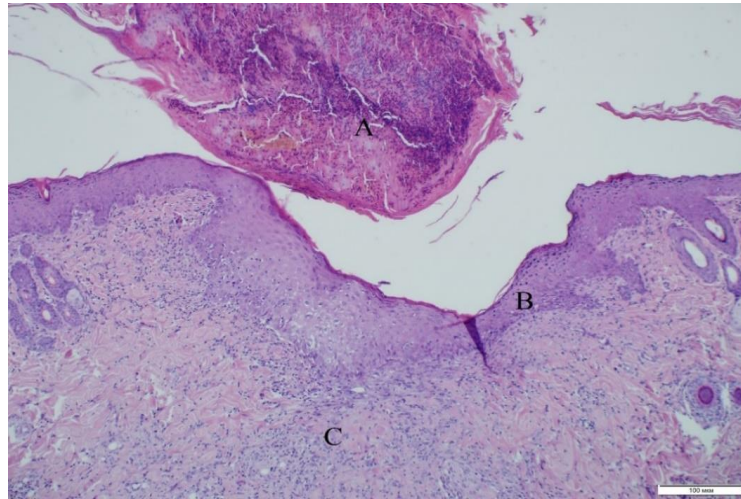


Диapedез, признаки активного процесса ангиогенеза (А). Ув. x100

Незрелая грануляционная ткань (А). Ув. x100

Рисунок 5.12 – Микропрепараты линейной раны кожи крыс группы Пропаргил-2. Окраска гематоксилином и эозином

В одном из образцов отмечался некротический детрит (Рисунок 5.13).



Некротический детрит (А). Полная эпителизация (В).
Незрелая грануляционная ткань (С). Ув. х200.

Рисунок 5.13 – Микропрепарат линейной раны кожи крыс группы Пропаргил-2.
Окраска гематоксилином и эозином

У животных, получавших Цинка сульфат, эпителизация отсутствовала, обнаруживали крупные очаги некроза, грануляционную ткань, кровоизлияния, лейкоцитарную инфильтрацию лейкоцитами, полнокровные сосуды, дистрофические изменения мышечных волокон в глубоких слоях [33] (Рисунок 5.14).

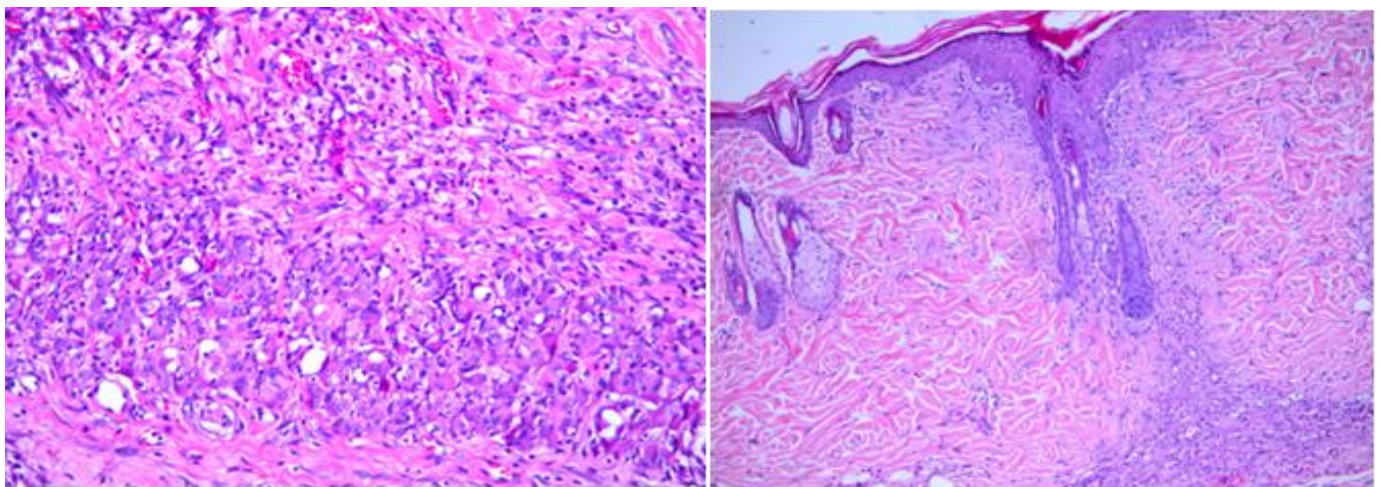


Рисунок 5.14 – Микропрепараты линейной раны кожи крыс группы Цинка сульфат. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. х200

В образцах раневых биоптатов крыс, получавших лечение 10% гелем Солкосерила[®], были выявлены: грануляционная ткань с признаками зрелости, полная эпителизация, ангиогенез в поверхностных и глубоких слоях кожи, лимфостаз, единичные лимфоциты, умеренное количество фибробластов, отсутствие некроза. В образцах отмечали кровоизлияния и отсутствие нагноения (Рисунок 5.15).

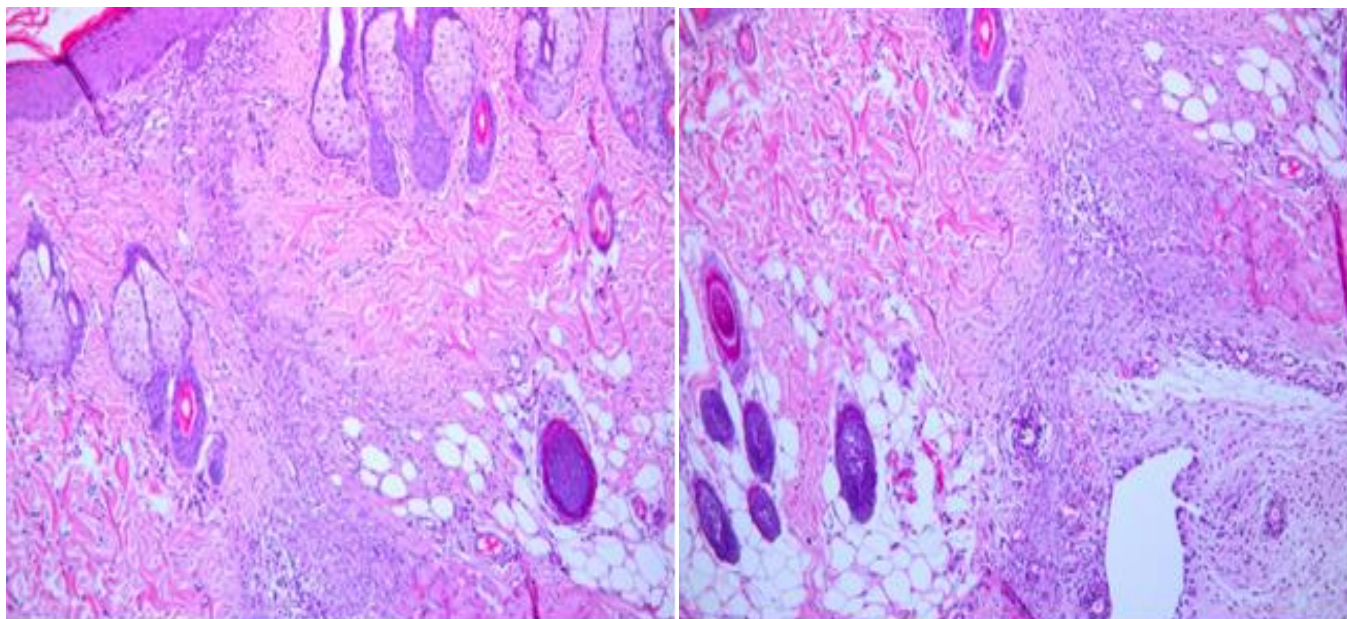
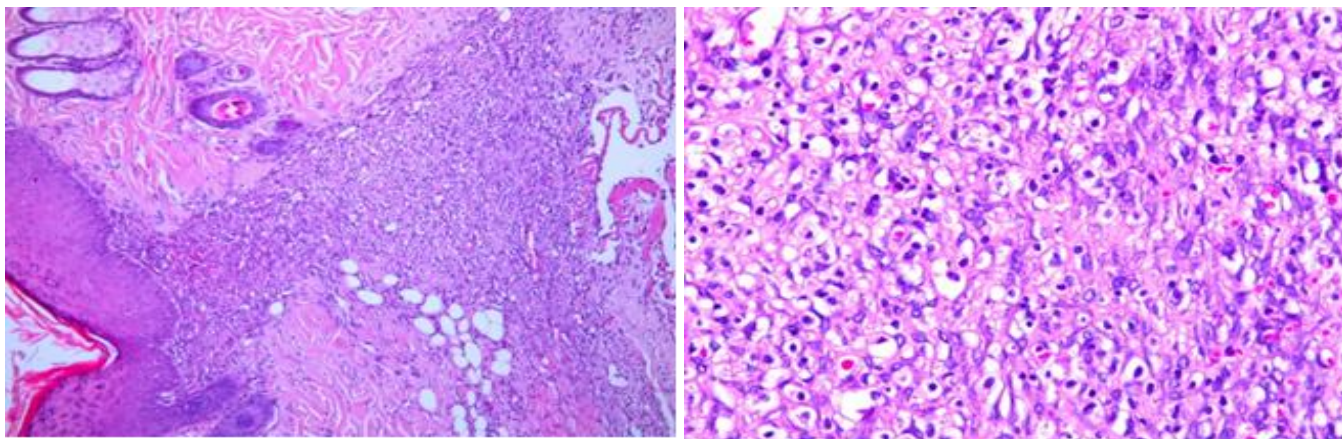


Рисунок 5.15 – Микропрепараты линейной раны кожи крыс группы Солкосерил[®]. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. x200

В группе животных, получавших лечение 10% мазью Метилурацила[®], наблюдали незавершенный процесс репарационного ранозаживления: незначительную эпителизацию, эпителий с дистрофическими изменениями, в подлежащих тканях обнаруживали грануляционную ткань разной степени зрелости. В некоторых образцах выявляли признаки воспалительного процесса – лейкоцитарную инфильтрацию и лейкопедез [33].

Отмечалась полная эпителизация, незрелая грануляционная ткань до мышечного слоя и глубже, объем меньше, чем в контрольной группе, выраженный ангиогенез, кровоизлияния, мало фибробластов, немногочисленные лейкоциты, незавершенная репарация (Рисунок 5.16).



А. Ув. x100

Б. Ув. x200

Рисунок 5.16 – Микропрепараты линейной раны кожи крыс группы Метилурацил®. Окраска гематоксилином и эозином

Качественные и количественные характеристики процесса ранозаживления оценивали по таким признакам, как зрелость грануляционной ткани, степень эпителизации и ангиогенеза, выраженность лейкоцитарной реакции, наличие кровоизлияний с оценкой каждого показателя по баллам. Зрелость грануляционной ткани и степень ангиогенеза оценивали по 3-х балльной шкале: 0 – нет, 1 – слабо выражена, 2 – умеренно выражена, 3 – выражена. Полную эпителизацию оценивали в 3 балла, неполную – 0 баллов. Выраженность лейкоцитарной реакции оценивали по наличию (0 баллов) или отсутствию нагноения (1 балл), отсутствию кровоизлияний – 1 балл, наличию – 0 баллов.

Основные показатели ранозаживления были сведены в единую таблицу и проведена их балльная оценка (Таблица 5.1) [33].

Таким образом, мы видим, что образцы биоптатов линейной кожной раны крыс, получавших лечение 1% гелями Пилима-1 и Аллила, демонстрируют более выраженное ранозаживление, чем другие исследованные вещества. По гистологическим критериям ранозаживления образцы кожи крыс, получавших лечение 1% гелями с данными металлокомплексами, соответствуют наибольшему количеству баллов. У животных этих групп отмечалась зрелость грануляционной ткани, полная эпителизация, умеренно выраженный ангиогенез, отсутствовали нагноение и кровоизлияния [33].

Таблица 5.1 – Балльная оценка гистологических критериев образцов кожной линейной раны крыс (максимальное количество баллов – 11)

Группы	Гистологические критерии, баллы					Количество баллов
	ГТ	Э	А	ЛР	К	
Контроль	1	1	1	1	0	4
Na-КМЦ	2	1	2	0	1	6
Ацизол	2	3	2	1	1	9
Пилим-1	3	3	3	1	1	11
Аллил	3	3	3	1	1	11
Аллил-2	2	3	3	1	1	10
Аллим-2	2	3	2	1	1	9
Пропаргил-2	1	2	2	0	0	5
Цинка сульфат	2	0	2	0	0	4
Солкосерил®	3	3	2	0	0	8
Метилурацил®	2	3	2	1	0	8

Обозначения: ГТ – грануляционная ткань, Э – эпителизация, А – ангиогенез, ЛР – лейкоцитарная реакция, К – кровоизлияния.

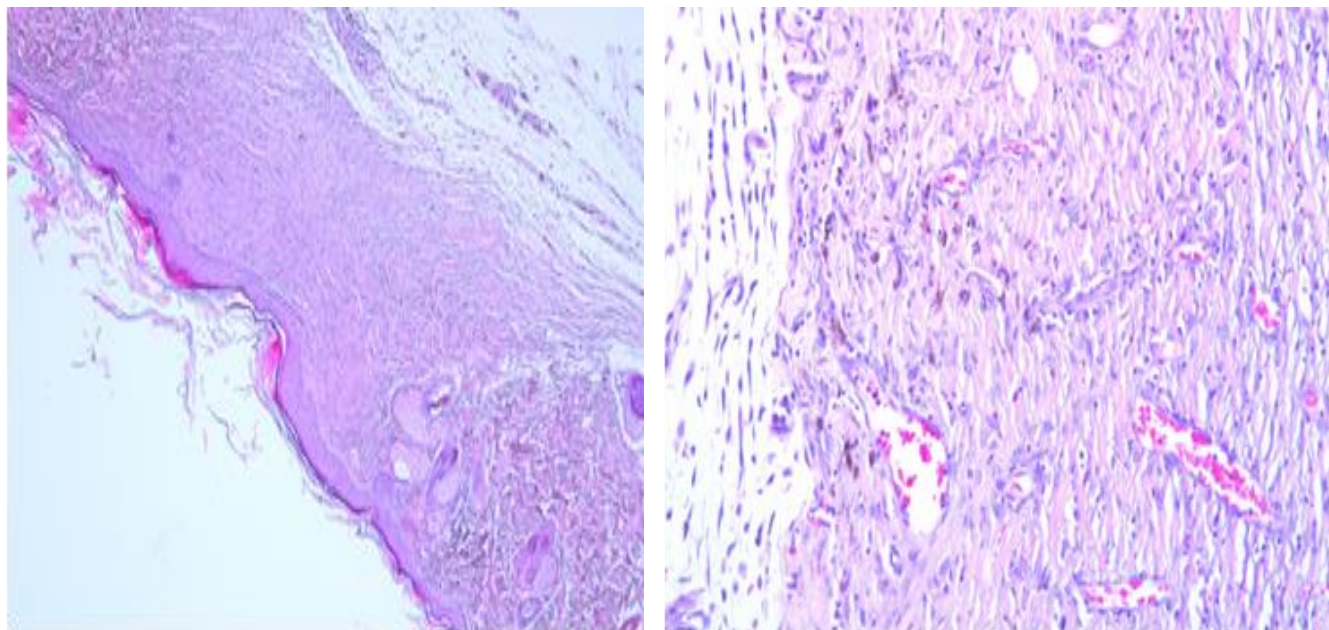
Оценка этих критериев показывает максимальное количество баллов. В контрольной группе и группе Na-КМЦ, а также в группах животных, получавших лечение Цинка сульфатом, Солкосерилом®, Метилурацилом®, выбранные критерии ранозаживления соответствуют 4-8 баллам [33].

5.1.2. Раневые биоптаты неинфицированной плоскостной раны

Для гистоморфологического изучения в каждой из 8 групп было отобрано по 3 животных, у которых визуально наблюдалось наиболее выраженное ранозаживление [56].

В двух контрольных образцах кожи отмечалось полное заживление с нормальной толщиной эпителия, следами грануляционной ткани с признаками зрелости, отсутствием придатков кожи (Рисунок 5.17 А). В третьем образце заживление отсутствовало, наблюдалась неполная эпителизация, базальная мембрана без эпителия, большое количество новообразованных сосудов,

петехиальные кровоизлияния, некротический детрит и признаки воспалительной реакции с большим количеством лейкоцитов и гемосидерином в глубоких слоях кожи [56] (Рисунок 5.17 Б).



А. Ув. x100

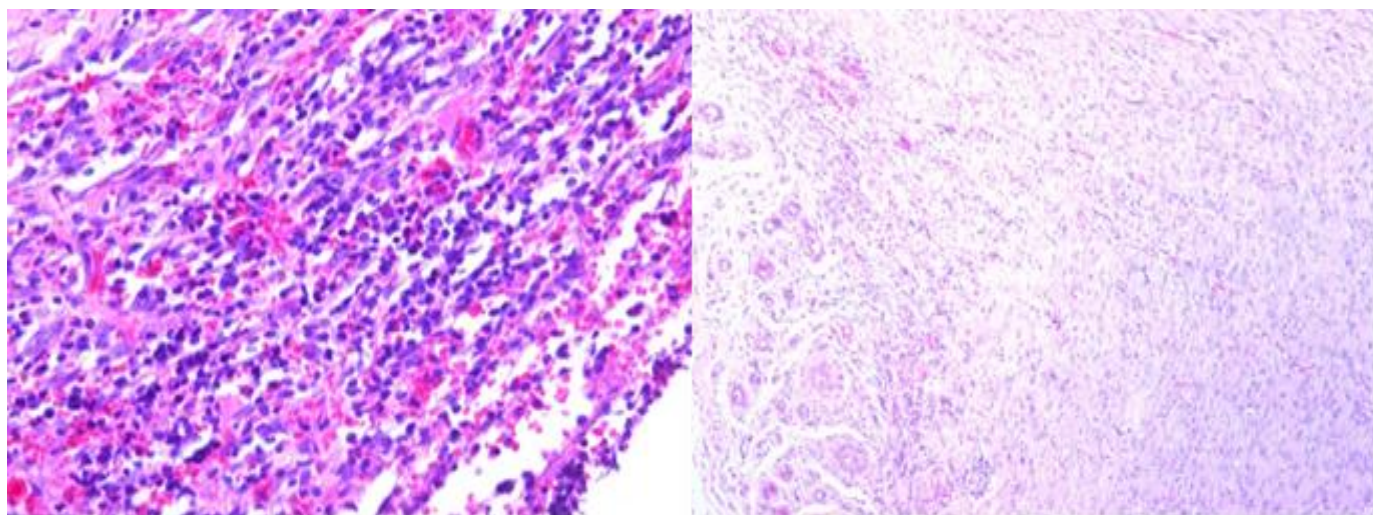
Б. Ув. x200

Рисунок 5.17 – Микропрепараты плоскостной кожной раны у крыс контрольной группы. Окраска гематоксилином и эозином

В первом образце кожи группы Na-КМЦ отмечалась грануляционная ткань с признаками зрелости, некротический детрит на поверхности, неполная эпителизация, кровоизлияния, гемосидерин в глубоких слоях, большое количество лимфоцитов с примесью лейкоцитов (Рисунок 5.18 А).

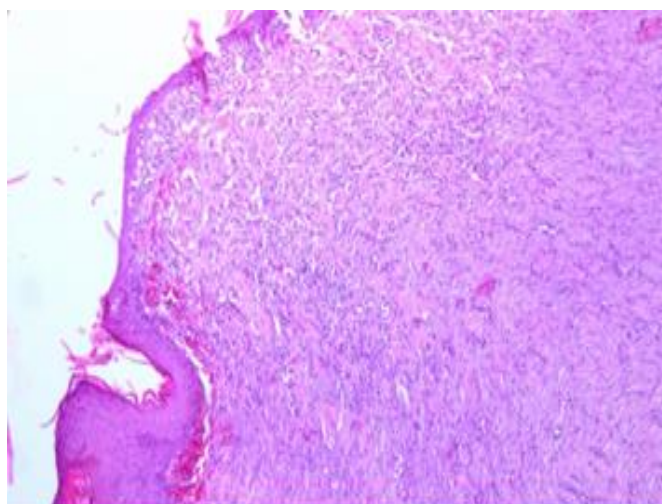
Во втором образце наблюдалась полная репарация и эпителизация, незначительное количество грануляционной ткани, большое количество новообразованных сосудов и лимфоцитов, в глубоких слоях – в небольшом количестве гемосидерин (Рисунок 5.18 Б).

В третьем образце были выявлены признаки незрелой грануляционной ткани, большое количество клеточных элементов, множество лимфоцитов, тонкий эпителий [56] (Рисунок 5.18 В).



А. Ув. x200

Б. Ув. x100



В. Ув. x100

Рисунок 5.18 – Микропрепараты плоскостной кожной раны у крыс группы Na-КМЦ. Окраска гематоксилином и эозином

В образцах кожи животных, получавших аппликации 1% гелем Ацизола, отмечалось большое количество тонкостенных сосудов, наличие грануляционной ткани, полная эпителизация, отсутствие лейкоцитов и придатков кожи [56] (Рисунок 5.19).

В образце кожи животных, получавших лечение 1% гелем Пилима-1, отмечалась полная эпителизация, восстановление придатков кожи, зрелая грануляционная ткань, лимфоидная инфильтрация, одинаковая толщина эпителия в прилежащих тканях и в ране, ремоделирование [56] (Рисунок 5.20 А).

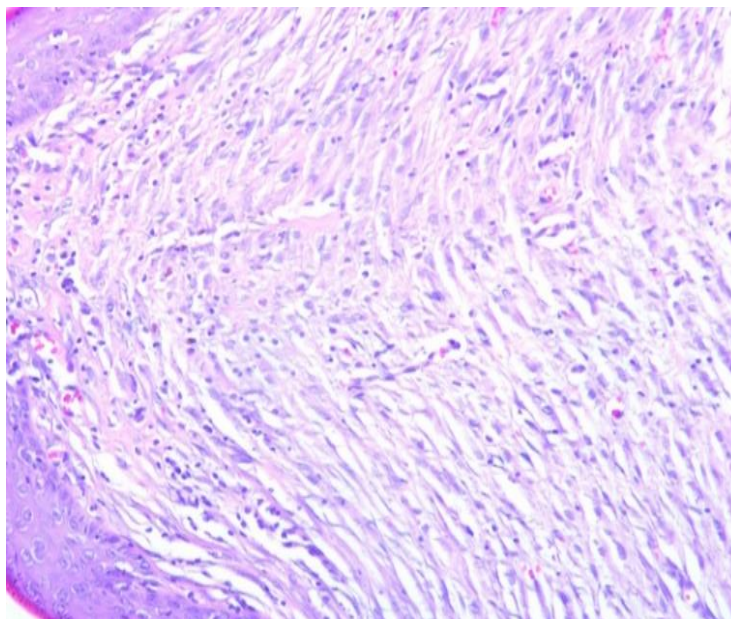


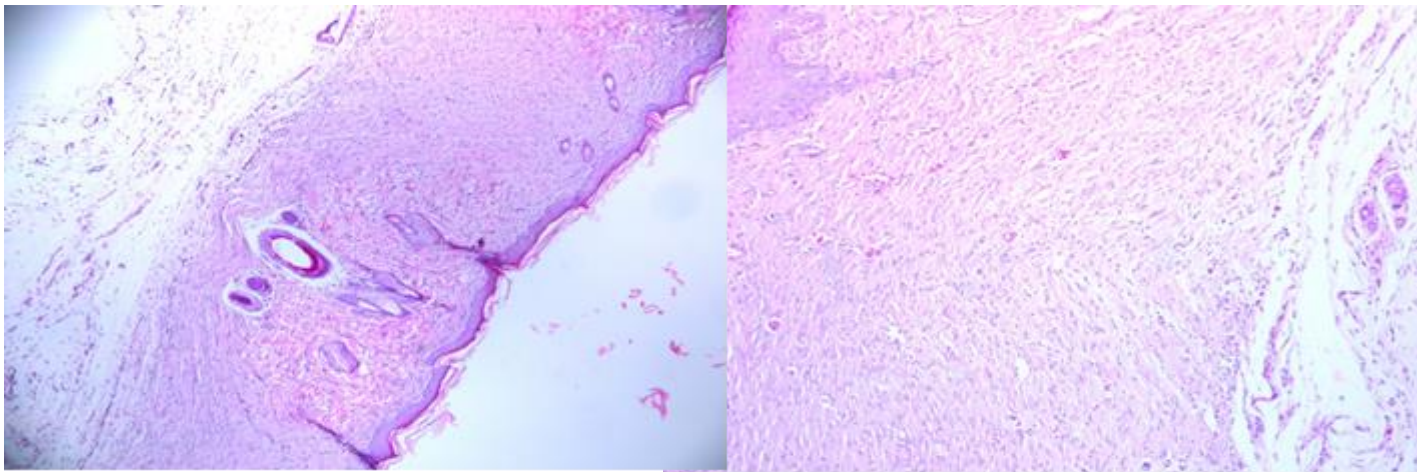
Рисунок 5.19 – Микропрепарат плоскостной кожной раны группы Ацизол. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. x100

В двух других образцах кожи также наблюдались остатки грануляционной ткани, небольшой объем поражения, начальная регенерация придатков кожи, в глубоких слоях кожи – гемосидерин [56] (Рисунки 5.20 Б, В).

В образцах группы Аллил отмечалось заживление с полной эпителизацией, нормальной толщиной эпителия, следами грануляционной ткани с признаками зрелости, отсутствием придатков кожи [56] (Рисунок 5.21).

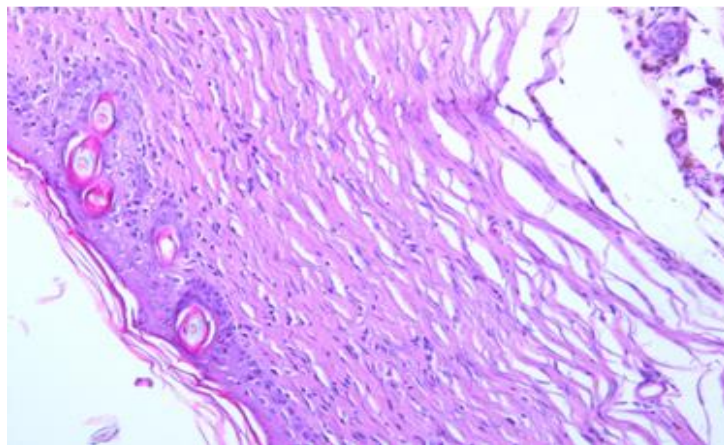
В одном из образцов кожи животного, получавшего лечение 1% гелем Аллила-2, отмечалась большая область повреждения, невосстановленные придатки, редкая лимфоидная инфильтрация, полная эпителизация с нормальной толщиной эпителия (Рисунок 5.22). В двух других образцах кожи была выявлена завершившаяся эпителизация, но в 3 образце наблюдалось возможное грибковое поражение [56] (Рисунки 5.23, 5.24).

В образце кожи крыс, получавших лечение Цинка сульфатом, под дермой находилось много воспалительного инфильтрата, дерма более плотная, грануляционная ткань с признаками зрелости. Отмечалось большое количество полнокровных сосудов, коллагена и фиброзирование дермы [56] (Рисунок 5.25).



А. Ув. x100

Б. Ув. x100



В. Ув. x200

Рисунок 5.20 – Микропрепараты плоскостной кожной раны у крыс группы Пилим-1. Окраска гематоксилином и эозином

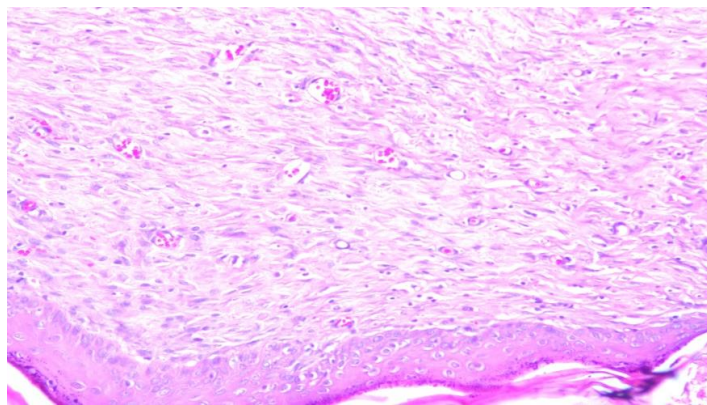


Рисунок 5.21 – Микропрепарат плоскостной кожной раны у крыс группы Аллил. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. x100

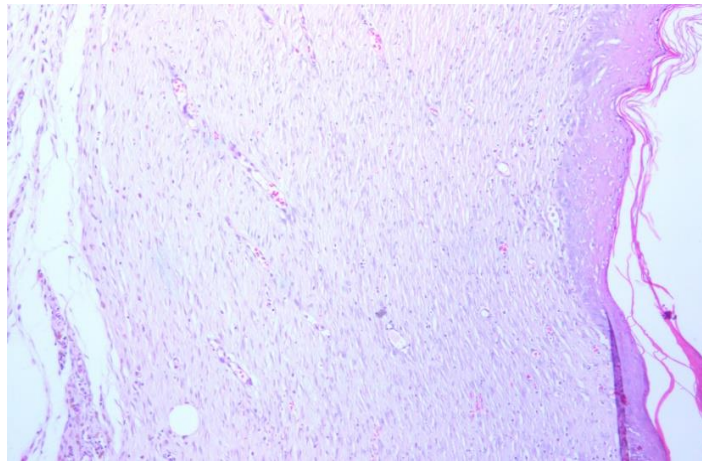


Рисунок 5.22 – Микропрепарат плоскостной кожной раны у крыс группы Аллил-2
Окраска гематоксилином и эозином. Ув. x100

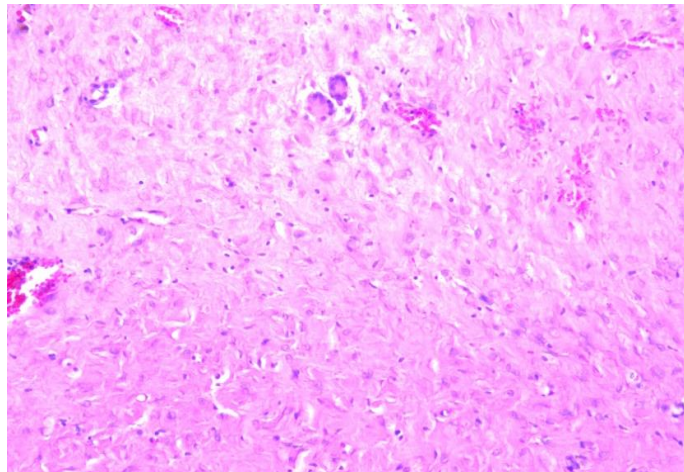


Рисунок 5.23 – Микропрепарат плоскостной кожной раны у крыс группы
Аллил-2. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. x100

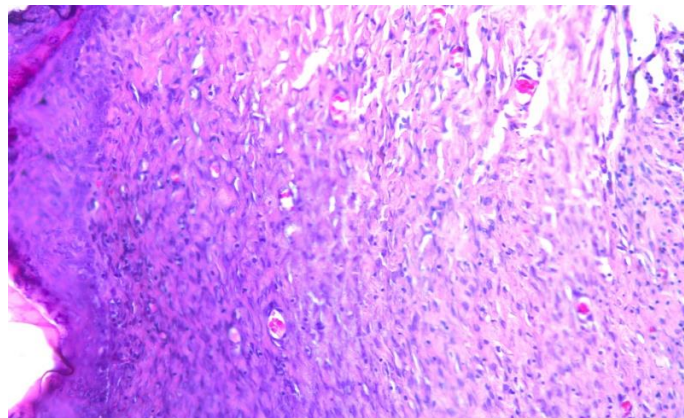
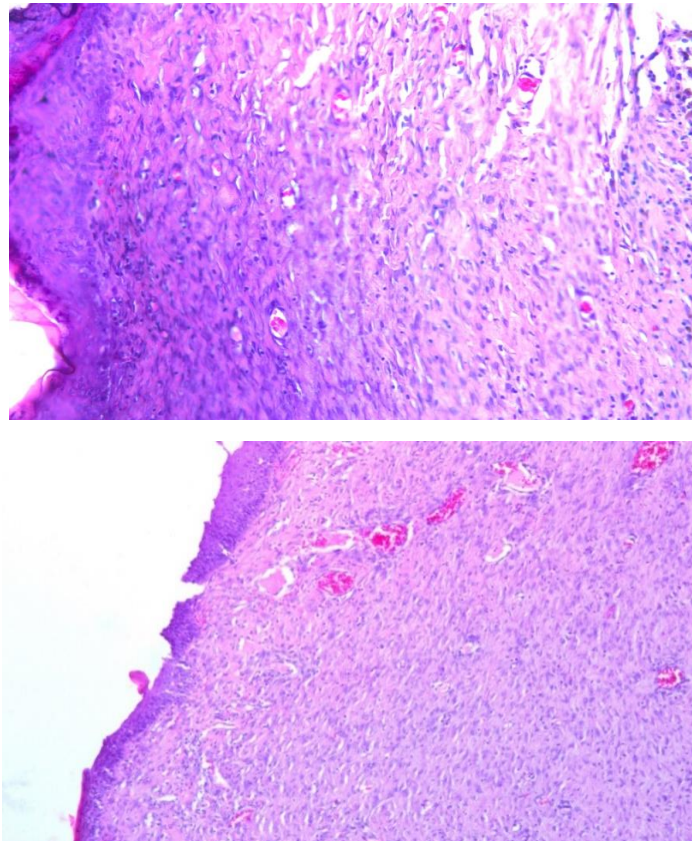


Рисунок 5.24 – Микропрепарат плоскостной кожной раны у крыс группы
Аллил-2. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. x100



Рисуно 5.25 – Микропрепараты плоскостной кожной раны у крыс группы Цинка сульфат. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. x100

В образце кожи крыс, получавших Метилурацил[®], отмечалось большое количество растянутых сосудов (неполная репарация), истонченный эпителий, под дермой и в эпителии – лимфоидная инфильтрация, гемосидероз, отсутствие лейкоцитов и некротического детрита, полная эпителизация [56] (Рисунок 5.26).

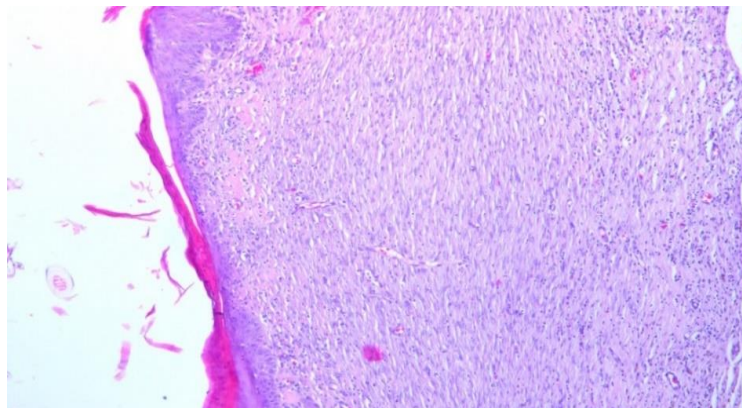


Рисунок 5.26 – Микропрепарат плоскостной кожной раны у крыс группы Метилурацил[®]. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. x100

В двух других образцах наблюдалась большая лимфоидная инфильтрация, полнокровные сосуды, инфильтрованный лейкоцитами и лимфоцитами базальный слой, эпителий и дерма не восстановлены, большое количество тонкостенных сосудов [56] (Рисунок 5.27).

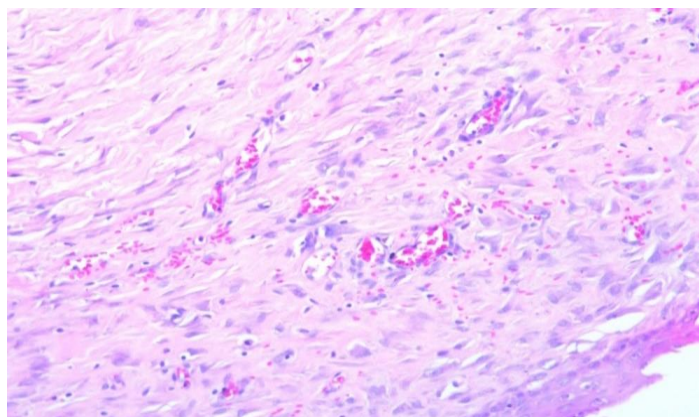


Рисунок 5.27 – Микропрепарат плоскостной кожной раны у крыс группы Метилурацил®. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. x100

Основные показатели заживления плоскостной раны были сведены в единую таблицу и проведена их балльная оценка (Таблица 5.2).

Таблица 5.2 – Балльная оценка гистологических критериев образцов кожной плоскостной раны крыс (максимальное количество баллов – 11)

Группы	Гистологические критерии, баллы					Количество баллов
	ГК	Э	А	ЛР	К	
Контроль	2	2	3	0	0	7
Na-КМЦ	3	2	2	0	0	7
Ацизол	2	3	3	1	1	10
Пилим-1	3	3	3	1	1	11
Аллил	3	3	3	1	1	11
Аллил-2	2	3	2	0	0	7
Цинка сульфат	3	3	3	0	0	9
Метилурацил®	3	2	3	1	0	9

Обозначения: ГТ – грануляционная ткань, Э – эпителизация, А – ангиогенез, ЛР – лейкоцитарная реакция, К – кровоизлияния.

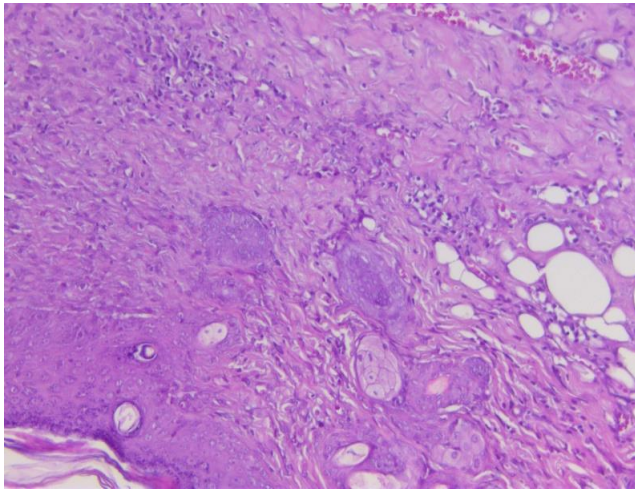
Из таблицы видно, что заживление плоскостной раны в группах животных, получавших Пилим-1 и Аллил, соответствует максимальному количеству баллов.

5.1.3 Раневые биоптаты плоскостной раны при моноинфекции

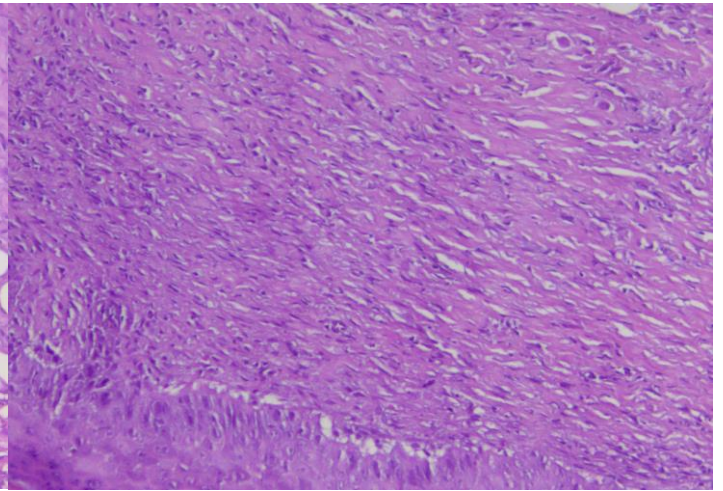
Анализ гистологических образцов раневых биоптатов, взятых у мышей, получавших Na-КМЦ, показал, что у 4 животных из 5 состоялась полная эпителизация (Рисунок 5.28). В двух образцах отмечалась зрелая грануляционная ткань. В то же время только в одном образце кожного биоптата отсутствовали признаки воспалительной реакции. В двух образцах кожи выявлены признаки выраженного воспаления с лейкоцитарной инфильтрацией и некротическим детритом, в двух других – умеренная инфильтрация лимфоцитами и лейкоцитами.

Во всех образцах раневых биоптатов, взятых у мышей, получавших аппликации 1% геля Пилима-1, выявлена полная эпителизация, грануляционная ткань с признаками зрелости, умеренный ангиогенез. В двух образцах отмечалось небольшое количество лейкоцитов (Рисунок 5.29). В образцах кожи мышей, получавших аппликации 1% гелем Аллила, отмечались признаки воспаления с большим количеством лейкоцитов (Рисунок 5.30). На фрагментах кожи 4 животных, получавших Левомеколь[®], отмечались признаки полной эпителизации, созревающая грануляционная ткань, умеренный ангиогенез. В двух образцах были выявлены признаки воспалительной реакции и выраженный ангиогенез (Рисунок 5.31). В целом можно отметить сходную гистоморфологическую картину заживления инфицированных ран, обработанных Левомеколем[®] и Пилимом-1.

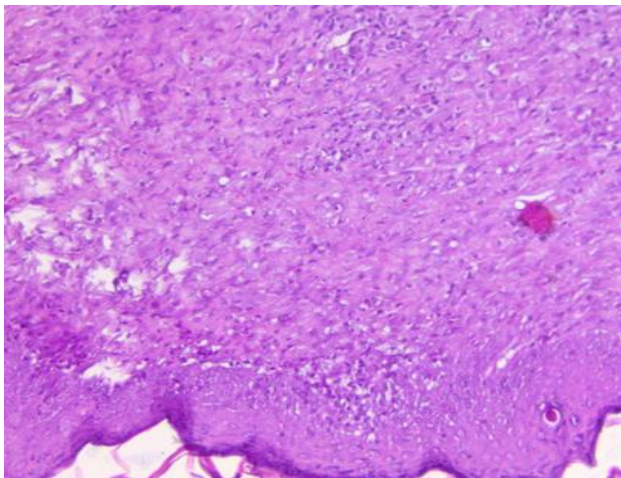
Таким образом, гистологический анализ образцов кожи показал полное закрытие ран на эпидермальном и дермальном уровнях в контрольной и экспериментальной группах на 7-й и 28-й день после нанесения линейных или плоскостных ран соответственно. Ранозаживляющий эффект всех исследованных комплексов цинка был выше, чем у референтных препаратов и в контрольных группах.



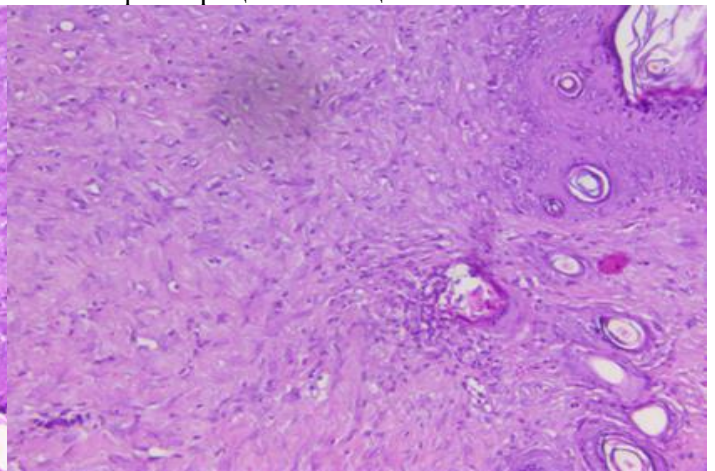
Зрелая грануляционная ткань, умеренный ангиогенез. Ув. x100



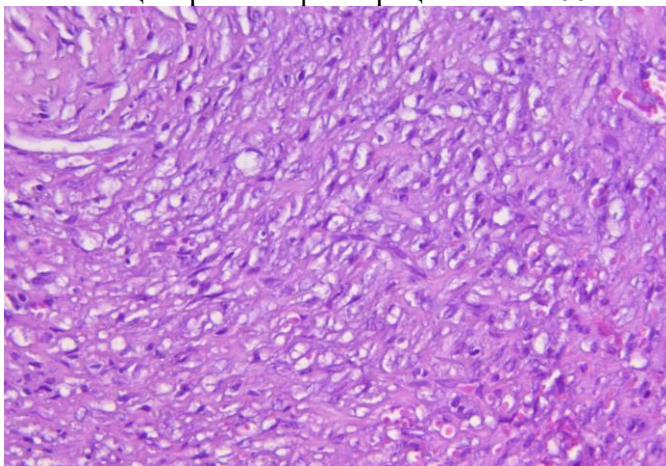
Зрелая ткань, полная эпителизация, умеренная инфильтрация лейкоцитами. Ув. x100



Некротический детрит, неполная эпителизация, выраженное воспаление, лейкоцитарная инфильтрация. Ув. x100

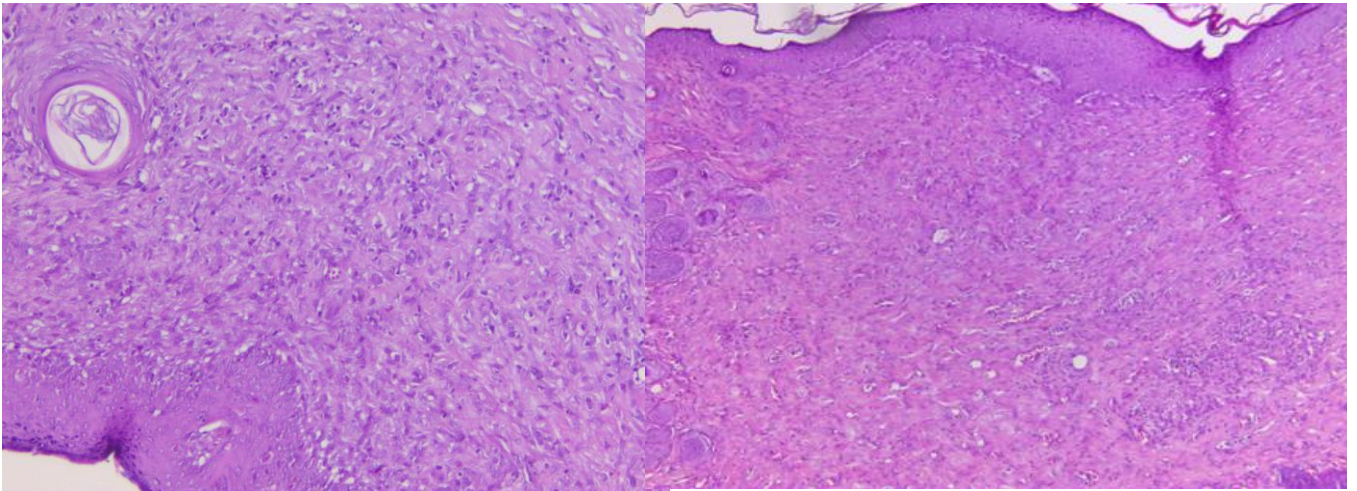


Эпителизация полная. Детрита нет, выраженная воспалительная инфильтрация и ангиогенез. Ув. x100

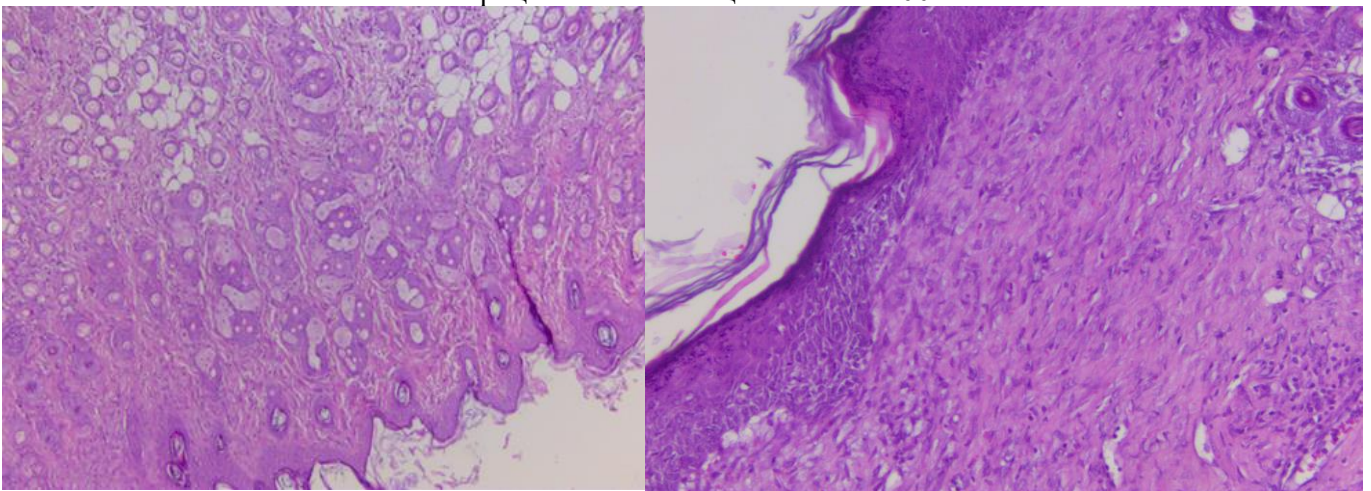


Эпителизация полная. Выраженный ангиогенез, незрелая грануляционная ткань, умеренное количество лейкоцитов. Ув. x200

Рисунок 5.28 – Микропрепараты кожной инфицированной раны у мышей группы Na-КМЦ. Окраска гематоксилином и эозином

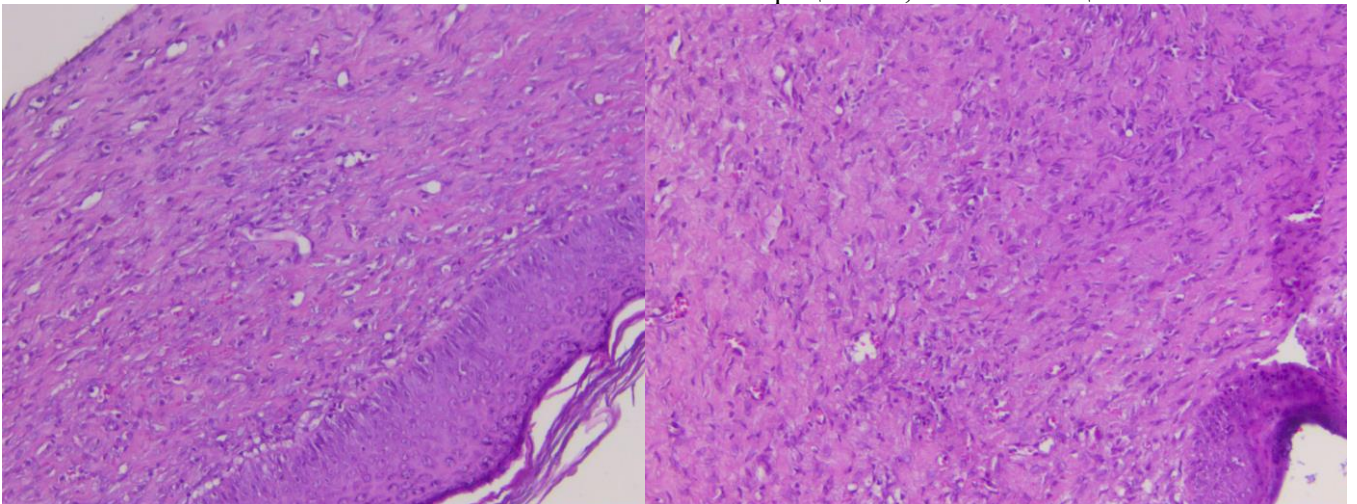


Полная эпителизация, грануляционная ткань с признаками зрелости, умеренное количество лимфоцитов и плазмочитов. Ув. x100



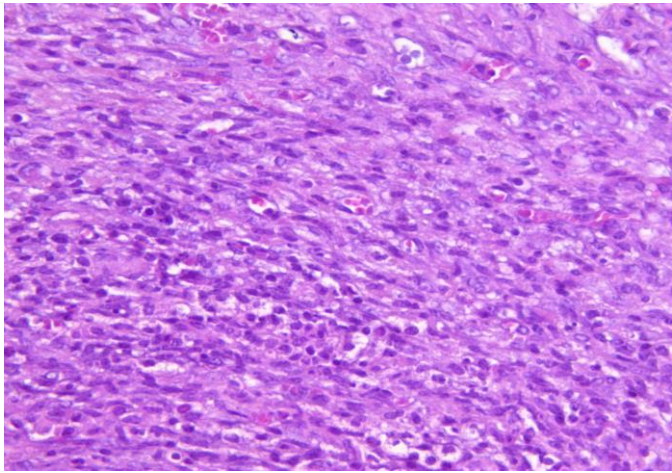
Эпителизация полная, воспаления нет, остатки грануляционной ткани. Ув. x200

Полная эпителизация, грануляционная ткань с признаками зрелости, умеренная инфильтрация лимфоцитами, мало лейкоцитов. Ув. x100

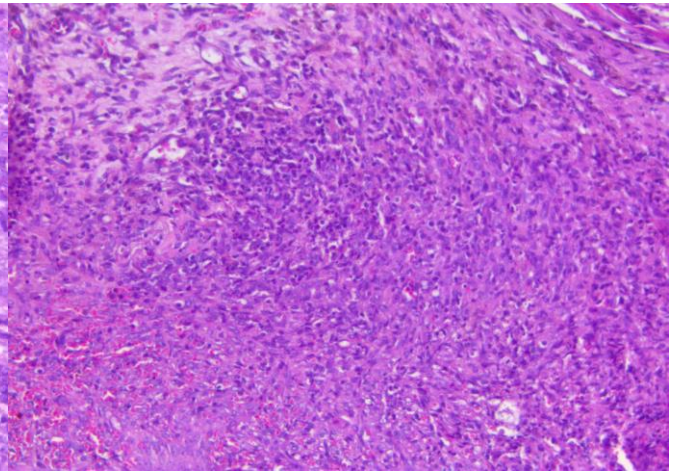


Полная эпителизация, видна грануляционная ткань с признаками зрелости, умеренный ангиогенез, нет лейкоцитов. Ув. x100

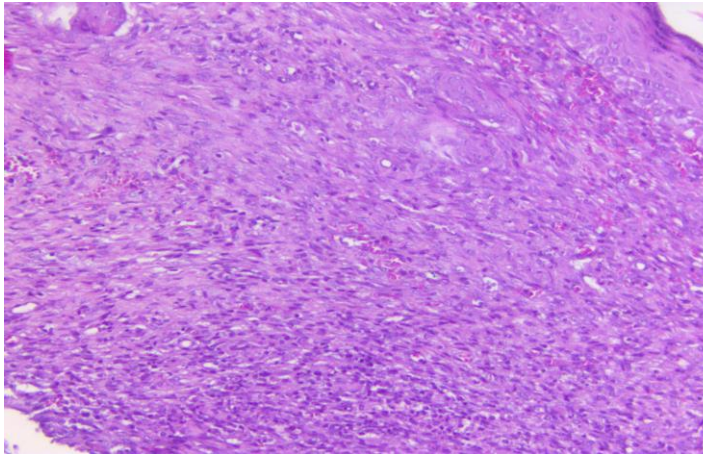
Рисунок 5.29 – Микропрепараты кожной инфицированной раны мышей группы Пилим-1. Окраска гематоксилином и эозином



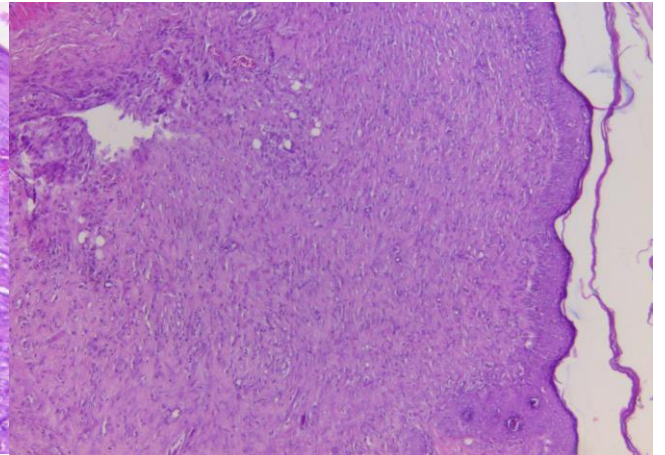
Эпителизация полная, выражена грануляционная ткань, ангиогенез. Ув. x200



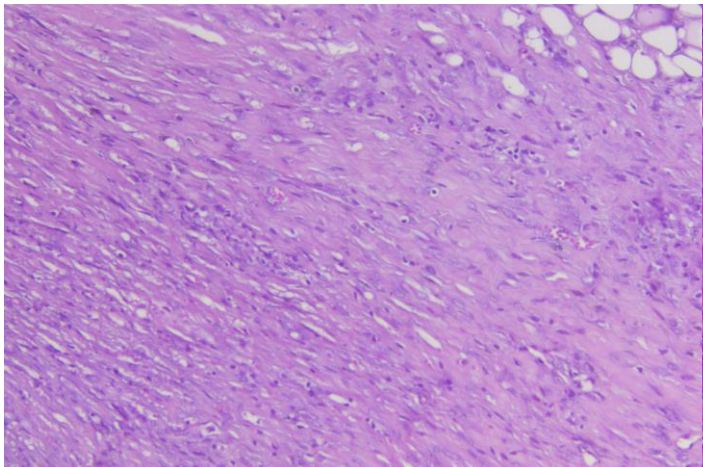
Корка, некротический детрит, выраженное воспаление, кровоизлияния, ангиогенез, грануляционная ткань, много лейкоцитов. Ув. x100



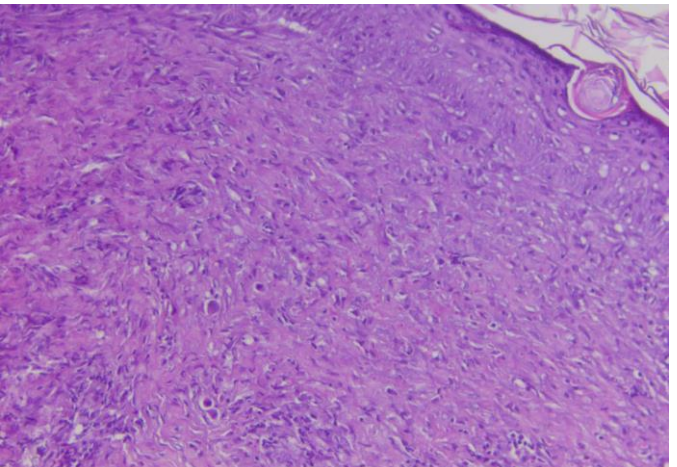
Эпителизация полная, воспаления нет, остатки грануляционной ткани. Ув. x100



Признаки грануляционной зрелости, много лейкоцитов, умеренно выражен ангиогенез. Ув. x100

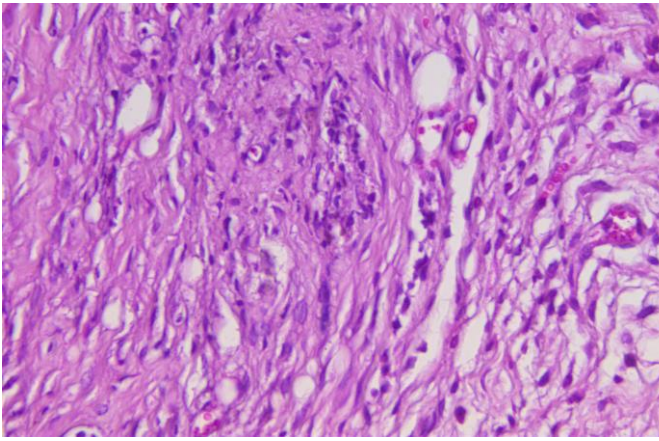


Эпителизация полная, в инфильтрате есть лейкоциты. Ув. x100

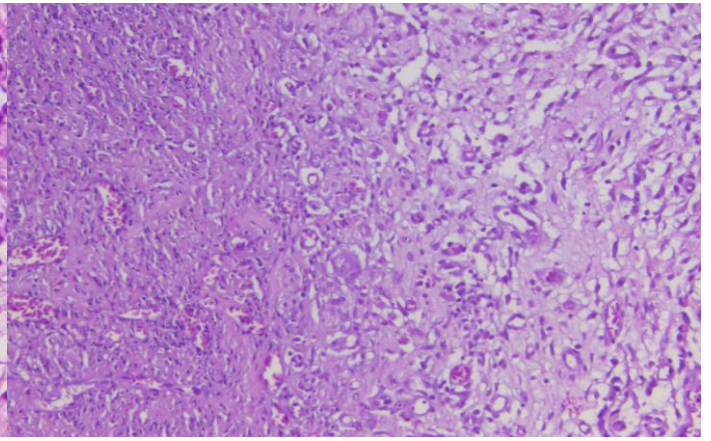


Выражен воспалительный инфильтрат. Ув. x100

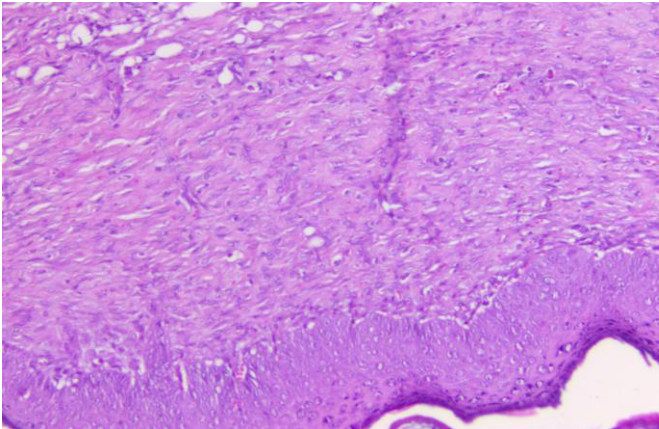
Рисунок 5.30 – Микропрепараты кожной инфицированной раны мышей группы Аллил. Окраска гематоксилином и эозином



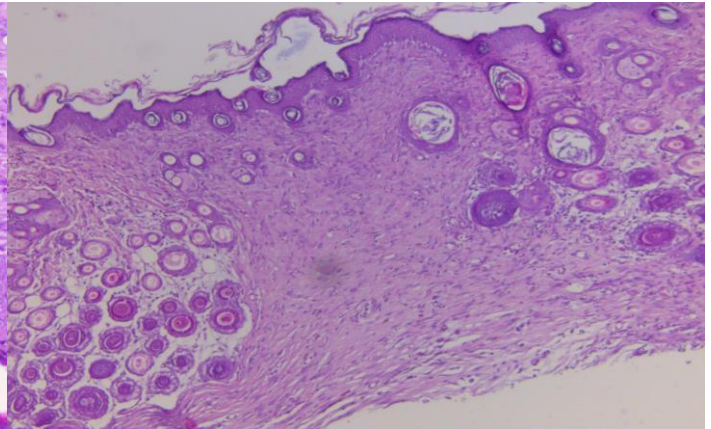
Полная эпителизация, грануляционная ткань, умеренный ангиогенез, небольшое количество плазмоцитов и лимфоцитов, примесь нейтрофилов. Ув. x200



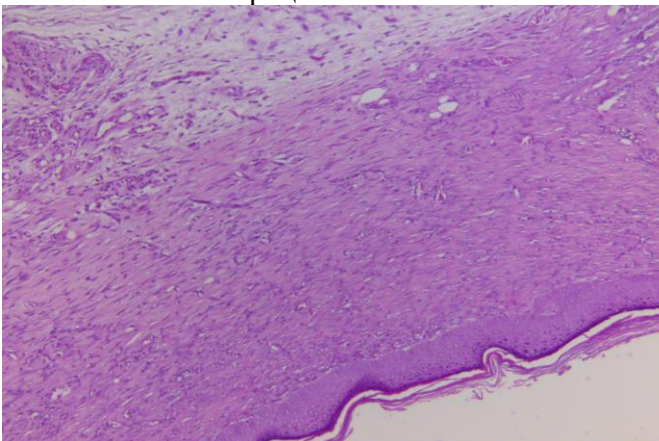
Много лейкоцитов, некротический детрит, неполная эпителизация, более выраженный ангиогенез, заживление не завершилось. Ув. x100



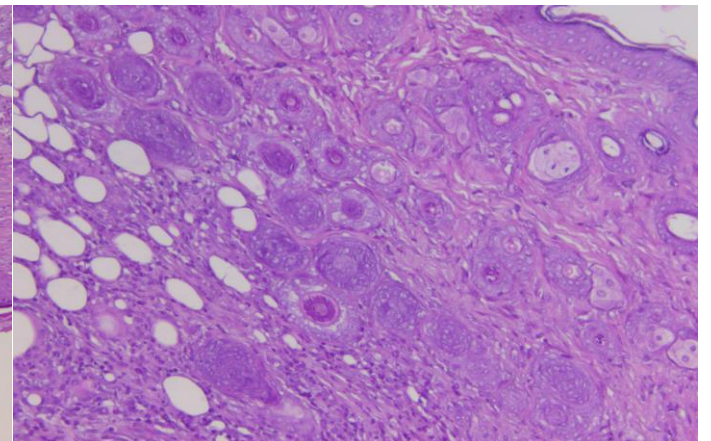
Полная эпителизация, созревающая грануляционная ткань, умеренный ангиогенез, небольшое количество плазмоцитов и лимфоцитов. Ув. x100



Незначительный очаг грануляционной ткани с признаками созревания, лейкоцитов почти нет. Ув. x200



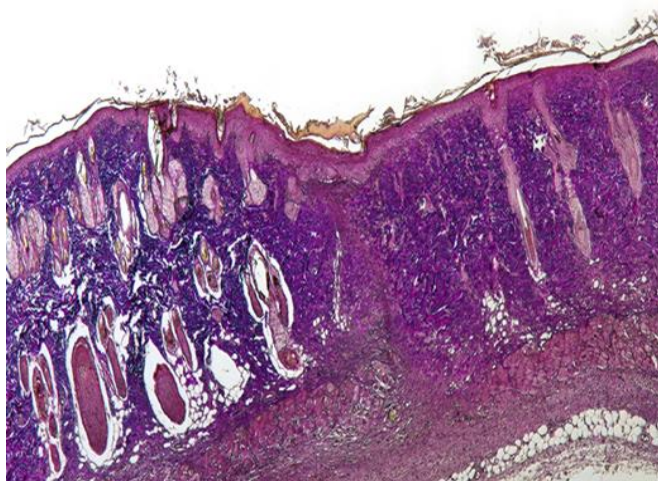
Эпителизация полная, воспаления нет, остатки грануляционной ткани. Ув. x100



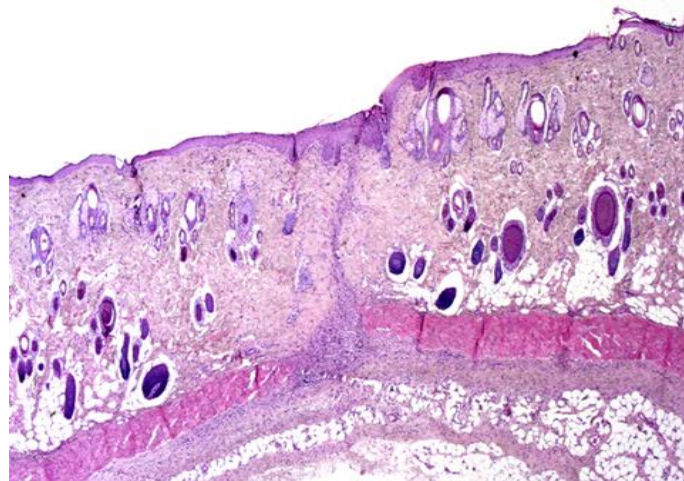
Эпителизация полная, выражено воспаление, много лейкоцитов, выраженный ангиогенез. Ув. x200

Рисунок 5.31 – Микропрепараты кожной инфицированной раны мышей группы Левомеколь®. Окраска гематоксилином и эозином

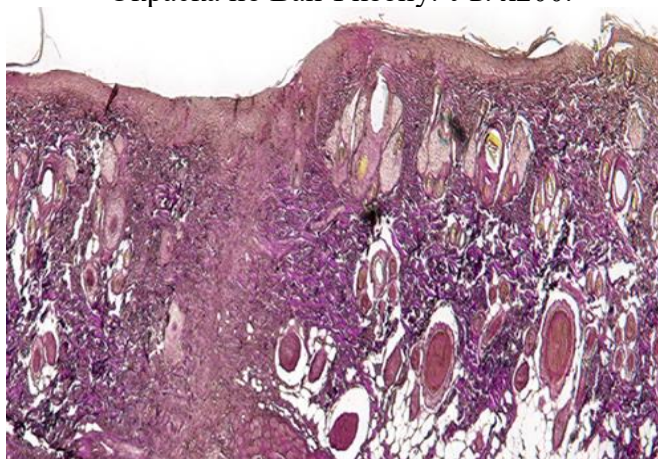
По гистологическим критериям образцы раневых отпечатков кожи крыс, обработанные в процессе эксперимента 1% гелями Пилима-1 и Аллила, демонстрируют более выраженное ранозаживление, чем другие исследуемые вещества и референтные средства. На модели инфицированной плоскостной раны у мышей наиболее эффективным оказался Пилим-1, гистоморфологическая картина раневого отпечатка соответствовала картине ранозаживления при лечении препаратом сравнения Левомеколь®. Толщина пучков коллагеновых волокон на дермальном ретикулярном уровне в зоне повреждения в группе Пилима-1 оказалась визуально меньше, чем в контрольной, особенно в глубоких слоях дермы (Рисунок 5.32).



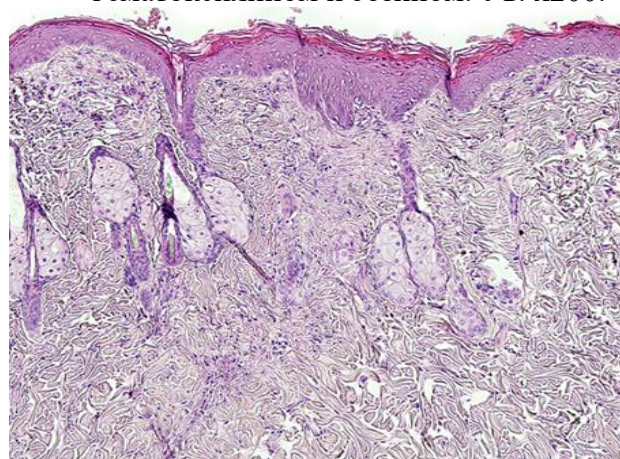
Плоскостная рана, контрольная группа.
Окраска по Ван-Гизону. Ув. x200.



Линейная рана, контрольная группа. Окраска
гематоксилином и эозином. Ув. x200.



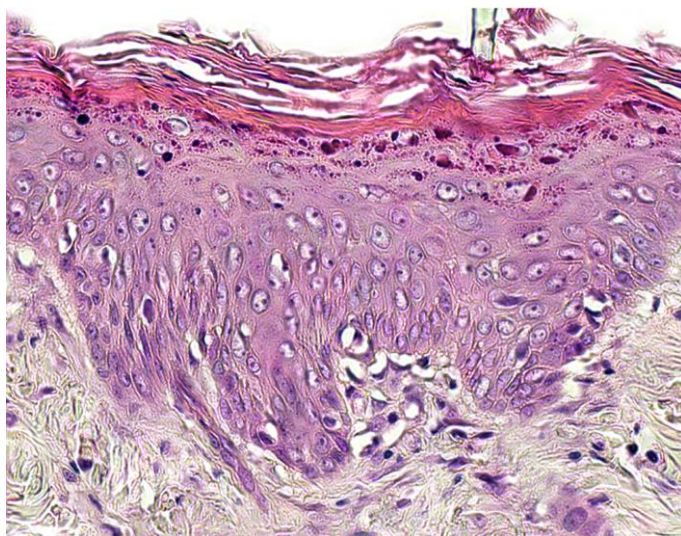
Плоскостная рана, группа Пилима-1. Окраска
по Ван-Гизону Ув. x200.



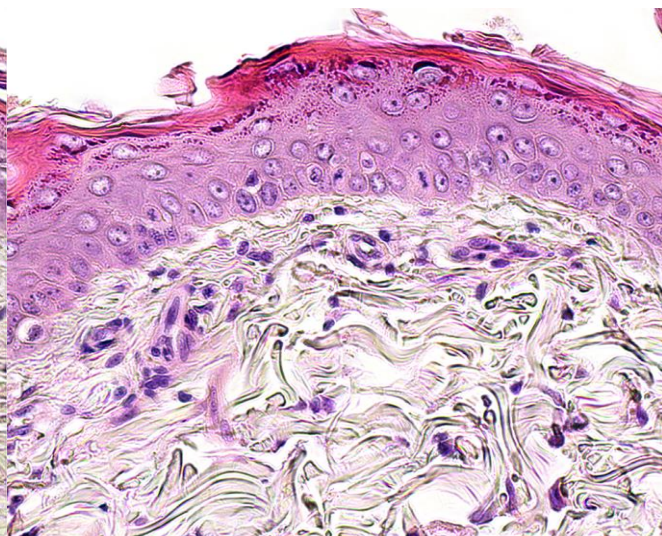
Линейная рана, группа Пилима-1. Окраска
гематоксилином и эозином. Ув. x200.

Рисунок 5.32 – Образцы раневых биоптатов кожи крыс [97]

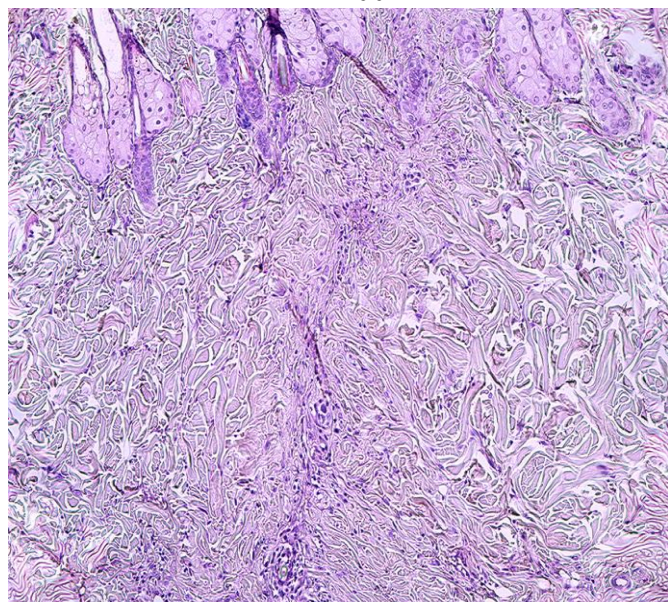
Образцы кожи крыс группы Пилима-1 не показали явных деструктивных изменений, в то время как эпидермис контрольных животных проявлял отек с выраженной вакуолярной гидропической дегенерацией и гиперкератозом, гидропической дегенерацией базального слоя и частичным отторжением эпителия из сосочкового слоя дермы, что указывало на деструктивные процессы в базальной мембране (Рисунок 5.33).



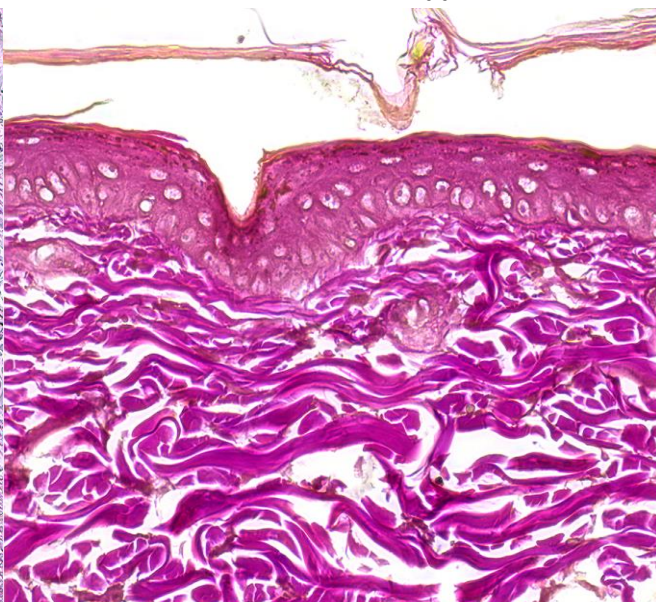
Линейная рана, очаг эпидермис, 7 сутки, контроль. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. x200.



Линейная рана на удалении от очага, 7 сутки, контроль. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. x200.



Линейная рана, очаг, сетчатый слой дермы 7 сутки, Пилим-1. Окраска гематоксилином и эозином. Ув. x100.



Плоскостная рана, эпидермис на удалении, нормальная кератинизация митоз, Пилим-1. Окраска по Ван-Гизону. Ув. x200.

Гистоморфологическая картина раневых биоптатов инфицированной раны у мышей, получавших лечение 1% гелем Пилима-1 и референтным препаратом Левомеколь[®], соответствовала полной эпителизации с отсутствием воспаления.

Проведенные нами гистоморфологические исследования подтверждают выявленные нами ранозаживляющие свойства металлокомплексного соединения цинка под шифром Пиллим-1 и обосновывают перспективы дальнейшего изучения с целью разработки на его основе нового препарата для лечения неинфицированных и гнойных ран.

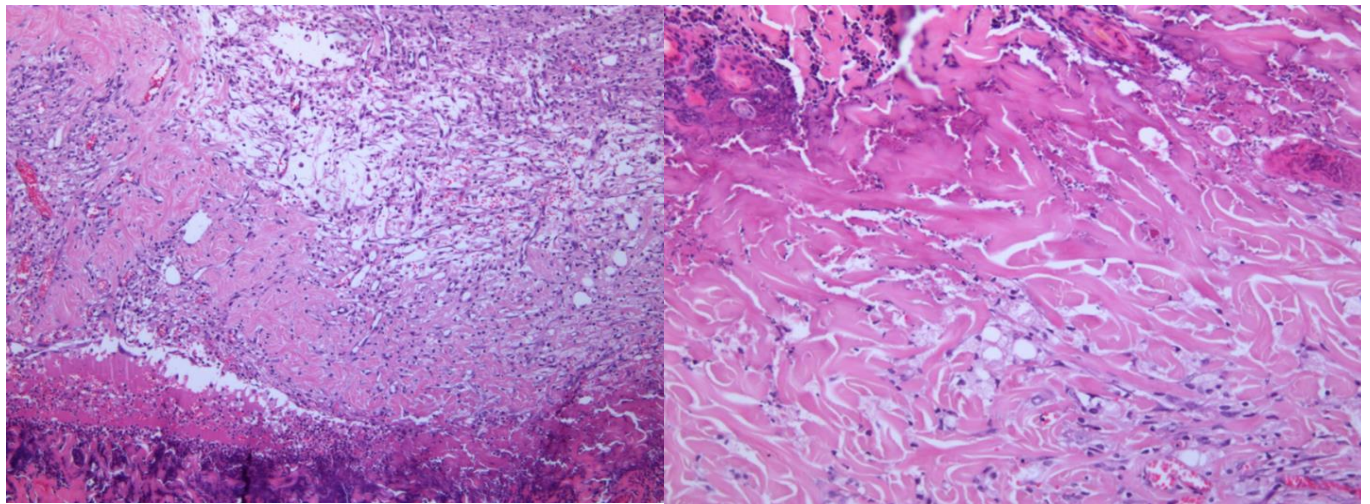
5.2. Гистоморфологический анализ кожных биоптатов при контактном дерматите

В гистологических образцах кожи животных всех групп, кроме получавших Акридерм[®], на 14 сутки после начала лечения была выявлена картина воспаления с некротическим детритом с выраженной грануляционной тканью, паракератозом и гидропической дистрофией, неполной эпителизацией, выраженным ангиогенезом с кровоизлияниями (Рисунок 5.34).

В дерме отмечалось большое количество нейтрофилов и эозинофилов, а также кровеносные сосуды с признаками диапедеза. Данные изменения характерны для выраженного КД и воспаления.

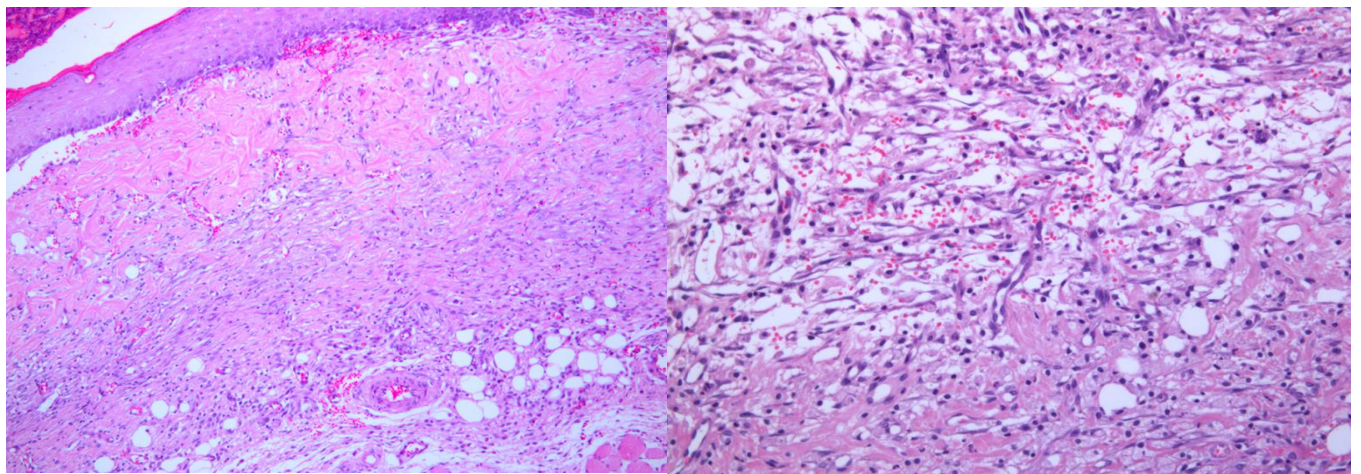
В микропрепаратах кожи крыс, получавших аппликации Акридермом[®], наблюдалась очаговая инфильтрация лимфоидными элементами и признаки слабо выраженного воспаления (Рисунок 5.35).

Таким образом, гистологические образцы демонстрируют, что препарат Акридерм[®] обладает более выраженной противовоспалительной и противоаллергической активностью на модели КД, чем исследованные нами металлокомплексные соединения цинка производные N-алкенилимидазолов. У животных, получавших аппликации Акридермом[®], толщина кожной складки была меньше, чем у животных других групп, в микропрепаратах отмечались менее выраженные признаки воспаления.



А. Ув. x100

Б. Ув. x200



Ув. x100

Ув. x200

Рисунок – 5.34 Микропрепараты кожи крыс экспериментальных групп при моделировании КД на 14 сутки после начала лечения.
Окраска гематоксилином и эозином

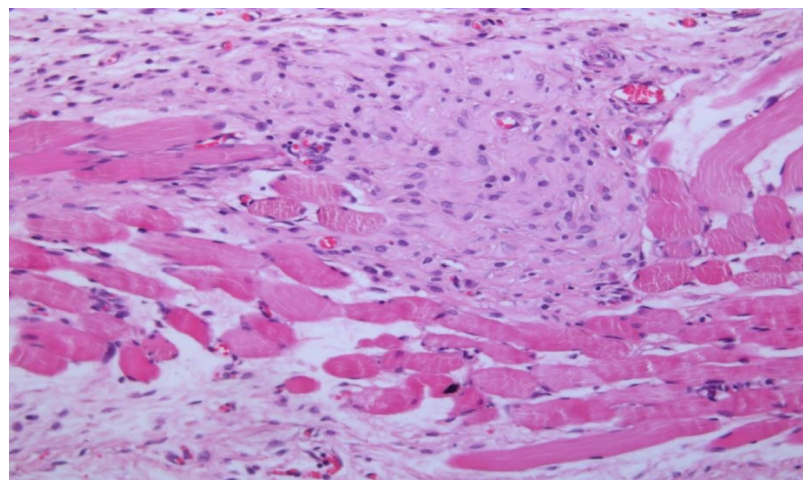


Рисунок 5.35 – Микропрепарат кожи крысы группы Акридерм®.
Окраска гематоксилином и эозином. Ув. x200

ГЛАВА 6. МАТЕРИАЛЫ К ВОЗМОЖНОМУ МЕХАНИЗМУ ДЕРМАТОТРОПНОГО ДЕЙСТВИЯ МЕТАЛЛОКОМПЛЕКСОВ ЦИНКА ПРОИЗВОДНЫХ N-АЛКЕНИЛИМИДАЗОЛОВ

Изучение дерматотропного действия 6 комплексов цинка производных N-алкенилимидазолов позволило выявить соединение под шифром Пилим-1, обладающее наиболее выраженным ранозаживляющим эффектом. Цинк, входящий в структуру этого комплекса, является эссенциальным для организма микроэлементом. Имидазол, выступающий в качестве лиганда, входит в состав различных физиологически активных веществ, а его производные (гистамин, гистидин, карнозин, витамин В₁₂ и др.) играют важную биологическую роль [56; 69; 70]. Предположительно, N-алкенилимидазолы выступают в качестве оптимальных лигандов для цинка, обеспечивая его доставку к клеткам и, таким образом, высокую биодоступность.

Среди изучаемых нами металлокомплексов известен механизм действия Ацизола, который объясняется влиянием на кооперативное взаимодействие субъединиц гемоглобина, в результате чего уменьшается относительное сродство гемоглобина к оксиду углерода, улучшаются кислородсвязывающие (снижение константы Хилла) и газотранспортные свойства крови. Кроме того, Ацизол препятствует образованию высокореактивных АФК и регулирует редокс-процессы в клетке, что может характеризовать его как универсальный регулятор энергообмена.

Выявленный ранее на животных моделях противогипоксический эффект Пилима-1 может играть важную роль при ранозаживлении, улучшая кислородное обеспечение поврежденных тканей. Изучение других возможных механизмов, объясняющих ранозаживляющее действие Пилима-1, представляет несомненный интерес. С этой целью в опытах *in vitro* и на лабораторных животных нами изучено влияние Пилима-1 на процессы микроциркуляции, показатели гемостаза, морфологию и биохимию крови, ферменты антиоксидантной защиты.

Полученные нами результаты могут стать основанием для более глубокого изучения новых инновационных молекул, разработки на их основе эффективных и безопасных ЛС, а также послужить теоретической предпосылкой для синтеза соединений, обладающих дерматотропным действием.

6.1. Влияние Пилима-1 на микроциркуляцию крови

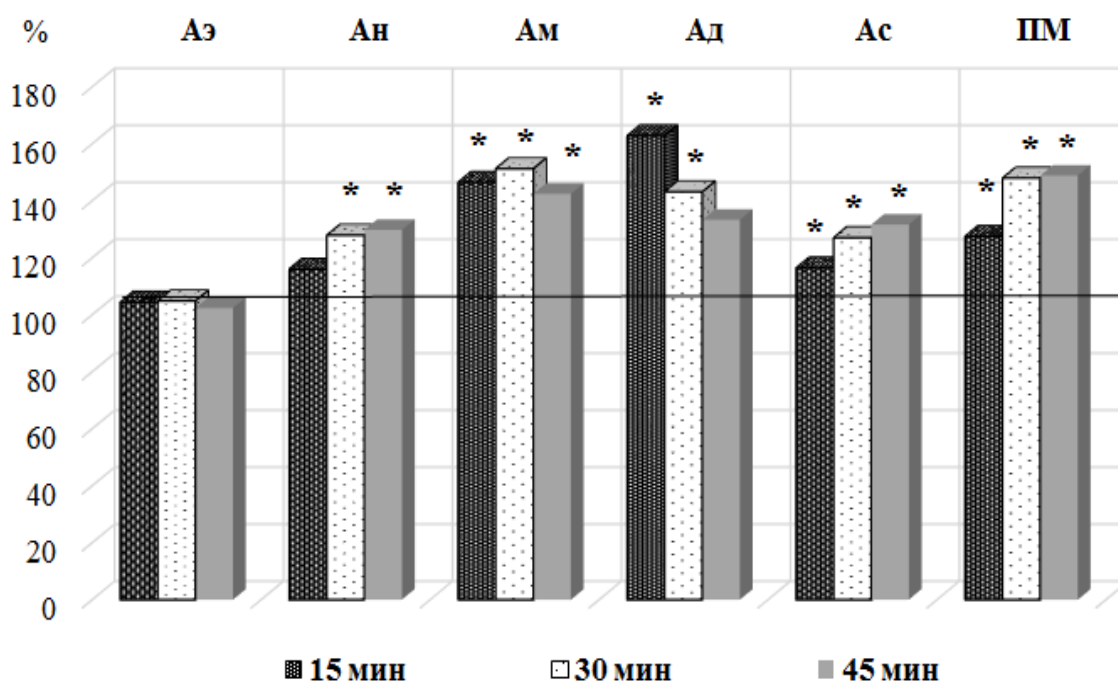
Изменения в микроциркуляторном русле, включающем артериолы, капилляры и вены, являются закономерным ответом организма на повреждающие факторы различного генеза и признаны наиболее чувствительными индикаторами различных патологий. Микроциркуляторные расстройства вызывают системные и регионарные нарушения гемодинамики и нарушают жизнеспособность тканей и их функционирование. Учитывая тот факт, что микрососудистая сеть играет ключевую роль в трофическом обеспечении тканей, оценка ее состояния играет важную роль для понимания механизма ранозаживляющего действия применяемых ЛС. С этой целью мы изучили влияние Пилима-1, обладающего выраженным ранозаживляющим действием, на показатели микроциркуляции у крыс. Через 15 минут после введения Пилима-1 в дозе 20 мг/кг происходили значительные изменения практически всех показателей кожной микрогемодинамики по сравнению с показателями, полученными в контрольной группе (Таблица 6.1) [97].

Амплитуда эндотелиальных колебаний (Аэ). После введения животным Пилима-1 в дозе 20 мг/кг значения показателя Аэ достоверно не изменялись на протяжении всего времени исследования, что свидетельствует об отсутствии влияния вещества на функции эндотелия, синтез и высвобождение из депо молекул, участвующих в регуляции сосудистого тонуса [97]. ПМ, отражающий значение интегральной скорости движения эритроцитов в зондируемом объеме ткани до 1 мм³ в перфузионных единицах, увеличивался через 15 мин на 27%, а через 30 и 45 мин – на 48% ($p \leq 0,05$) по отношению к значениям этого показателя в контрольной группе (Рисунок 6.1).

Таблица 6.1 – Влияние Пилима-1 на показатели кожной микроциркуляции у крыс

Группы		Показатели микроциркуляции					
		Аэ, у.е.	Ан, у.е.	Ам, у.е.	Ад, у.е.	Ап, у.е.	ПМ, перф. ед.
Контроль		5,5±0,86	5,1±0,60	5,7±0,36	5,6±0,93	7,4±0,65	5,6±0,45
Пилим-1	15 мин	5,7±0,77	5,9±0,66	8,4±0,49*	9,2±1,58*	8,6±0,38*	7,1±0,43*
	30 мин	5,8±1,28	6,5±0,67*	8,7±0,68*	8,1±0,45*	9,4±0,68*	8,3±0,71*
	45 мин	5,7±0,73	6,6±0,35*	8,2±0,63*	7,5±0,77	9,7±0,77*	8,3±0,59*

М – среднее арифметическое значение, $M \pm m$ – ошибка среднего, p – уровень достоверности различий по критерию Манна-Уитни относительно значений в контрольной группе; Аэ – амплитуды эндотелиальных колебаний, Ан – амплитуды нейрогенных колебаний, Ам – амплитуды миогенных колебаний, Ад – амплитуды дыхательных колебаний, Ап – амплитуды пульсовых колебаний, ПМ – показатель перфузии [53].



Примечание: Данные представлены в % относительно значений в контрольной группе животных, принятых за 100%. * – уровень достоверности различий по критерию Манна-Уитни относительно значений показателей в контрольной группе животных [29]

Рисунок 6.1 – Изменение показателей микроциркуляции (ПМ) у животных после введения Пилима-1 [97]

Амплитуда нейрогенных колебаний (Ан). К 30 мин исследования отмечалось увеличение Ан на 28% ($p \leq 0,05$) по отношению к значениям контрольной группы животных. Статистически значимые изменения Ан (на 30%) были зафиксированы

через 45 мин после введения Пилима-1 в дозе 20 мг/кг относительно таковых в контроле [97].

Повышение амплитуд колебаний ЛДФ-граммы в нейрогенном диапазоне, которые связаны с симпатическими адренергическими влияниями на гладкие мышцы артериол и артериолярных участков артерио-венулярных анастомозов, отражает снижение периферического сопротивления в данных областях микрорусла, следствием чего является улучшение нутритивного кровотока [53].

Амплитуда миогенных колебаний (Ам). У животных, получавших Пилим-1 в дозе 20 мг/кг, уже к 15 мин после введения происходило статистически значимое увеличение Ам на 47%, к 30 мин – на 51% ($p \leq 0,05$) и к 45 мин – на 42% ($p \leq 0,05$) относительно значений этого показателя в контрольной группе [97]. Увеличение амплитуд миогенных ритмов отражает снижение тонуса прекапиллярных сфинктеров и прекапиллярных метартериол, что сопровождается дилатацией прекапилляров при регистрации базального кровотока, увеличением количества функционирующих капилляров, и, как следствие, к приоритетному току крови в нутритивное русло [53]. Поскольку известно, что ритмы данного диапазона обусловлены колебаниями концентрации Ca^{2+} через мембраны мышечных клеток, повышение Ам свидетельствует о снижении тонуса прекапилляров вследствие развития Ca^{2+} -зависимой мышечной релаксации под влиянием исследуемого соединения [53].

Амплитуда дыхательных колебаний (Ад). Дыхательные волны представлены периодическими изменениями давления в венозном отделе сосудистого русла, вызываемыми дыхательными экскурсиями грудной клетки, и отражают венозный отток [29]. Введение Пилима-1 в дозе 20 мг/кг привело к статистически значимому изменению Ад, причем, максимальное увеличение (на 63%) наблюдалось через 15 мин, а к 30 и 45 мин исследований отмечалось увеличение Ад на 43% и 33% соответственно по отношению к значениям этого показателя в контрольной группе животных [97].

Амплитуда пульсовых колебаний (Ап). Пульсовые колебания кровотока обусловлены перепадами внутрисосудистого давления, которые в большей или

меньшей степени синхронизированы с кардиоритмом. После введения крысам Пилима-1 в дозе 20 мг/кг отмечалось статистически достоверное увеличение Ап через 15, 30, 45 мин на 16, 27, 32% соответственно относительно значений контрольной группы [97].

Таким образом, Пилим-1 в дозе 20 мг/кг оказывал существенное влияние как на перфузию, так и на амплитуды выделенных ритмов ЛДФ-граммы. Особенностью эффектов является отсутствие действия на метаболические процессы эндотелия, связанные с релизингом оксида азота [97]. Улучшение процессов микроциркуляции может способствовать улучшению трофики тканей в области раны и ускорять процессы ранозаживления.

6.2. Влияние Пилима-1 на активность пероксидазы и каталазы

Раневой процесс характеризуется окислительным стрессом, ростом активности свободно-радикальных процессов, увеличением производства АФК, что приводит к повреждению мембран, метаболическим расстройствам в области раны и замедлению сроков заживления. Защита тканей от повреждений, вызванных свободными радикалами, способствует улучшению и ускорению процесса заживления ран. В связи с этим наличие антиоксидантных свойств является важным в механизме ранозаживляющего действия фармакологических средств. С этой целью мы изучили влияние Пилима-1 на активность ключевых ферментов антиоксидантной системы – каталазы и пероксидазы. Оба фермента восстанавливают перекись водорода до воды и молекулярного кислорода (O_2), используя при этом в качестве доноров водорода амины, фенолы и органические кислоты. Как видно из Рисунков 6.2, 6.3 Пилим-1 в концентрации 10 мг/мл проявлял пероксидазную активность на 20% по сравнению с контролем и не влиял на скорость протекания каталазной реакции.

Полученные результаты могут свидетельствовать о наличии слабой антиоксидантной активности у Пилима-1, что может играть важную роль в механизме его ранозаживляющего действия.

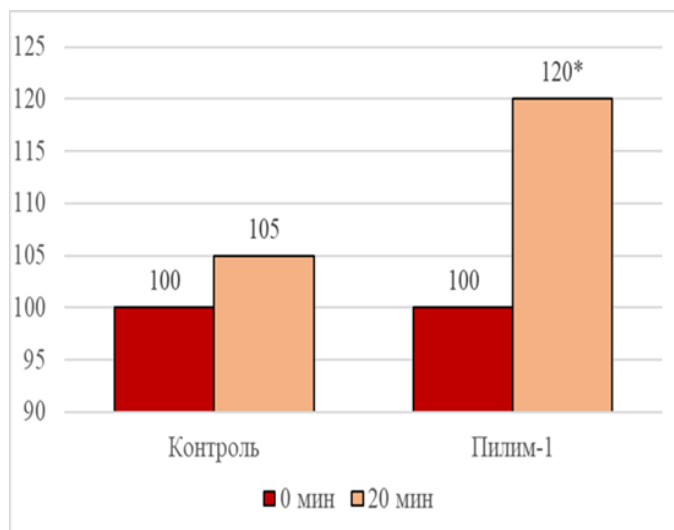


Рисунок 6.2 – Влияние Пилима-1 на пероксидазную активность в сыворотке крови крыс *in vitro*

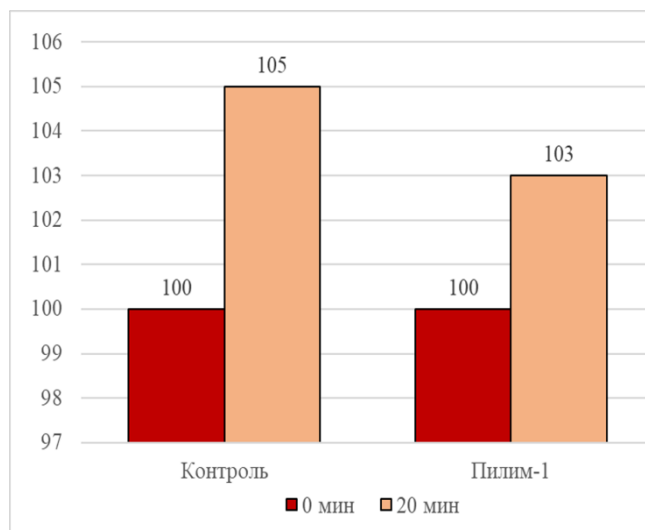


Рисунок 6.3 – Влияние Пилима-1 на каталазную активность в сыворотке крови крыс *in vitro*

6.3. Влияние Пилима-1 на показатели гемостаза

Система гемостаза включается одной из первой в процесс ранозаживления, поэтому изучение влияния веществ с ранозаживляющим действием на процессы свертывания крови представляет особый интерес.

Результаты исследования влияния Пилима-1 и препаратов сравнения на систему гемостаза представлены в Таблице 6.2.

Пилим-1 оказывал влияние на плазменный компонент гемостаза, что выражалось в изменениях показателя внутреннего пути свертывания крови – АПТВ. При этом Пилим-1 не влиял на показатель концентрации фибриногена и ПВ. В то же время вещество проявляло антиагрегационную активность на уровне АСК и эффективнее увеличивал lag-период. Результаты по оценке активации тромбоцитов в присутствии Пилима-1 сопоставимы с результатами, полученными методом Born в отношении агрегации тромбоцитов. АСК не влияла на уровень экспрессии CD62 (P-селектин) в отличие от Пилима-1, растворы которого полностью подавляли активацию тромбоцитов в изученных концентрациях (Таблица 6.3). P-селектин экспрессируется на поверхности активированных тромбоцитов, вследствие чего широко используется как маркер их активации.

Таблица 6.2 – Влияние Пилима-1 и референтных препаратов на систему гемостаза в условиях *in vitro*, Ме (0,25-0,75)

Вещество	Латентный период	Максимальная амплитуда	Скорость агрегации	Время достижения максимальной амплитуды	АПТВ
Пилим-1	+10,3 (9,4-11,8)*#□	-10,2 (9,1-12,5)*□	-13,1 (10,5-14,3)*□	+16,1(15,2-18,3)*□	+9,1 (8,7-10,5)*
АСК	-2,1 (1,1-2,6)	-13,7 (10,8-16,4)*	-10,5 (7,6-12,3)*	+10,5 (8,7-13,4)*	-
Пентоксифиллин	+32,4 (28,7-35,6)*#	-48,4 (42,7-56,5)*#	-34,9 (28,7-39,6)*	+32,1 (27,6-36,4)*#	-
Гепарин натрия	-	-	-		+20,3 (19,7-21,4)*

АСК – Ацетилсалициловая кислота, * $p \leq 0,05$ в сравнении с контролем, # $p \leq 0,05$ в сравнении с АСК, □ $p \leq 0,05$ в сравнении с Пентоксифиллином. $p \leq 0,05$ в сравнении с Гепарином натрия по значению АПТВ. Данные представлены в % к контролю [26].

Таблица 6.3 – Экспрессия CD62 тромбоцитов в присутствии Пилима-1 и референтных препаратов, Ме (0,25-0,75)

Вещество	CD62 АДФ+	CD62 АДФ-
Контроль	1,3 (1,1-1,4)	16,8 (16,1-19,4) †††
Пилим-1	1,1(0,9-1,2)*	1,2 (1,1-1,4)** †††
АСК	1,3 (1,1-1,4)*	16,4 (14,5-17,3)* †††
Пентоксифиллин	1,2 (1,1-1,4)*	1,5 (1,3-1,6)** †

Уровень статистической значимости различий признаков в сравнении с контролем: * – $p > 0,05$, ** – $p \leq 0,05$; уровень статистической значимости различий признаков групп после активации АДФ: † – $p > 0,05$, †† – $p \leq 0,05$. CD62 АДФ- – экспрессия CD62 до воздействия АДФ, CD62 АДФ+ – экспрессия CD62 после воздействия АДФ [26].

Полученные нами результаты влияния референтных препаратов согласуются с данными литературы [26]. Пилим-1 вызывает снижение активации тромбоцитов, что может, в свою очередь, уменьшать вязкость крови и улучшать ее реологические свойства и микроциркуляторные процессы в области раневого повреждения.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Лечение ран является серьезной проблемой современной медицины и здравоохранения. В связи с этим актуальным остается поиск и разработка эффективных ранозаживляющих средств, способных быстро восстанавливать поврежденную архитектуру тканей.

Заживление ран включает: восстановление мембраны, коагуляцию, контроль воспаления, ангиогенез, пролиферацию клеток, ремоделирование тканей и образование рубцов. Все эти процессы протекают с непреременным участием цинка, дефицит которого связан с замедленным заживлением ран и регистрируется у пациентов в критическом состоянии в отделениях интенсивной терапии. Несмотря на очевидную важность роли цинка в восстановлении и регенерации тканей, влияние этого микроэлемента на заживление ран изучено недостаточно [30]. Исходя из вышесказанного, исследование соединений цинка в качестве средств фармакотерапии раневого процесса представляет определенный интерес.

Итоги выполненного исследования. Нами изучено дерматотропное действие 6 металлокомплексов цинка производных N-алкенилимидазолов на моделях неинфицированных линейных и плоскостных ран, инфицированной плоскостной раны, КД. В экспериментах использовали соединения в виде 1% геля на основе Na-КМЦ. Опыты проведены на 212 аутобредных здоровых половозрелых белых крысах обоего пола массой 220-320 г, 120 белых нелинейных мышах-самцах, 24 мышах-самках BALB/c массой 18-20 г.

Изучена острая токсичность 2 новых металлокомплексов при в/б введении мышам. Для 6 соединений изучена токсичность при нанесении на кожу крыс. Было выявлено, что все вещества умеренно токсичны (LD_{50} при в/б введении мышам находится в диапазоне 105-200 мг/кг) и не оказывают раздражающего действия при топическом нанесении на кожу крыс.

Дерматотропное действие изучаемых нами комплексов цинка сравнивали с эффектами известных средств с репаративной, регенерирующей,

противоаллергической и противовоспалительной активностью: Цинка сульфатом, Солкосерилом[®], Метилурацилом[®], Акридермом[®]. Было выявлено, что два из шести изученных комплекса цинка (Пилим-1 и Аллил) проявляют более выраженное ранозаживляющее действие на моделях линейной и плоскостной неинфицированной раны. На модели КД наибольшую активность проявил препарат Акридерм[®], являющийся общепризнанным эффективным противовоспалительным и противоаллергическим средством.

Поскольку течение ранозаживляющего процесса зачастую осложняется микробной обсемененностью, мы изучили наличие антибактериальной и фунгистатической активности у Пилима-1 и Аллила.

Проблема антибиотикорезистентности приобрела в настоящее время глобальные масштабы и требует мероприятий, направленных на выявление новых механизмов резистентности и ограничение распространения устойчивости микроорганизмов к химиотерапии [16; 31].

Изучение антибактериальной активности ионов металлов привлекает все больше внимания, поскольку устойчивость к ним еще не обнаружена у бактерий. Так, в настоящее время продемонстрированы антибактериальные свойства катионов цинка на клинических изолятах *St. pyogenes* [55], *S. aureus* и *P. aeruginosa* [64; 65] на шига-токсигенных *E. coli*, *K. pneumoniae*. Также выявлена способность металла блокировать развитие SOS-реакций, ведущих посредством индукции гипермутагенеза к формированию резистентности бактерий к действию антибиотиков [224], что способствует повышению эффективности антибиотикотерапии хронических инфекций, достижению полной элиминации возбудителя и купированию инфекционного процесса [236]. Показано, что комплексы цинка с соединениями группы фторхинолонов – левофлоксацином и ципрофлоксацином – за счёт изменения проницаемости клеточной мембраны обладают более высокой антимикробной активностью в отношении бактерий *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae* и *B. dysenteriae*, чем исходные антибиотики [227]. У ванкомицина после связывания с цинком отмечается повышенная активность против резистентных к самому ванкомицину бактерий [210].

Однако следует учитывать тот факт, что проникновение цинка в бактериальную клетку вызывает форсирование мутагенеза и обогащение *de novo* мутантов, селекционируемых под давлением механизмов отбора на проявление множественной устойчивости к антибиотикам, в частности, путем образования биоплёнок, существенно повышающих устойчивость бактерий к неблагоприятным условиям. В полностью сформированных биоплёнках цинк не проникает глубоко и действует по поверхности матрикса. В частности, в исследовании, проведенном в НИЦЭМ имени Н.Ф. Гамалеи, показано протективное действие катионов цинка, нанесённых на диск с антибиотиком, в отношении бактерий *S. aureus* [65].

Известна антимикробная активность наночастиц ZnO (ZnONPs) против грамположительных и грамотрицательных бактерий, а также против спор [171]. Механизмы антибактериальной активности частиц ZnO до конца не изучены. Хотя, были предложены некоторые утверждения, например, что основным фактором антибактериальной активности может быть образование перекиси водорода [78] или связывание частиц ZnO на поверхности бактерий за счет электростатических сил. Изучение антибактериального действия ZnONPs в отношении трех штаммов *A. baumannii* показало, что ингибирование роста бактерии происходит благодаря образованию АФК, повышающих уровень ПОЛ, что вызывает утечку мембранных редуцирующих сахаров, белков, ДНК и снижает жизнеспособность клеток [141].

В исследованиях новой субстанции органического происхождения аспарагината цинка была показана способность задерживать рост условно-патогенной микрофлоры, способной вызывать гнойно-септические заболевания [2].

Выявленная нами *in vitro* антибактериальная активность Пилима-1 и Аллила в отношении *S. aureus* 209-P, *E. coli* ATCC 25922, *Pt. vulgaris* ATCC 6896, *P. aeruginosa* ATCC 9027 и слабая фунгистатическая активность в отношении *C. albicans* ATCC 10231 и *M. canis* 352 превышает противомикробную активность Метронидазола и Цинка сульфата. Однако необходимо дальнейшее исследование

противомикробной активности данных металлокомплексов на моделях *in vivo* и изучение возможных механизмов действия. Учитывая тот факт, что комбинации ЛС являются основной терапевтической стратегией, применение данных субстанций с различными антимикробными препаратами может быть одним из альтернативных подходов улучшения эффективности. Так, например, было показано, что Пиритион цинка снижает уровень бактерий, ассоциированных с биопленкой *A. baumannii* и *S. aureus* и проявляет аддиктивный эффект в комбинации с Сульфадиазином серебра, применяемым для местного лечения раневых инфекций [238].

Анализируя полученные нами данные, а также выявленное ранее противогипоксическое [70; 186], противовоспалительное и анальгезирующее действие комплекса с N-изопропенилимидазолом под шифром Пилим-1 [193], можно утверждать, что данное соединение перспективно для разработки в качестве эффективного и безопасного ранозаживляющего средства.

Для нашего понимания возможных механизмов действия Пилима-1 мы изучили его влияние на процессы микроциркуляции, гемостаза и активность ферментов антиоксидантной защиты.

Поскольку травма всегда приводит к повреждению сосудистой сети, остановка кровотечения является первостепенной задачей. Тромбоцитарный этап гемостаза, выражающийся в активации и агрегации тромбоцитов, играет важную роль в иницировании воспалительной фазы заживления ран. Известно, что цинк может усиливать эти процессы путем стимуляции фосфорилирования тирозина белков тромбоцитов. Однако роль цинка в патофизиологическом тромбообразовании при повреждении тканей до сих пор неизвестна.

В наших исследованиях было установлено, что Пилим-1 снижает экспрессию P-селектина (CD62). Данный белок находится в α -гранулах тромбоцитов и тельцах Вейбеля-Паладе эндотелиальных клеток, активированных воспалительной реакцией. P-селектин высвобождается из α -гранул при активации тромбоцитов и экспрессируется на их поверхности, а при остром воспалении участвует в адгезии лейкоцитов к активированному эндотелию. Определение

P-селектина в настоящее время признано надежным маркером активации тромбоцитов.

Уменьшение активации тромбоцитов под влиянием Пилима-1 может свидетельствовать о снижении вязкости крови и улучшении ее реологических свойств. На фоне выявленных нами положительных изменений процессов микроциркуляции при введении Пилима-1 может повышаться трофика тканей в области раневого повреждения, что способствует ускорению процессов ранозаживления. Дальнейшее изучение влияния Пилима-1 на тромбоцитарный гемостаз важно с точки зрения понимания роли вещества в процессах агрегации тромбоцитов, реакции сосудов на повреждение, а также участия P-селектина в заживлении ран. Изучение влияния Пилима-1 на экспрессию P-селектина может также представлять интерес для разработки новых методов лечения заболеваний кожи, в частности, воспалительных.

Необходимо дальнейшее изучение возможных механизмов действия Пилима-1, которые позволят понять не только пути реализации его ранозаживляющего эффекта, но и прольют свет на роль цинка в патофизиологии раневого процесса, процессах регенерации и репарации кожи и тромбообразовании при повреждении тканей.

Таким образом, комплексы цинка производные N-алкенилимидазолов представляют перспективный класс новых оригинальных соединений для поиска и разработки эффективных и безопасных средств дерматотропного действия. Среди 6 изученных нами комплексов было выявлено соединение Пилим-1, обладающее, помимо ранозаживляющего действия, антигипоксическим, антиоксидантным, антимикробным, противовоспалительным и анальгезирующим эффектом. Дальнейшая разработка на основе Пилима-1 нового оригинального препарата представляет интерес для современной практической медицины.

ВЫВОДЫ

1. Изученные металлокомплексы цинка производные N-алкенилимидазолов относятся к классу умеренно токсичных соединений, при наружном применении не оказывают раздражающего действия и не вызывают нарушений функционального состояния кожи крыс.

2. Местное применение 1% гелей металлокомплексов цинка производных N-алкенилимидазолов на основе Na-КМЦ сокращает сроки заживления линейной и плоскостной неинфицированной кожной раны у крыс в сравнении с референтными препаратами Цинка сульфатом, Солкосерилом[®], Метилурацилом[®]. Наиболее выраженный ранозаживляющий эффект проявляли производные N-изопропенилимидазола и N-аллилимидазола под шифрами Пилим-1 и Аллил соответственно.

3. На модели контактного дерматита (КД) у крыс эффективным оказался только референтный препарат Акридерм[®].

4. Для комплексных соединений цинка Пилима-1 и Аллила установлена умеренная антибактериальная активность в отношении *S. aureus* 209-P, *E. coli* ATCC 25922, *Pt. vulgaris* ATCC 6896, *P. aeruginosa* ATCC 9027 и слабая фунгистатическая активность в отношении *C. albicans* ATCC 10231 и *M. canis* 352. Полученные результаты превышают противомикробную активность Метронидазола и Цинка сульфата. При раневой моноинфекции у мышей, вызванной полирезистентным штаммом *P. aeruginosa* Ts 38-16, Пилим-1 и Аллил не проявляют антибактериального действия при лечении в течение 14 суток.

5. По гистологическим критериям образцы раневых отпечатков кожи крыс, обработанные в процессе эксперимента 1% гелем Пилим-1, демонстрируют более выраженное ранозаживление, чем другие исследуемые вещества и референтные средства. Гистоморфологическая картина раневых биоптатов инфицированной раны у мышей, получавших лечение 1% гелем Пилима-1 и референтным препаратом Левомеколь[®], соответствует полной эпителизации с отсутствием воспаления.

6. Ранозаживляющее действие Пилима-1 реализуется, вероятно, за счет высокой биодоступности, обеспечивающей фармакологическую эффективность, направленную на патогенетические механизмы раневого процесса: устранение гипоксии, улучшение микроциркуляции и реологических свойств крови, противомикробного эффекта и нормализации процессов свободно-радикального окисления.

7. Выявленные дерматотропные свойства Пилима-1 позволяют рекомендовать данный комплекс цинка для дальнейшего изучения с целью разработки эффективного средства, стимулирующего репаративную регенерацию ран.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АДФ	– аденозиндифосфорная кислота
АСК	– кислота ацетилсалициловая
АПТВ	– активированное парциальное тромбопластиновое время
АТФ	– аденозинтрифосфорная кислота
АФК	– активная форма кислорода
в/б	– внутрибрюшинно
в/м	– внутримышечно
ГАМК	– гамма-аминомасляная кислота
ГДФ	– гуанозиндифосфат
ГКИТ	– гигантские клетки инородных тел
ГКС	– глюкокортикостероиды
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
2,4-ДНХБ	– 2,4-динитрохлорбензол
ИБС	– ишемическая болезнь сердца
КД	– контактный дерматит
ЛВ	– лекарственное вещество
ЛДФ	– лазерная доплеровская флоуметрия
ЛС	– лекарственные средства
МИК	– минимальная ингибирующая концентрация
ММР	– матриксные металлопротеиназы
МПБ	– мясо-пептонный бульон
МТ	– металлотioneин
ПАФ	– полный адъювант Фрейнда
ПВ	– протромбиновое время
ПМ	– показатель микроциркуляции
ПОЛ	– перекисное окисление липидов
РНК	– рибонуклеиновая кислота

СД	– сахарный диабет
СОД	– супероксиддисмутаза
ТхА2	– тромбоксан А2
ФДЭ	– фосфодиэстераза
цАМФ	– циклический аденозинмонофосфат
цГМФ	– циклический гуанозинмонофосфат
ЦОГ-1	– циклооксигеназа 1 типа
ЭЦМ	– экстрацеллюлярный матрикс
ЯМР	– ядерно-магнитный резонанс
EGF	– эпидермальный фактор роста
ERK	– внеклеточная сигнал-регулируемая киназа
IL	– интерлейкин
IFN- γ	– интерферон гамма
LD ₅₀	– средняя доза вещества, вызывающая гибель половины животных испытываемой группы
Na-КМЦ	– натрий-карбоксиметилцеллюлоза
NF- κ B	– ядерный фактор каппа-В
PDGF	– тромбоцитарный фактор роста
PI3K	– фосфатидилинозитол-3-киназа
PKC	– протеинкиназа С
PMN	– полиморфноядерные лейкоциты
PPAR	– рецепторы, активируемые пероксисомными пролифераторами
FGF	– фактор роста фибробластов
TGF- β	– трансформирующий ростовой фактор
TNF	– фактор некроза опухоли
Treg	– Т-регуляторные клетки
VEGF	– фактор эндотелия сосудов
VSM	– гладкомышечные клетки сосудов

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ацизол в решении проблем цинкдефицитных состояний / З.Х. Бабаниязова, Х.Х. Бабаниязов, И.А. Радионов [и др.] // Микроэлементы в медицине. – 2010. – Т. 11. – № 1. – С. 25–30.
2. Бактерицидные и фунгицидные свойства аспарагината цинка / А.А. Смирнова, Т.Н. Родионова, Е.С. Красникова [и др.] // Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии. – 2016. – Т. 4. – № 20. – С. 30–35.
3. Баринов, А.В. Разработан антидот угарного газа / А.В. Баринов, С.П. Нечипоренко // UNIFOR RASHA. – 2006. – С. 116–117. – Текст: непосредственный.
4. Березовская, И.В. Классификация химических веществ по параметрам острой токсичности при парентеральных способах введения / И.В. Березовская // Химико-фармацевтический журнал. – 2003. – Т. 37. – № 3. – С. 32–34.
5. Бобр, И.С. Сравнительная экспериментально-клиническая оценка сочетанного использования средств, обладающих противогипоксантным, антиоксидантным действием и антисептиков в комплексном лечении воспалительных заболеваний пародонта при сахарном диабете 2-го типа : автореф. дис. ... канд. мед. наук : 14.00.21 / Бобр Ирина Сергеевна ; Московский государственный медико-стоматологический университет Росздрава. – Москва, 2009. – 24 с.
6. Бобр, И.С. Стоматологические композиции для ухода за полостью рта на основе цинка / И.С. Бобр, З.Х. Бабаниязова, Л.А. Дмитриева // Микроэлементы в медицине. – 2010. – № 1 (11). – С. 41–46.
7. Величко, А.К. Методы лабораторного определения общей перекись разрушающей активности ферментов растений / А.К. Величко, В.Б. Соловьев, М.Т. Генгин // Известия ПГПУ им. В. Г. Белинского. – 2009. – Т. 18. – № 14. – С. 44–48.

8. Влияние ацизола на почечные проявления хронической свинцовой интоксикации / В.Б. Брин, А.К. Митчиев, Н.В. Пронина, Х.Х. Бабаниязов // Вестник новых медицинских технологий. – 2008. – Т. 15. – № 3. – С. 25–27.
9. Влияние препарата цинка «Ацизол» на элементный статус и уровень функциональных резервов в условиях повышенных психоэмоциональных и физических нагрузок / А.В. Скальный, А.Д. Фесюн, И.И. Ивашкив [и др.] // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2011. – № 6. – С. 47–55.
10. Григорьян, А.Ю. Раневое покрытие с хлоргексидином и метронидазолом в лечении ран / А.Ю. Григорьян, А.С. Горохова, А.В. Белозерова // Бюллетень северного государственного медицинского университета. – 2017. – Т. 2. – № 1 (37). – С. 4–5.
11. Грудянов, А.И. Изучение эффективности отечественного препарата на основе метронидазола и хлоргексидина в комплексном лечении воспалительных заболеваний пародонта / А.И. Грудянов, Е.В. Фоменко // Пародонтология. – 2015. – Т. 20. – № 2 (75). – С. 38–41.
12. Денисова, М.Н. Натрий-карбоксиметилцеллюлоза как основной компонент полисахаридных реагентов (обзор) / М.Н. Денисова, В.В. Будаева, К.М. Минаев // Ползуновский вестник. – 2016. – Т. 1. – № 4. – С. 5–9.
13. Дерматотропная активность водного извлечения из побегов караганы гривастой на модели атопического контактного дерматита / П.А. Какорин, С.В. Козин, Г.В. Раменская, Л.А. Павлова // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2018. – № 3. – С. 28–33.
14. Дзоциева, Л.Х. Влияние ацизола на функции почек и гематологические показатели при экспериментальной нитритной интоксикации : автореф. дис. ... канд. мед. наук : 14.03.03 / Дзоциева Лора Хасанбекова ; Северо-Осетинская государственная медицинская академия. – Владикавказ, 2010. – 22 с.

15. Доброхотова, Ю.Э. Использование комбинации метронидазола и миконазола в коррекции дисбиоза влагалища / Ю.Э. Доброхотова, И.И. Иванова // РМЖ. Мать и дитя. – 2018. – Т. 1. – № 1. – С. 82–87.
16. Ибрагимова, Р.Р. Проблема антибиотикорезистентности в современном мире / Р.Р. Ибрагимова, П.А. Кузнецов // Актуальные вопросы современной микробиологии и иммунологии. – 2017. – С. 1–2.
17. Изучение ранозаживляющего действия дерматологических пленок с алоэ и актовегином в эксперименте / В.М. Кищенко, Э.Ф. Степанова, А.В. Воронков, С.А. Кулешова // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 3.
18. Изучение специфической активности инновационной лекарственной формы химиотерапевтического средства / С.Р. Нарышкин, И.И. Краснюк, И.И. Краснюк [и др.] // Фармация. – 2022. – Т. 71. – № 4. – С 19–25.
19. Использование полимерных основ в мазях для лечения и профилактики патологии «Диабетическая стопа» / М.А. Огай, Э.Ф. Степанова, В.Ф. Дзюба, Е.В. Морозова // Научные ведомости Белгородского государственного университета. – 2010. – Т. 22. – № 93. – С. 5–9.
20. Крупаткин, А.И. Значение колебательных процессов в диагностике состояния микроциркуляторно-тканевых систем / А.И. Крупаткин // Физиология человека. – 2018. – Т. 44. – № 5. – С. 103–114.
21. Кутяков, В.А. Металлотioneины как сенсоры и регуляторы обмена металлов в клетках / В.А. Кутяков, А.Б. Салмина // Бюллетень сибирской медицины. – 2014. – Т. 3. – № 13. – С. 91–99.
22. Лазерная доплеровская флоуметрия микроциркуляции крови: под редакцией А.И. Крупаткина, В.В. Сидорова. Руководство для врачей, ОАО «Издательство «Медицина». – 2005. – 256 с. – ISBN 5-225-04221-X – Текст : непосредственный.
23. Лебедева, С.А. Сравнительная оценка ранозаживляющего действия комплексных соединений цинка производных N-алкенилимидазола / С.А. Лебедева, П.А. Галенко-Ярошевский (мл.) // сб. тез. Перспективы внедрения

- инновационных технологий в медицине и фармации: сборник материалов VIII Всероссийской научно-технической конференции с международным участием, посвященной Году науки и технологий, 26 ноября 2021 г. / под общ. ред. С.Г. Марданлы, В.В. Помазанова, В.А. Киселевой. – Орехово-Зуево: ГГТУ. – 2021. – 320 с. – ISBN 978-5-87471-410-9. – Текст : непосредственный.
24. Лепешко, П.Н. Токсиколого-гигиеническая оценка новых химических веществ, внедряемых в производство : учебно-методическое пособие / П.Н. Лепешко, Л.М. Бондаренко. – Минск : БГМУ. – 2017. – 55 с. – Текст : непосредственный.
25. Лечение эрозивных поражений слизистой оболочки полости рта с использованием солкосерил дентальной адгезивной пасты / И.И. Адрианова, В.М. Колесник, О.П. Галкина, А.В. Островский [и др.] // Таврический медико-биологический вестник. – 2016. – Т. 19. – № 1. – С. 5–7.
26. Лужанин, В.Г. Методология поиска перспективных лекарственных кандидатов на основе индивидуальных веществ растительного происхождения : дис. ... д-ра фарм. наук : 3.4.2. / Лужанин Владимир Геннадьевич ; науч. конс. И.А. Самылина ; ФГБУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет». – Санкт-Петербург, 2024. – 388 с.
27. Методические указания по изучению общетоксического действия фармакологических веществ / Е.В. Арзамасцев, Т.А. Гуськова, И.В. Березовская [и др.] // Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. – 2-е изд., перераб. и доп. – Москва. – 2005. – С. 41–54. – Текст : непосредственный.
28. Метронидазол – 60 лет применения / И.И. Краснюк (мл.), С.Р. Нарышкин, А.В. Беляцкая [и др.] // Вестник ВГУ, Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2020. – № 1. – С. 82–90.
29. Миринюк, И.С. Механизмы вазо- и кардиотропных эффектов координационных соединений ацетилсалициловой кислоты : дис. ... канд.

- биол. наук : 1.5.5. / Миринюк Ирина Сергеевна ; ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет имени В.И. Вернадского». – Симферополь, 2022. – 237 с.
30. Молекулярные аспекты ранозаживляющего действия цинка как эссенциального микроэлемента / С.А. Лебедева, П.А. Галенко-Ярошевский (мл.), В.О. Рычка [и др.] // Микроэлементы в медицине. – 2022. – Т. 23. – № 1. – С. 14–23.
31. Намазанова-Баранова, Л.С. Антибиотикорезистентность в современном мире / Л.С. Намазанова-Баранова, А.А. Баранов // Педиатрическая фармакология. – 2017. – № 5. – С. 341–354.
32. Об утверждении правил лабораторной практики: Приказ Минздравсоцразвития РФ от 23 августа 2010 г. № 708н: зарегистр. в Минюсте Рос. Федерации 13 октября 2010 г. № 18713 // Российская газета. – 2010.
33. Оценка ранозаживляющего действия металлокомплекса цинка производного N-изопрпенилимидазола на линейной кожной раны у крыс / С.А. Лебедева, П.А. Галенко-Ярошевский (мл.), С.И. Мельник [и др.] // Фармация. – 2021. – Т. 70. – № 6. – С. 49–55.
34. Патент N 2553353 Российская Федерация, МПК А61К 9/48(2006.01), А61К 31/4164(2006.01), А61К 31/63(2006.01), А61К 35/64(2015.01), А61Р 15/02(2006.01) Гинекологические капсулы (овули) для комплексного лечения послеобортного эндометрита : N 2014118392/15 : заявл. 06.05.2014 : опубликовано 10.06.2015 / Шикова Ю.В., Лихоед В.А., Петрова В.В. [и др.]; Государственное автономное научное учреждение Республики Башкортостан "Центр аграрных исследований" Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования "Башкирский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации.
35. Патент N 2115653 Российская Федерация, МПК С07F 3/06(2006.01), А61К 31/315(2006.01), А61К 31/555(2006.01), А61Р 39/02(2006.01), С07F

- 15/06(2006.01). Комплексные соединения замещенных имидазолов, проявляющие антидотную и антигипоксантную активность : № 95121968/04 : заявл. 27.12.1995 : опубликовано 20.07.1998 / Скушникова А.И., Домнина Е.С., Титунов Л.А. [и др.]; патентообладатель Иркутский институт органической химии СО РАН.
36. Патент N 2719360 Российская Федерация, МПК А61К 31/4164 (2006.01), А61К 31/355 (2006.01), А61Р 17/02 (2006.01), С07F 3/06 (2006.01). Комплексные соединения цинка с N-аллилимидазолом как ранозаживляющие средства : заявл. 04.10.2019, опубликовано 17.04.2020 / Свистунов А.А., Тарасов В.В., Лебедева С.А. [и др.]; патентообладатель ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России.
37. Патент N 2725634 Российская Федерация, МПК А61К 31/00 (2006.01), С07F 3/06 (2006.01), А61З 17/02. Комплексное соединение цинка с N-изопрпенилимидазолом как ранозаживляющее средство : заявл. 04.10.2019, опубликовано 03.07.2020 / Свистунов А.А., Тарасов В.В., Лебедева С.А. [и др.]; патентообладатель ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России.
38. Патент N 2633056 Российская Федерация, МПК А61К 38/21(2006.01), А61К 31/4164(2006.01), А61К 31/69(2006.01), А61К 31/198(2006.01), А61Р 31/04(2006.01), А61Р 31/10(2006.01), А61Р 31/12(2006.01), А61Р 37/02(2006.01), А61Р 29/00(2006.01) Лекарственное средство для вагинального применения, обладающее противовирусным, противомикробным, противогрибковым, противопротозойным, противoinфекционным, иммуномодулирующими противовоспалительным действием, в виде мази, геля, суппозитория : N 2016141093 : заявл. 19.10.2016 : опубликовано 11.10.2017 / Марков И.А., Маркова Е.А., Гапонюк П.П. [и др.]; патентообладатели: Марков И.А., Маркова Е.А., Гапонюк П.П., Маркова И.Н.
39. Патент N 2397175 Российская Федерация, МПК С07F 3/06(2006.01), С07F 15/02(2006.01) Производные 1-алкенилимидазола : N 2008151416/04 : заявл.

- 25.12.2008 : опубликовано 20.08.2010 / Трофимов Б.А., Самойлов Н.Н., Бабаниязов Х.Х. [и др.]; патентообладатель ЗАО «Ацизол Фарма».
40. Патент N 2430090 Российская Федерация, МПК C07D 233/54(2006.01), C07F 3/06(2006.01), C07F 15/06(2006.01), A61K 31/4164(2006.01), A61P 43/00(2006.01) Производные 1-аллилимидазола : N 2009139214/04 : заявл. 26.10.2009 : опубликовано 27.09.2011 / Трофимов Б.А., Бабаниязов Х.Х., Станкевич В.К. [и др.]; патентообладатель ЗАО «Ацизол Фарма».
41. Патент N 2605260 Российская Федерация, МПК A61K 9/06(2006.01), A61K 31/416(2006.01), A61K 35/64(2015.01), A61P 1/02(2006.01) Способ комплексного лечения больных с воспалительными заболеваниями пародонта : N 2015142292/15 : заявл. 05.10.2015 : опубликовано 20.12.2016 / Булгакова А.И., Васильева Н.А., Валеев И.В. [и др.]; патентообладатели государственное автономное научное учреждение "Институт стратегических исследований Республики Башкортостан", федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Башкирский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации.
42. Патент N 2624867 Российская Федерация, МПК A61K 9/16(2006.01), A61K31/416(2006.01), A61K 35/64(2015.01), A61P 1/02(2006.01) Способ комплексного лечения больных с воспалительными заболеваниями пародонта : N 2016123650 : заявл. 14.06.2016 : опубликовано 07.07.2017 / Булгакова А.И., Васильева Н.А., Валеев И.В. [и др.]; патентообладатели государственное автономное научное учреждение "Институт стратегических исследований Республики Башкортостан", федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Башкирский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации.
43. Патент N 2628812 Российская Федерация, МПК A61K 36/66(2006.01), A61K 31/7048(2006.01), A61K 36/482(2006.01), A61P 1/04(2006.01) Способ консервативного лечения резидуальных редраковых заболеваний желудка : N

- 2016131672 : заявл. 01.08.2016 : опубликовано 22.08.2017 / Курусин В.М., Власов А.П., Полозова Э.И., Бакайкин В.М., патентообладатель: федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарёва"
44. Патент N 2646450 Российская Федерация, МПК А61К 31/00(2006.01), А61К 36/185(2006.01), А61К 31/4439(2006.01), А61Р 1/04(2006.01) Способ лечения предраковых и ранних стадий раковых заболеваний желудка : N 2017116522 : заявл. 11.05.2017 : опубликовано 05.03.2018 / Курусин В.М., Курусина Е.В.; патентообладатель: Курусин В.М.
45. Патент N 2674447 Российская Федерация, МПК А61К 31/415(2006.01), А61К 31/431(2006.01), А61К 31/4439(2006.01), А61К 31/7048(2006.01), А61К 35/74(2015.01), А61Р 1/04(2006.01) Способ лечения синдрома избыточного бактериального роста в тонком кишечнике у больных сахарным диабетом 2 типа в сочетании с гастродуоденальным хеликобактериозом : N 2017144751 : заявл. 19.12.2017 : опубликовано 10.12.2018 / Федорченко Ю.Л., Марьинюк М.В.; патентообладатель ФГБОУ ВО ДВГМУ Минздрава России.
46. Патент N 2628880 Российская Федерация, МПК А61К 31/4164(2006.01), А61К 31/66(2006.01), А61К 47/10(2006.01), А61Р 1/02(2006.01) Способ лечения быстро прогрессирующего пародонтита (БПП): N 2016141782 : заявл. 24.10.2016 : опубликовано 22.08.2017 / Успенская О.А., Качесова Е.С.; патентообладатель: федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Нижегородская государственная медицинская академия" Министерства здравоохранения Российской Федерации.
47. Патент N 2564963 Российская Федерация, МПК А61В 10/00(2006.01), А61К 31/41(2006.01), А61К 31/4412(2006.01), А61К 31/4439(2006.01), А61К 31/02(2006.01), А61Р 1/04(2006.01) Способ лечения хронического эрозивного гастрита, ассоциированного с *Helicobacter pylori* : N 2014117235/14 : заявл. 28.04.2014 : опубликовано 10.10.2015 / Афанасенкова Т.Е.;

патентообладатель ГБОУ ВПО "Смоленская государственная медицинская академия" Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации.

48. Патент N 2578811 Российская Федерация, МПК А61В 17/03(2006.01), А61К 31/4184(2006.01), А61К 33/14(2006.01), А61К 38/21(2006.01), А61Р 35/00(2006.01), А61М 5/32(2006.01) Способ профилактики развития инфекционно-воспалительных осложнений при трансанальной эндоскопической резекции прямой кишки по поводу опухолей : N 2015105443/14 : заявл. 17.02.2015 : опубликовано 27.03.2016 / Кит О.И.; патентообладатель ФГБУ "Ростовский научно-исследовательский онкологический институт" Министерства здравоохранения Российской Федерации.
49. Патент N 2301062 Российская Федерация, МПК А61К 31/315(2006.01), А61Р 1/02(2006.01) Средство для лечения заболеваний пародонта : N 2005128615/14 : заявл. 14.09.2005 : опубликовано 20.06.2007 / Некрасов М.С., Бабаниязов Х.Х., Бобр И.С. [и др.]; патентообладатель Некрасов М.С.
50. Патент N 2331417 Российская Федерация, МПК А61К 31/4164(2006.01), А61К 31/19(2006.01), А61К 31/315(2006.01), А61Р 39/02(2006.01) Средство для лечения отравлений и их осложнений : N 2006144908/15 : заявл. 18.12.2006 : опубликовано 20.08.2008 / Бабаниязов Х.Х., Ильяшенко К.К., Леженина Н.Ф. [и др.]; патентообладатель ЗАО «Ацизол Фарма».
51. Патент N 2247558 Российская Федерация, МПК А61К 31/4164(2006.01), А61К 9/06(2006.01), А61К 9/08(2006.01), А61Р 17/00(2006.01) Средство на основе ацизола : N 2003128045/15 : заявл. 19.09.2003 : опубликовано 10.03.2005 / Бабаниязова З.Х., Баринов В.А., Шилов В.Н. [и др.]; патентообладатель: Бабаниязова З.Х.
52. Патент N 2633054 Российская Федерация, МПК А61К 9/10(2006.01), А61К 38/21(2006.01), А61К 31/4164(2006.01), А61К 31/69(2006.01), А61К 31/728(2006.01), А61Р 27/02(2006.01) Фармацевтическая композиция в виде

- геля для лечения блефаритов : N 2016138009 : заявл. 23.09.2016 : опубликовано 11.10.2017 / Марков И.А.
53. Показатели кардиореспираторной системы крыс при действии спейсерированного комплекса бис(2-пиридил)-3-(1,2,4-триазолил)пропана и 11-гидрокси-1,1-этилидендифосфоновой кислоты / М.Ю. Раваева, Е.Н. Чуян, И.В. Черетаев [и др.] // Ученые записки Крымского федерального университета имени В.И. Вернадского. Биология. Химия. – 2019. – Т. 5(71), № 4. – С. 124–136.
54. Прозоровский, В.Б. Вопросы обеспечения химической безопасности в Российской Федерации / В.Б. Прозоровский. – Санкт-Петербург, 2007. – С. 72–75. – Текст : непосредственный.
55. Протективные эффекты катионов цинка в отношении *Staphylococcus aureus*, подвергающихся воздействию антибиотиков / С.Б. Чекнёв, Е.И. Вострова, М.А. Сарычева [и др.] // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2019. – № 6. – С. 5–12.
56. Ранозаживляющее действие металлоорганического комплекса цинка на модели плоскостной кожной раны у крыс / С.А. Лебедева, П.А. Галенко-Ярошевский (мл.), С.И. Мельник [и др.] // Научные результаты биомедицинских исследований. – 2022. – Т. 8. – № 1. – С. 71–81.
57. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств: под редакцией А.Н. Миронова. – Ч.1. – М. : Гриф и К. – 2012. – 944 с. – ISBN 978-5-8125-1466-3. – Текст : непосредственный.
58. Русяева, М.Л. Изучение влияния солей цинка на рост пробиотических, патогенных и условно-патогенных штаммов микроорганизмов / М.Л. Русяева, Е.С. Филончикова, Я.А. Сизенцов // Научное обозрение. Педагогические науки. – 2019. – № 5-2. – С. 79–82.
59. Смирнов, В.С. Влияние комбинированного препарата глицирризиновой кислоты и глутамил-триптофана на течение контактного дерматита у крыс / В.С. Смирнов, Т.Н. Саватеева-Любимова, А.В. Саватев // Вестник дерматологии и венерологии. – 2013. – № 5. – С. 124–131.

60. Современные взгляды на медицинскую реабилитацию лиц опасных профессий / А.Б. Белевитин, А.Д. Фесюн, А.А. Божченко [и др.] // Медицина катастроф. – 2011. – № 2. – С. 14–17.
61. Солдатова, Д.С. Изучение влияния концентрации натрий-карбоксиметилцеллюлозы на кровоостанавливающую и противоспаечную активность при операциях на печени в эксперименте / Д.С. Солдатова, А.И. Бежин, Т.Н. Кудрявцева // Сеченовский вестник. – 2020. – Т. 11. – № 1. – С. 4–14.
62. Тиганов, С.И. Применение мирамистина и метронидазола в лечении экспериментальных гнойных ран / С.И. Тиганов, А.Ю. Григорьян, Ю.Ю. Блинков // Сибирское медицинское обозрение. – 2018. – № 1. – С. 43–48.
63. Токманова, С.И. Сравнительная оценка клинической эффективности гелей на основе метронидазола и хлоргексидина / С.И. Токманова, Л.В. Чудова, Ю.В. Луницына // MEDICUS – 2015. – Т. 4. – № 4. – С. 105–107.
64. Торможение роста бактерий в культурах в присутствии катионов меди и цинка / С.Б. Чекнёв, Е.И. Вострова, М.А. Сарычева [и др.] // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2017. – № 3. – С. 26–35.
65. Торможение роста бактерий в культурах *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa* в присутствии катионов меди и цинка / С.Б. Чекнёв, Е.И. Вострова, М.А. Апресова [и др.] // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2015. – № 2. – С. 9–17.
66. Фенчин, К.М. Заживление ран / К.М. Фенчин // Киев. Здоров'я. 1979. – 168 с.
67. Хамама, З. Разработка, стандартизация и изучение биологической активности пленки спермицидного действия, на основе сапонинов *Styrax officinalis* L. : дис. ... канд. фарм. наук : 14.04.01 / Хамама Зина ; ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет). – Москва, 2018. – 217 с.
68. Циколия, Э.М. Фармакодинамика левомеколя / Э.М. Циколия, М.Н. Ивашев // Международный журнал экспериментального образования. – 2016. – № 8. –

- С. 87–88.
69. Шахмарданова, С.А. Фармакологическая коррекция гипоксических состояний металлокомплексными производными N-алкенил-, N-пропаргилимидазолов и 3-гидроксипиридина : дис. ... д-ра биол. наук : 14.03.06 / Шахмарданова Светлана Анатольевна ; ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет». – Белгород, 2018. – 326 с.
70. Шахмарданова, С.А. Металлокомплексные производные 1-алкенилимидазола. Антигипоксические свойства, механизмы действия, перспективы клинического применения / С.А. Шахмарданова, П.А. Галенко-Ярошевский. – Краснодар : издательство Просвещение-Юг. – 2015. – 267 с. – ISBN 978-593491-665-8. – Текст : непосредственный.
71. A novel dermo-cosmetic product containing thermal spring water, sucralfate, copper sulfate, and zinc sulfate in the management of hand eczema / V. Ribet, E. Mielewczyk, A. Sirvent, [et al.] // *Clinical, Cosmetic and Investigation Dermatology*. – 2018. – Vol. 11. – P. 373–381.
72. Activated macrophages induce vascular proliferation / P.J. Polverini, R.S. Cotran, M.A. Gimbrone, E.R. Unanue // *Nature*. – 1977. – Vol. 269. – № 5631. – P. 804–806.
73. Agonist-evoked increases in intra-platelet zinc couple to functional responses / N.S. Ahmed, M.E. Lopes-Pires, K.A. Taylor, N. Pugh // *Thrombosis and Haemostasis*. – 2019. – Vol. 19. – № 1. – P. 128–139.
74. Agren, M.S. Matrix metalloproteinases: how much can they do? / M.S. Agren, U. Keller U. // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – Vol. 21. – № 8. – P. 2678.
75. Ahmed, N. Zinc: an endogenous and exogenous regulator of platelet function during hemostasis and thrombosis / N. Ahmed, M. Lopes-Pires, N. Pugh // *Platelets*. – 2020. – Vol. 1. – № 8.

76. An acrodermatitis enteropathica-associated Zn transporter, ZIP4, regulates human epidermal homeostasis / B-H. Bin, J. Bhin, N-H. Kim, [et al.] // *Journal of Investigative Dermatology*. – 2017. – Vol. 137. – № 4. – P. 874–883.
77. Antibacterial activity and cytotoxicity of 1-phenylalanine-oxidized starch-coordinated zinc (II) / L. Li, H. Wang, C. Jin, [et al.] // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2019. – Vol. 15. – № 123. – P. 133–139.
78. Antibacterial activity and mechanism of action of zinc oxide nanoparticles against *Campylobacter jejuni* / Y. Xie, Y. He, P.L. Irwin, [et al.] // *Applied and Environmental Microbiology*. – 2011. – Vol. 77. – № 7. – P. 2325–2331.
79. Antiviral activity of the zinc ionophores pyrithione and hinokitiol against picornavirus infections / B.M. Krenn, E. Gaudernak, B. Holzer, [et al.] // *Journal of Virology*. – 2009. – Vol. 83. – № 1. – P. 58–64.
80. Apgar, J. Effect of zinc deficiency on parturition in the rat / J. Apgar // *American Journal of Physiology*. – 1968. – Vol. 215. – P. 160–163.
81. Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar / A. Desmouliere, M. Redard, I. Darby, G. Gabbiani // *The American Journal of Pathology*. – 1995. – Vol. 146. – P. 56–66.
82. Application of Acyazol in the context of zinc deficiency and perspectives / G. Aliev, Y. Li, V.N. Chubarev, [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2019. – Vol. 20. – № 9.
83. Bin, B-H. Function, structure, and transport aspects of ZIP and ZnT zinc transporters in immune cells / B-H. Bin, J. Seo, S.T. Kim // *Journal of Immunology Research*. – 2018. – P. 1–9.
84. Bokas, A. Mechanisms of the antitumor activity of low molecular weight heparins in pancreatic adenocarcinomas / A. Bokas, P. Papakotoulas, P. Sarantis // *Cancers*. – 2020. – Vol. 12. – № 2. – P. – 432.
85. Bretón-Romero, R. Hydrogen peroxide signaling in vascular endothelial cells / R. Bretón-Romero, S. Lamas // *Redox Biology*. – 2014. – Vol. 2. – P. 529–534.
86. Brocard, A. Innate immunity: a crucial target for zinc in the treatment of inflammatory dermatosis / A. Brocard, B.J. Dreno // *Journal of the European*

- Academy of Dermatology and Venereology. – 2011. – Vol. 25. – P. 1146–1152.
87. Cardiomyocytes stimulate angiogenesis after ischemic injury in a ZEB2-dependent manner / M.M. Gladka, A. Kohela, B. Molenaar, [et al.] // *Nature Communications*. – 2021. – Vol. 12. – № 1. – P. 84.
88. Cationic zinc is required for factor XII recruitment and activation by stimulated platelets and for thrombus formation in vivo / S.A. Chaudhry, M. Serrata, L. Tomczak, [et al.] // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2020. – Vol. 18. – № 9. – P. 2318–2328.
89. Cleavage of the antithrombin III binding site in heparin by heparinases and its implication in the generation of low molecular weight heparin / Z. Shriver, M. Sundaram, G. Venkataraman, [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2000. – Vol. 12. – № 97 (19). – P. 10365–70.
90. Combination of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and gamma agonists prevents corneal inflammation and neovascularization in a rat alkali burn model / Y. Nakano, T. Arima, Y. Tobita, [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – Vol. 21. – № 93.
91. Crystal and molecular structure of bis(1-vinylimidazole) diacetatozinc / L.V. Baikalova, V.I. Sokol, V.N. Khrustalev, E.A. Zel'bst, [et al.] // *Zhurnal Obshchei Khimii*. – 2005. – Vol. 75. – № 9. – P. 1542–1547.
92. Cui, N. Biochemical and biological attributes of matrix metalloproteinases / N. Cui, M. Hu, R.A. Khalil // *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. – 2017. – Vol. 147. – P. 1–73.
93. Cutting edge: regulatory T cells facilitate cutaneous wound healing / A. Nosbaum, N. Prevel, H.A. Truong, [et al.] // *Journal of Immunology*. – 2016. – Vol. 196. – № 5. – P. 2010–4.
94. Defective Zn²⁺ homeostasis in mouse and human platelets with α and δ -storage pool diseases / S.K. Gotru, J.P. van Geffen, M. Nagy, [et al.] // *Scientific Reports*. – 2019. – Vol. 9. – P. 8333.

95. Dierichs, L. Cellular zinc homeostasis modulates polarization of THP-1-derived macrophages / L. Dierichs, V. Kloubert, L. Rink // *European Journal of Nutrition*. – 2018. – Vol. 57. – № 6. – P. 2161–2169.
96. Dudev, T. Principles governing Mg, Ca, and Zn binding and selectivity in proteins / T. Dudev, C. Lim // *Chemical Reviews*. – 2003. – 103. – P. 773–788.
97. Effective wound healing agents based on N-alkenylimidazole zinc complexes derivatives: future prospects and opportunities / S.A. Lebedeva, P.A. Galenko-Yaroshevsky, T.V. Fateeva, [et al.] // *Research Results in Pharmacology*. – 2023. – Vol. 9. – № 3. – P. 27–39.
98. Effects of Acyazol on zinc content in rat brain and blood plasma / A.F. Yakimoskii, I.I. Shantyr, M.A. Vlasenko, [et al.] // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. – Vol. 162. – № 3. – P. 293–294.
99. Effects of selective peroxisome proliferator activated receptor agonists on corneal epithelial wound healing / Y. Tobita, T. Arima, Y. Nakano, [et al.] // *Pharmaceuticals*. – 2021. – Vol. 14. – P. 88.
100. Emery, M.P. Impaired hemostasis and platelet function in rats fed low zinc diets based on egg white protein / M.P. Emery, J.D. Browning, B.L. O'Dell // *Journal of Nutrition*. – 1990. – Vol. 120. – P. 1062–1067.
101. Eming, S.A. Inflammation in tissue repair: molecular and cellular mechanisms / S.A. Eming, T. Krieg, J.M. Davidson // *Journal of Investigative Dermatology*. – 2007. – Vol. 127. – P. 514–25.
102. Fridlender, B. Selective inhibition of herpes simplex virus type 1 DNA polymerase by zinc ions / B. Fridlender, N. Chejanovsky, Y. Becker // *Virology*. – 1978. – Vol. 84. – № 2. – P. 551–554.
103. Fukada, T. Zinc transporters and signaling in physiology and pathogenesis / T. Fukada // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 2016. – Vol. 611. – P. 43–50.
104. Fukunaka, A. Role of zinc homeostasis in the pathogenesis of diabetes and obesity / A. Fukunaka, Fujitani Y. // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2018. – Vol. 19. – № 2. – 476.

105. G-CSF promotes neovascularization by releasing VEGF from neutrophils / Y. Ohki, B. Heissig, Y. Sato, [et al.] // *The FASEB Journal*. – 2005. – Vol. 19. – P. 739–50.
106. Hayden, D.M. The role of matrix metalloproteinases in intestinal epithelial wound healing during normal and inflammatory states / D.M. Hayden, C. Forsyth, A.J. Keshavarzian // *Journal of Surgical Research*. – 2011. – Vol. 168. – P. 315–324.
107. Heparin: An old drug for new clinical applications / P. Wang, L. Chi, Z. Zhang, [et al.] // *Carbohydrate Polymers*. – 2022. – Vol. 1. – № 295. – P. 119818.
108. Hershinkel, M. The zinc sensing receptor, ZnR/GPR39, in health and disease / M. Hershinkel // *International Journal of Molecular Science*. – 2018. – Vol. 19. – № 2. – P. 439.
109. Hinz, B. Formation and function of the myofibroblast during tissue repair / B. Hinz // *Journal of Investigative Dermatology*. – 2007. – Vol. 127. – P. 526–37.
110. Huang, Y. Causal association of micronutrients and supplements with pressure ulcer: A Mendelian randomization study / Y. Huang, S. Shang, H. Du // *Skin Research and Technology*. – 2024. – Vol. 30. – № 8.
111. Identification and characterization of novel matrix-derived bioactive peptides: a role for collagenase from Santyl® ointment in post-debridement wound healing? / A.R. Sheets, T.N. Demidova-Rice, L. Shi, [et al.] // *PLOS ONE*. – 2016. – Vol. 11. – № 7.
112. Improved healing of the deeply incisional wounds in partially scaled common carp by zinc sulphate bath / M. El-Adl, N. Abdelkhalek, H.A. Mahgoub, [et al.] // *Aquaculture Research*. – 2018. – Vol. 49. – № 10. – P. 3411-3420.
113. Intracellular free zinc up-regulates IFN- γ and T-bet essential for Th1 differentiation in Con-A stimulated HUT-78 cells / B. Bao, A.S. Prasad, F.W.J. Beck, [et al.] // *Bioscience Biotechnology Research Communications*. – 2011. – Vol. 407. – P. 703–707.
114. Investigating the role of PPAR β/δ in retinal vascular remodeling using / S.Y. Ho, Y.P. Kwan, B. Qiu, [et al.] // *International Journal of Molecular Science*. – 2020. – Vol. 21. – P. 4403.

115. Jabłońska-Trypuć, A. Matrix metalloproteinases (MMPs), the main extracellular matrix (ECM) enzymes in collagen degradation, as a target for anticancer drugs / A. Jabłońska-Trypuć, M. Matejczyk, S.J. Rosochacki // *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. – 2016. – Vol. 31(sup 1). – P. 177–183.
116. Jamshidi, D. Antibacterial activity of a novel biocomposite chitosan/graphite based on zinc-grafted mesoporous silica nanoparticles / Jamshidi D., M.R. Sazegar // *International Journal of Nanomedicine*. – 2020. – Vol. 15. – P. 871–883.
117. Kambe, T. Understanding the contribution of zinc transporters in the function of the early secretory pathway / T. Kambe, M. Matsunaga, T.A. Takeda // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2017. – Vol. 8.
118. Kendall, R.T. Fibroblasts in fibrosis: novel roles and mediators / R.T. Kendall, C.A. Feghali-Bostwick // *Frontiers in Pharmacology*. – 2014. – Vol. 5. – № 123.
119. Kim, B. Regulates TCR-mediated Zip6 activation at the immunological synapse / B. Kim, H.Y. Kim, W-W Lee // *Frontiers in Immunology*. – 2021. – Vol. 12. – P. 687367.
120. Kimura, T. The functions of metallothionein and ZIP and ZnT transporters: an overview and perspective / T. Kimura, T. Kambe // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2016. – Vol. 17. – P. 336.
121. Klein, C. Zinc inhibition of adenylyl cyclase correlates with conformational changes in the enzyme / C. Klein, T. Heyduk, R.K. Sunahara // *Cell Signaling*. – 2004. – Vol. 16. – № 10. – P. 1177–85.
122. Klug, A. The discovery of zinc fingers and their development for practical applications in gene regulation and genome manipulation / A. Klug // *Quarterly Reviews of Biophysics*. – 2010. – Vol. 43. – № 1. – P. 1–21.
123. Kogan, S. Zinc and wound healing: a review of zinc physiology and clinical applications / S. Kogan, A. Sood, M.S. Garnick // *Wounds*. – 2017. – Vol. 29. – P. 102–106.
124. Korbecki, J. Self-regulation of the inflammatory response by peroxisome proliferator-activated receptors / J. Korbecki, R. Bobiński, M. Dutka // *Inflammation Research*. – 2019. – Vol. 68. – P. 443–458.

125. Krishnaswamy, V.R. Matrix metalloproteinases: The sculptors of chronic cutaneous wounds. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* / V.R. Krishnaswamy, D. Mintz, I. Sagi // *Molecular Cell Research*. – 2017. – Vol. 1864. – № 11. – P. 2220–2227.
126. Kulikova, A.A. Roles of zinc ions and structural polymorphism of β -amyloid in the development of Alzheimer's disease / A.A. Kulikova, A.A. Makarov, S.A. Kozin // *Molecular Biology*. – 2015. – Vol. 49. – № 2. – P. 217–230.
127. Kurmis, R. Trace element supplementation following severe burn injury: a systematic review and meta-analysis / R. Kurmis, J. Greenwood, E.J. Aromataris // *Journal of Burn Care and Research*. – 2016. – Vol. 37. – P. 143–159.
128. Kyriakides, T.R. Mice that lack matrix metalloproteinase-9 display delayed wound healing associated with delayed reepithelization and disordered collagen fibrillogenesis / T.R. Kyriakides, D. Wulsin, E.A. Skokos // *Matrix Biology*. – 2009. – Vol. 28. – P. 65–73.
129. Lee, S. Effect of zinc and nitric oxide on monocyte adhesion to endothelial cells under shear stress / S. Lee, S.G. Eskin, A.K. Shah // *Annals of Biomedical Engineering*. – 2012. – Vol. 40. – № 3. – P. 697–706.
130. Lyons, A.J. Pentoxifylline – a review of its use in osteoradionecrosis / A.J. Lyons, P.A. Brennan // *The British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. – 2017. – Vol. 55. – № 3. – P. 230–234.
131. Malhotra, A. Current view of zinc as a hepatoprotective agent in conditions of chlorpyrifos induced toxicity / A. Malhotra, D. Dhawan // *Pesticide Biochemistry and Physiology*. – 2014. – Vol. 112. – P. 1–6.
132. Mammadova-Bach, E. Zinc homeostasis in platelet-related diseases / E. Mammadova-Bach, A. Braun A. // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2019. – Vol. 20. – P. 5258.
133. Maret, W. Molecular aspects of human cellular zinc homeostasis: redox control of zinc potentials and zinc signals / W. Maret // *Biometals*. – 2009. – Vol. 1. – № 22. – P. 149–157.
134. Maret, W. Zinc biochemistry: from a single zinc enzyme to a key element of life /

- W. Maret // *Advances in Nutrition*. – 2013. – Vol. 4. – № 1. – P. 82–91.
135. Martin, P. Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly / P. Martin, S.J. Leibovich // *Trends in Cell Biology*. – 2005. – Vol. 15. – P. 599–607.
136. Marx, G. Zinc inhibits FPA release and increases fibrin turbidity / G. Marx, P. Hopmeier // *American Journal of Hematology*. – 1986. – Vol. 22. – № 4. – P. 347–53.
137. Mast cells play role in wound healing through the ZnT2/GPR39/IL-6 axis / K. Nishida, A. Hasegawa, S. Yamasaki, [et al.] // *Scientific Reports*. – 2019. – Vol. 9. – № 1.
138. Maxfield, L. Zinc Deficiency. In: *StatPearls [Internet]* / L. Maxfield, S. Shukla, J.S. Crane // Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. – 2021.
139. Maywald, M. Zinc supplementation induces CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ antigen-specific regulatory T cells and suppresses IFN- γ production by upregulation of Foxp3 and KLF-10 and downregulation of IRF-1 / M. Maywald, L. Rink // *European Journal of Clinical Nutrition*. – 2017. – Vol. 56. – № 5. – P. 1859–1869.
140. McAllister, B.B. Zinc transporter 3 (ZnT3) and vesicular zinc in central nervous system function / B.B. McAllister, R.H. Dyck // *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. – 2017. – Vol. 80. – P. 329–350.
141. Mechanism of anti-bacterial activity of zinc oxide nanoparticle against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* / V. Tiwari, N. Mishra, K. Gadani, [et al.] // *Frontiers in Microbiology*. – 2018. – № 9. – P. 1218.
142. Microenvironmental influence on macrophage regulation of angiogenesis in wounds and malignant tumors / M. Crowther, N.J. Brown, E.T. Bishop, C.E. Lewis // *Journal of Leukocyte Biology*. – 2001. – Vol. 70. – P. 478–490.
143. Molecular mechanisms of wound healing: the role of zinc as an essential microelement / S.A. Lebedeva, P.A. Galenko-Yaroshevsky (Jr.), M.Yu. Samsonov, [et al.] // *Research Results in Pharmacology*. – 2023. – Vol. 9. – № 1. – P. 25–39.

144. Multiple mechanisms of zinc-mediated inhibition for the apoptotic caspases -3, -6, -7, and -8. / S.J. Eron, D.J. MacPherson, K.B. Dagbay, J.A. Hardy // ACS Chemical Biology. – 2018. – Vol. 13. – № 5. – P. 1279–90.
145. Murphy, E. Aspirin in the Modern Era of Cardiovascular Disease Prevention / E. Murphy, J.M.G. Curneen, J.W. McEvoy // Methodist DeBakey Cardiovascular Journal. – 2021. – Vol. 17. – № 4. – P. 36–47.
146. Myofibroblasts and mechanoregulation of connective tissue remodeling / J.J. Tomasek, G. Gabbiani, B. Hinz, [et al.] // Nature Reviews. – 2002. – Vol. 3. – P. 349–63.
147. N₂ non-thermal atmospheric pressure plasma promotes wound healing in vitro and in vivo: Potential modulation of adhesion molecules and matrix metalloproteinase-9 / S.U. Kang, J.W. Choi, J.W. Chang, [et al.] // Experimental Dermatology. – 2017. – Vol. 26. – № 2. – P. 163–170.
148. NF-κB signaling in inflammation / T. Liu, L. Zhang, D. Joo, S.C. Sun // Signal Transduction and Targeted Therapy. – 2017. – Vol. 2.
149. Nishida, K. Regulatory Mechanism of Mast Cell Activation by Zinc Signaling / K. Nishida, R. Uchida // Yakugaku Zasshi. – 2017. – Vol. 137. – № 5. – P. 495–501.
150. Nishida, K. Role of Zinc Signaling in the Regulation of Mast Cell, Basophil-, and T Cell-Mediated Allergic Responses / K. Nishida, R. Uchida // Journal of Immunology Research. – 2018. – P. 1–9.
151. Noninvasive measurement of reepithelialization and microvascularity of suction-blister wounds with benchmarking to histology / H.F. Larsen, M.G. Ahlström, L.M.R. Gjerdrum, [et al.] // Wound Repair and Regeneration. – 2017. – Vol. 25. – № 6. – P. 984–993.
152. Nozdrin, V.I. Morphological aspects of dermatotropic action of methyluracil applied epicutaneously / V.I. Nozdrin, T.A. Belousova, A.N. Iatskovskii // Morfologiya. – 2002. – Vol. 122. – № 5. – P. 74–8.
153. O'Dell, B.L. Analogous effects of zinc deficiency and aspirin toxicity in the pregnant rat / B.L. O'Dell, G. Reynolds, P.G. Reeves // Journal of Nutrition. – 1977. – Vol. 107. – P. 1222–1228.

154. Oeckinghaus, A. The NF-kappa B family of transcription factors and its regulation / A. Oeckinghaus, S. Ghosh // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. – 2009. – Vol. 1. – № 4.
155. Ogawa, Y. Zinc and skin biology / Y. Ogawa, T. Kawamura, S. Shimada // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 2016. – Vol. 1. – № 611) – P. 113–119.
156. Orlova, A.Iu. Effect of actovegin and solkoseryl on microcirculation in experimental critical lower limb ischaemia / A.Iu. Orlova, B.S. Sukovatykh, M.Iu. Gordon // *Angiologiya i Sosudistaya Khirurgiya*. – 2017. – Vol. 23. – № 1. – P. 29–35.
157. Pawlak, K. The alteration in Cu/Zn superoxide dismutase and adhesion molecules concentrations in diabetic patients with chronic kidney disease: The effect of dialysis treatment / K. Pawlak, M. Mysliwiec, D. Pawlak // *Diabetes Research and Clinical Practice*. – 2012. – Vol. 98. – P. 264–270.
158. Pentoxifylline for intermittent claudication / C. Broderick, R. Forster, M. Abdel-Hadi, K. Salhiyyah // *Cochrane Database of Systematic Reviews*. – 2020. – Vol. 10. – CD005262.
159. Pentoxifylline in dermatology / E. Balazic, E. Axler, H. Konisky, [et al.] // *Journal of Cosmetic Dermatology*. – 2023. – Vol. 2. – № 22. – P. 410–417.
160. Peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta agonist suppresses inflammation and promotes neovascularization / Y. Tobita, T. Arima, Y. Nakano, [et al.] // *International Journal of Molecular Science*. – 2020. – Vol. 21. – P. 5296.
161. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and PPAR agonists: The "future" in dermatology therapeutics? / M. Gupta, V.K. Mahajan, K.S. Mehta, [et al.] // *Archives of Dermatological Research*. – 2015. – Vol. 307. – P. 767–780.
162. Physiological roles of zinc transporters: molecular and genetic importance in zinc homeostasis / T. Hara, T-A. Takeda, T. Takagishi, [et al.] // *Journal of Physiological Sciences*. – 2017. – Vol. 67. – P. 283–301.
163. Posthauer, M.E. Nutrition: Fuel for pressure ulcer prevention and healing / M.E. Posthauer // *Nursing*. – 2014. – Vol. 44. – P. 67–69.

164. Prasad, A.S. Discovery of human zinc deficiency: 50 years later / A.S. Prasad // Journal of Trace Elements in Medicine and Biology. – 2012. – Vol. 26 – № 2–3. – P. 66–699.
165. Prasad, A.S. Lessons learned from experimental human model of zinc deficiency / A.S. Prasad // Journal of Immunology Research. – 2020. – P. 9207279.
166. Prasad, A.S. Zinc in humans: health disorders and therapeutic effects / A.S. Prasad // Journal of Trace Elements in Medicine and Biology. – 2014. – Vol. 15. – № 1. – P. 3–12.
167. Prolidase-Associated Trace Elements (Mn, Zn, Co and Ni) in the Patients with Parkinsons Disease / A.K. Verma, A.K. Keshari, J. Rai, [et al.] // Biological Trace Element Research. – 2016. – Vol. 1. – № 171. – P. 48–53.
168. Prophylactic, therapeutic and neutralizing effects of zinc oxide tetrapod structures against herpes simplex virus type-2 infection / T.E. Antoine, Y.K. Mishra, J. Trigilio, [et al.] // Antiviral Research. – 2012. – Vol. 96. – № 3. – P. 363–375.
169. Protective effect of Acyczol in a model of carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity / S.A. Shakhmardanova, Z.H. Babaniyazova, V.V. Tarasov, [et al.] // BioNanoScience. – 2017. – Vol. 7. – № 2. – P. 329–332.
170. Quinoline thiourea-based zinc ionophores with antibacterial activity / D. Subhasis, P. Anjali, H. Nandan, [et al.] // Journal of Medicinal Chemistry. – 2023. – Vol. 66. – № 16. – P. 11078–11093.
171. Raghunath, A. Metal oxide nanoparticles as antimicrobial agents: a promise for the future / A. Raghunath, E. Perumal // IJAA. – 2017. – Vol. 49. – № 2. – P. 137–152.
172. Ramanathan, M. Regulation of VEGF gene expression in murine macrophages by nitric oxide and hypoxia / M. Ramanathan, A. Giladi, S.J. Leibovich // Experimental Biology and Medicine. – 2003. – Vol. 228. – P. 697–705.
173. Reichl, F-X. Comprehensive analytics of Actovegin® and its effect on muscle cells / F-X. Reichl, L.M. Holdt, D. Teupser // International Journal of Sports Medicine. – 2017. – Vol. 38. – № 11. – P. 809–818.

174. Repletion of zinc in zinc-deficient cells strongly up-regulates IL-1 β -induced IL-2 production in T-cells / D. Daaboul, E. Rosenkranz, P. Uciechowski, L. Rink L. // *Metallomics*. – 2012. – Vol. 4. – № 10.
175. Repurposing Pentoxifylline for the treatment of fibrosis: An Overview / W.X. Wen, S.Y. Lee, R. Siang, R.Y. Koh // *Advances in Therapy*. – 2017. – Vol. 34. – № 6. – P. 1245–1269.
176. Review: Inhibitory potential of low molecular weight Heparin in cell adhesion; emphasis on tumor metastasis / U. Ejaz, F. Akhtar, J. Xue, [et al.] // *European Journal of Pharmacology*. – 2021. – Vol. 5. – № 892. – P. 173–178.
177. Rohani, M.G. Matrix remodeling by MMPs during wound repair / M.G. Rohani, W.C. Parks // *Matrix Biology*. – 2015. – Vol. 44-46. – P. 113–121.
178. Rousselle, P. Extracellular matrix contribution to skin wound re-epithelialization / P. Rousselle, M. Montmasson, C. Garnier // *Matrix Biology*. – 2018. – Vol. 75-76. – P. 12–26.
179. Russell, S.T. Antidiabetic properties of zinc-ci2-glycoprotein in ob/ob mice / S.T. Russell, M.J. Tisdale // *Endocrinology*. – 2010. – Vol. 151. – № 3. – P. 948–957.
180. Ruttkay-Nedecky, B. The role of metallothionein in oxidative stress / B. Ruttkay-Nedecky, L. Nejdil, J. Gumulec // *International Journal of Molecular Science*. – 2013. – Vol. 14. – P. 6044–6066.
181. Sabino, F. Matrix metalloproteinases in impaired wound healing / F. Sabino, U. Keller // *Metalloproteinases in Medicine*. – 2015. – Vol. 2. – P. 1–8.
182. Satianrapapong, W. A G-protein coupled receptor 39 agonist stimulates proliferation of keratinocytes via an ERK-dependent pathway / W. Satianrapapong, P. Pongkorpsakol, C. Muanprasat // *Biomedicine and Pharmacotherapy*. – 2020. – Vol. 127. – P. 110–160.
183. Schrufer, R. The proangiogenic capacity of PMN delineated by microarray technique and by measurement of neovascularisation in wounded skin of CD-18-deficient mice / R. Schrufer, S. Sulyok, J. Schymeinsky // *Journal of Vascular Research*. – 2006. – Vol. 43. – P. 1–11.

184. Searle, T. Zinc in dermatology / T. Searle, F.R. Ali, F. Al-Niaimi // *Journal of Dermatological Treatment*. – 2022. – Vol. 33. – № 5. – P. 2455–8.
185. Selective matrix metalloproteinase inhibition increases breaking strength and reduces anastomotic leakage in experimentally obstructed colon / P.M. Krarup, M. Eld, L.N. Jorgensen, M. B. Hansen, [et al.] // *International Journal of Colorectal Disease*. – 2017. – Vol. 32. – P. 1277–1284.
186. Shakhmardanova, S.A. N-alkenylimidazole metal complex derivatives as effective agents for the hypoxic conditions / S.A. Shakhmardanova, P.A. Galenko-Yaroshevsky // *Research result: pharmacology and clinical pharmacology*. – 2017. – Vol. 1. – № 3. – P. 49–72.
187. Shembade, N. Inhibition of NF-kappaB signaling by A20 through disruption of ubiquitin enzyme complexes / N. Shembade, A. Ma, E.W. Harhaj // *Science*. – 2010. – Vol. 26. – № 327 (5969). – P. 1135–9.
188. Skrajnowska, D. Role of Zinc in Immune System and Anti-Cancer Defense Mechanisms / D. Skrajnowska, B. Bobrowska-Korczak // *Nutrients*. – 2019. – Vol. 11. – № 10. – P. 2273.
189. Sobczak, A.I.S. Influence of zinc on glycosaminoglycan neutralisation during coagulation / A.I.S. Sobczak, S.J. Pitt, A.J. Stewart // *Metallomics*. – 2018. – Vol. 10. – № 9. – P. 1180–1190.
190. Solcoseryl® dental-adhäsivpaste-wirkmechanismus und risiken / A. Yildirim, P. Metzler, M. Lanzer, [et al.] // *Swiss Dental Journal*. – 2015. – Vol. 125. – № 5. – P. 612–623.
191. Stelmakh, A. Highly purified calf hemodialysate (Actovegin®) may improve endothelial function by activation of proteasomes: a hypothesis explaining the possible mechanisms of action / A. Stelmakh, O. Abrahamovych, A. Cherkas // *Medical Hypotheses*. – 2016. – Vol. 95. – P. 77–81.
192. Structure of human MDM2 complexed with RPL11 reveals the molecular basis of p53 activation / J. Zheng, Y. Lang, Q. Zhang, [et al.] // *Genes and Development*. – 2015. – Vol. 29. – P. 1524–1534.
193. Study of the anti-inflammatory, analgesic, ulcerogenic and anti-ulcerogenic

- activity of N-isopropenylimidazole zinc complex derivative / P.A. Galenko-Yaroshevsky, O.V. Shelemekh, V.L. Popkov, [et al.] / *Research Results in Pharmacology*. – Vol. 10. – № 1. – P. 23–43.
194. Synthesis, characterization and biological evaluation of Zn (II) and Co (II) complexes of N-allylimidazole as potential hypoxia-targeting agents / L.N. Parchina, L.A. Grishchenko, V.I. Smirnov, [et al.] // *Polyhedron*. – 2019. – Vol. 161. – P. 126–131.
195. Takagishi, T. Recent advances in the role of SLC39A/ZIP zinc transporters in vivo / T. Takagishi, T. Hara, T. Fukada // *International Journal of Molecular Science*. – 2017. – Vol. 18. – № 12. – P. 2708.
196. Taylor, K.A. The contribution of zinc to platelet behaviour during haemostasis and thrombosis / K.A. Taylor, N. Pugh // *Metallomics*. – 2016. – Vol. 8. – № 2. – P. 144–55.
197. The anticoagulant and nonanticoagulant properties of Heparin / D.M.H. Beurskens, J.P. Huckriede, R. Schrijver, [et al.] // *Thrombosis and Haemostasis*. – 2020. – Vol. 120. – № 10. – P. 1371–1383.
198. The biological significance of zinc in inflammation and aging / B. Bao, A. Ahmad, A. Azmi, [et al.] // In: Rahman I., Bagchi D., editors. *Inflammation, Advancing and Nutrition*. New York, NY: Elsevier Inc. – 2013. – P. 15–27.
199. The effect of zinc complex of N-isopropenylimidazole on the morphological characteristics of gum tissues in experimental endodontic-periodontal lesions in rats / P.A. Galenko-Yaroshevsky, A.A. Slavinskiy, S.S. Todorov, [et al.] // *Research Results in Pharmacology*. – 2023. – Vol. 9. – № 4. – P. 1–12.
200. The impact of zinc on the molecular signaling pathways in the diabetes disease / K. Asghari, Z. Shargh, S. Fatehfar, [et al.] // *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. – 2022. – Vol. 72. – 126985.
201. The miR-93-3p/ZFP36L1/ZFX axis regulates keratinocyte proliferation and migration during skin wound healing / X. Feng, S. Zhou, W. Cai, J. Guo // *Molecular Therapy Nucleic Acids*. – 2020. – Vol. 26. – № 23. – P. 450–463.

202. The role of antioxidant micronutrients in the rate of recovery of burn patients: a systematic review / M. Adjepong, P. Agbenorku, P. Brown, I. Oduro // *Burns Trauma*. – 2016. – Vol. 4. – № 18.
203. The role of zinc in antiviral immunity / S.A. Read, S. Obeid, S. Ahlenstiel, G. Ahlenstiel // *Advances in Nutrition*. – 2019. – Vol. 10. – № 4. – P. 696–710.
204. Thingholm, T.E. Why and how to investigate the role of protein phosphorylation in ZIP and ZnT zinc transporter activity and regulation / T.E. Thingholm, L. Rönstrand, P.A. Rosenberg // *Cell and Molecular Life Sciences*. – 2020. – Vol. 77. – № 16. – P. 3085–3102.
205. Tissue concentrations of zinc, iron, copper, and magnesium during the phases of full thickness wound healing in a rodent model / V. Coger, N. Million, C. Rehbock, [et al.] // *Biological Trace Element Research*. – 2019. – Vol. 191. – P. 167–176.
206. Torshin, I.Yu. Bioinformatics in the post-genomic era: sensing the change from molecular genetics to personalized medicine / I.Yu. Torshin // *Nova Biomedical Books*, NY, USA. – 2009.
207. Trace elements, PPARs, and metabolic syndrome / Y. Shi, Y. Zou, Z. Shen, [et al.] // *International Journal of Molecular Science*. – 2020. – Vol. 9. – № 21 (7). – P. 2612.
208. Treatment of COVID-19 with pentoxifylline: Could it be a potential adjuvant therapy? / F. Seirafianpour, S. Mozafarpour, N. Fattahi, [et al.] // *Dermatologic Therapy*. – 2020. – Vol. 33 (4):e13733.
209. Twice-daily oral zinc in the treatment of patients with coronavirus disease 2019: a randomized double-blind controlled / S.B. Abdallah, Y. Mhalla, I. Trabelsi, [et al.] // *Clinical Infectious Diseases*. – 2023. – Vol. 76. – № 2. – P. 185–191.
210. Uivarosi, V. Metal complexes of quinolone antibiotics and their applications: an update / V. Uivarosi // *Molecules*. – 2013. – Vol. 18. – № 9. – P. 11153–11197.
211. VEGF189 induces human neutrophil chemotaxis in extravascular tissue via an autocrine amplification mechanism / M. Ancelin, S. Chollet-Martin, M. Herve, [et al.] // *Laboratory Investigation*. – 2004. – Vol. 84. – P. 502–512.

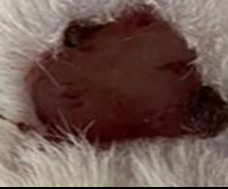

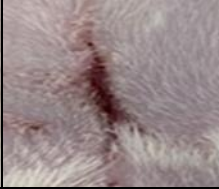

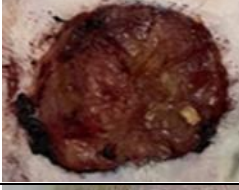
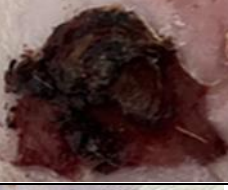









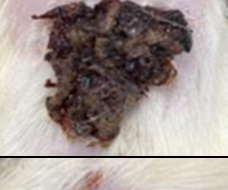



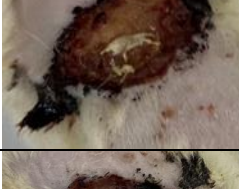




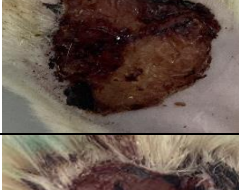









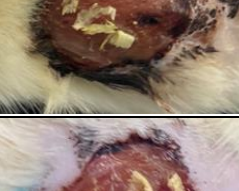





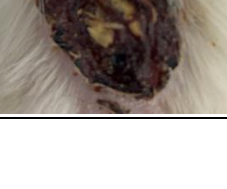

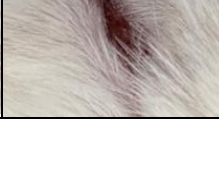
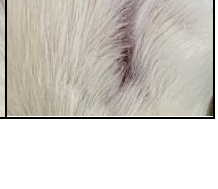
212. Wang, X. Matrix metalloproteinases, vascular remodeling and vascular disease / X. Wang, R.A. Khalil // *Advances in Pharmacology*. – 2018. – Vol. 81. – P. 241-330.
213. Weisel, J.W. Fibrin formation, structure and properties / J.W. Weisel, R.I. Litvinov // *Subcell. Biochem.* – 2017. – Vol. 82. – P. 405–456.
214. Weiss, S.J. Tissue destruction by neutrophils / S.J. Weiss // *The New England Journal of Medicine*. – 1989. – Vol. 320. – P. 365–76.
215. Werner, S. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines / S. Werner, R. Grose // *Physiological Reviews*. – 2003. – Vol. 83. – P. 835–870.
216. Wessels, I. Update on the multi-layered levels of zinc-mediated immune regulation / I. Wessels, H.J. Fischer, L. Rink // *Seminars in Cell and Developmental Biology*. – 2021. – Vol. 115. – P. 62–69.
217. Wound healing in the PU.1 null mouse – tissue repair is not dependent on inflammatory cells / P. Martin, D. D'Souza, J. Martin, [et al.] // *Current Biology*. – 2003. – Vol. 13. – P. 1122–1128.
218. Wynn, T.A. Type 2 cytokines: Mechanisms and therapeutic strategies / T.A. Wynn // *Nature Reviews Immunology*. – 2015. – Vol. 15. – № 5. – P. 271–282.
219. Zabel, U. DNA binding of purified transcription factor NF-kappa B. Affinity, specificity, Zn²⁺ dependence, and differential half-site recognition / U. Zabel, R. Schreck, P.A. Baeuerle // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1991. – Vol. 266. – № 1. – P. 252–60.
220. Zinc activates NF-kappa B in HUT-78 cells / A.S. Prasad, B. Bao, F.W. Beck, F.H. Sarkar // *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. – 2001. – Vol. 138. – № 4. – P. 250–256.
221. Zinc and cardiovascular disease / P.J. Little, R. Bhattacharya, A.E. Moreyra, I.L. Korichneva // *Nutrition*. – 2010. – Vol. 26, № 11. – P. 1050–1057.
222. Zinc and respiratory viral infections: important trace element in anti-viral response and immune regulation / F. Sadeghsoltani, I. Mohammadzadeh, M-M. Safari, [et al.] // *Biological Trace Element Research*. – 2022. – Vol. 200. – № 6. – P. 2556–2571.

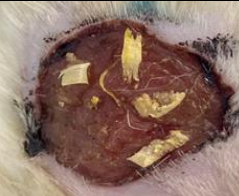




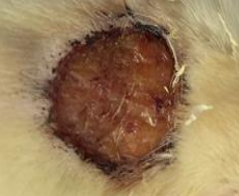




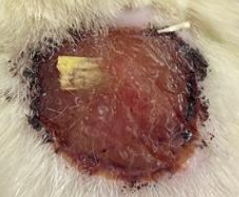









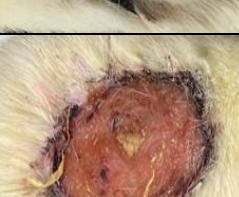





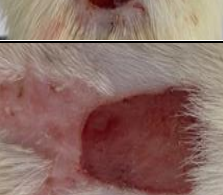



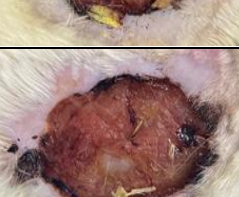

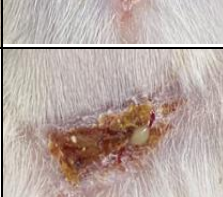
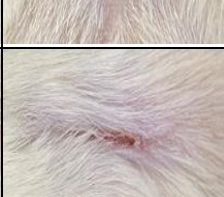

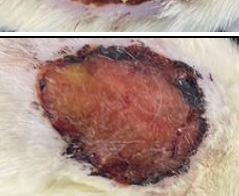




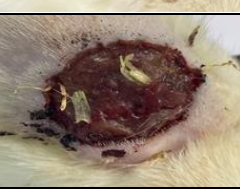




223. Zinc and skin disorders / Y. Ogawa, M. Kinoshita, S. Shimada, T. Kawamura // *Nutrients*. – 2018. – Vol. 10. – № 2. – P. 199.
224. Zinc blocks SOS-induced antibiotic resistance via inhibition of RecA in *Escherichia coli* / B.E. Bunnell, J.E. Escobar, K.L. Bair, [et al.] // *PLoS One*. – 2017. – Vol. 12. – № 5. – P. 1–20.
225. Zinc (II) complexes with amino acids for potential use in dermatology: synthesis, crystal structures, and antibacterial activity / M. Abendrot, L. Checinska, J. Kusz, [et al.] // *Molecules*. – 2020. – Vol. 25. – № 4. – P. 951.
226. Zinc, copper, and selenium tissue levels and their relation to subcutaneous abscess, minor surgery, and wound healing in humans / U. Mirastschijski, A. Martin, L.N. Jorgensen, [et al.] // *Biological Trace Element Research*. – 2013. – Vol. 153. – P. 76–83.
227. Zinc deficiency induces production of the proinflammatory cytokines IL-1 β and TNF α in promyeloid cells via epigenetic and redox-dependent mechanisms / I. Wessels, H. Haase, G. Engelhardt, L. Rinc // *Journal of Nutritional Biochemistry*. – 2013. – Vol. 24. – № 1. – P. 289–97.
228. Zinc enhances the number of regulatory T cells in allergen-stimulated cells from atopic subjects / E. Rosenkranz, R.D. Hilgers, P. Uciechowski, [et al.] // *European Journal of Clinical Nutrition*. – 2017. – Vol. 56. – № 2. – P. 557–567.
229. Zinc finger / C. Isernia, G. Malgieri, L. Russo, [et al.] // *Metal Ions in Life Sciences*. – 2020.
230. Zinc (II) iminopyridine complexes as antibacterial agents: a structure-to-activity study / S. Moratila, S.C. Angulo, N. Gomez-Casanova, [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – Vol. 25. – № 7. – P. 4011.
231. Zinc in specialized secretory tissues: roles in the pancreas, prostate, and mammary gland / S.L. Kelleher, N.H. McCormick, V. Velasquez, V. Lopez // *Advances in Nutrition*. – 2011. – Vol. 2. – № 2. – P. 101–111.
232. Zinc in wound healing modulation / P.H. Lin, M. Sermersheim, H. Li, [et al.] // *Nutrients*. – 2017. – Vol. 10. – № 1. – P. 16.


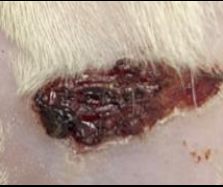



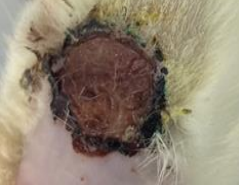





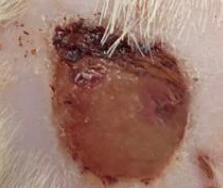




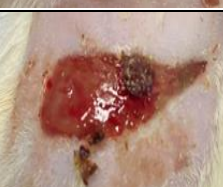







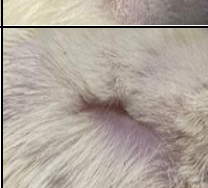

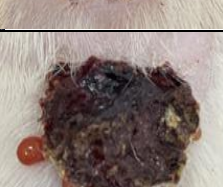








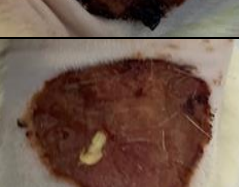




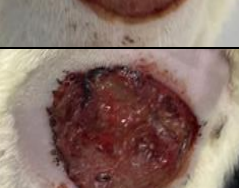




233. Zinc inhibits phosphate-induced vascular calcification through TNFAIP3-Mediated Suppression of NF- κ B / J. Voelkl, R. Tuffaha, T.T.D. Luong, [et al.] // Journal of the American Society of Nephrology. – 2018. – Vol. 29. – № 6. – P. 1636–1648.
234. Zinc intake and status and risk of type 2 diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis / J.C. Fernandez-Cao, M. Warthon-Medina, V.H. Moran, [et al.] // Nutrients. – 2019. – Vol. 11. – № 5. – 1027.
235. Zinc is a transmembrane agonist that induces platelet activation in a tyrosine phosphorylation-dependent manner / B.R. Watson, N.A. White, K.A. Taylor, [et al.] // Metallomics. – 2016. – Vol. 8. – № 1. – P. 91–100.
236. Zn (II) mediates vancomycin polymerization and potentiates its antibiotic activity against resistant bacteria / A. Zarkan, H.R. Mackline, D.Y. Chirgadze, [et al.] // Scientific Reports. – 2017. – Vol. 7. – № 1. – P. 4893.
237. Zinc modulates thrombin adsorption to fibrin / P. Hopmeier, M. Halbmayer, M. Fischer, G. Marx // Thrombosis Research. – 1990. – Vol. 58. – № 3. – P. 293–301.
238. Zinc Pyrithione improves the antibacterial activity of silver sulfadiazine ointment / C. Blanchard, L. Brooks, K. Ebsworth-Mojica, [et al.] // mSphere. – 2016. – Vol. 1. – № 5. – P. 1–14.
239. Zinc regulates reactive oxygen species generation in platelets / M.E. Lopes-Pires, N.S. Ahmed, D. Vara, [et al.] // Platelets. – 2021. – Vol. 32. – № 3. – P. 368–377.
240. Zinc status and autoimmunity: a systematic review and meta-analysis / A. Sanna, D. Firinu, P. Zavattari, P. Valera // Nutrients. – 2018. – Vol. 10. – № 1. – P. 68.
241. Zinc supplementation augments TGF- β 1-dependent regulatory T cell induction / M. Maywald, S.K. Meurer, R. Weiskirchen, L. Rink // Molecular Nutrition and Food Research. – 2017. – Vol. 61. – № 3.
242. Zinc supplementation induces regulatory T cells by inhibition of Sirt-1 deacetylase in mixed lymphocyte cultures / E. Rosenkranz, C.H. Metz, M. Maywald, [et al.] // Molecular Nutrition and Food Research. – 2016. – Vol. 60. – № 3. – P. 661–671.


























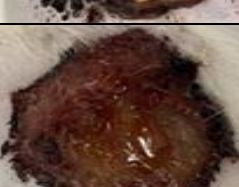










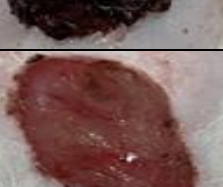





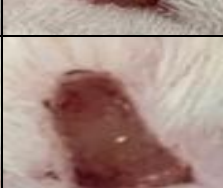


243. Zinc supplementation modulates NETs release and neutrophils' degranulation / W. Kuźmicka, A. Manda-Handzlik, A. Cieloch, A. Mroczek // *Nutrients*. – 2020. – Vol. 2. – № 13 (1). – P. 51.
244. Zinc therapy in dermatology: a review / M. Gupta, V.K. Mahajan, K.S. Mehta, [et al.] // *Dermatology Research and Practice*. – 2014. – P. 709152.
245. ZNF224, kruppel like zinc finger protein, induces cell growth and apoptosis-resistance by down-regulation of p21 and p53 via miR-663a / J.G. Cho, S. Park, C.H. Lim, [et al.] // *Oncotarget*. – 2016. – Vol. 7. – P. 31177–31190.






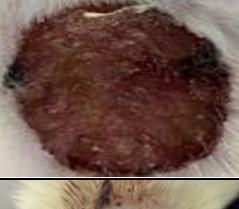




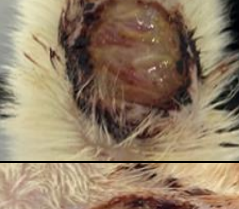
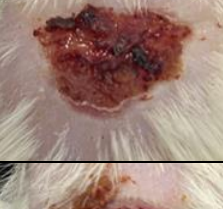
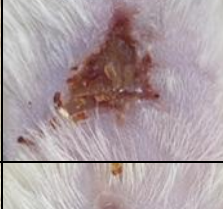



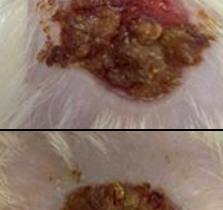
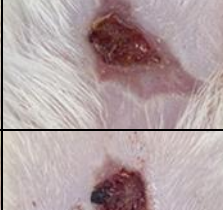

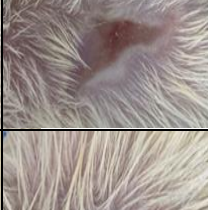
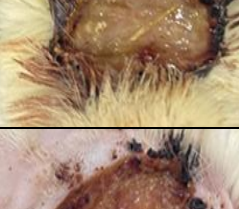
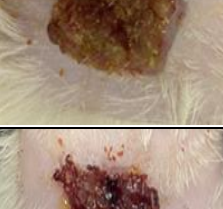
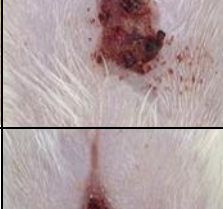

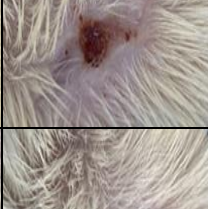

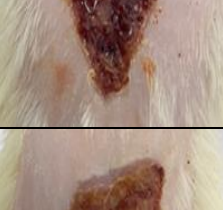

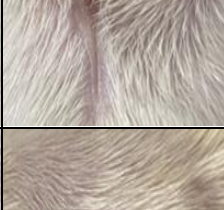

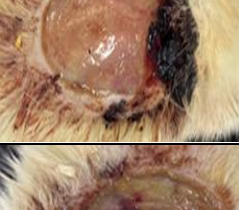
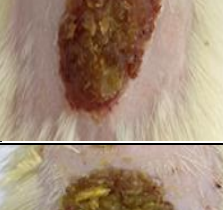
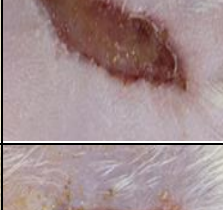
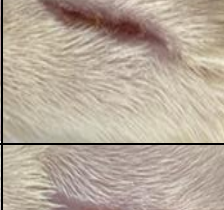
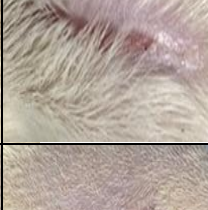


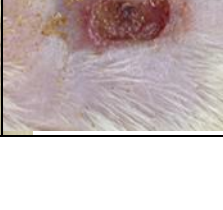
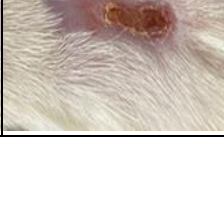

**ПРИЛОЖЕНИЕ А. Фоторяд, демонстрирующий динамику заживления плоскостной
кожной раны у крыс**

Группа	Время эксперимента, сутки				
	3	10	17	24	29
Контроль					
Контроль					
Контроль					
Контроль					
Контроль					
Контроль					
Na-КМЦ					
Na-КМЦ					
Na-КМЦ					

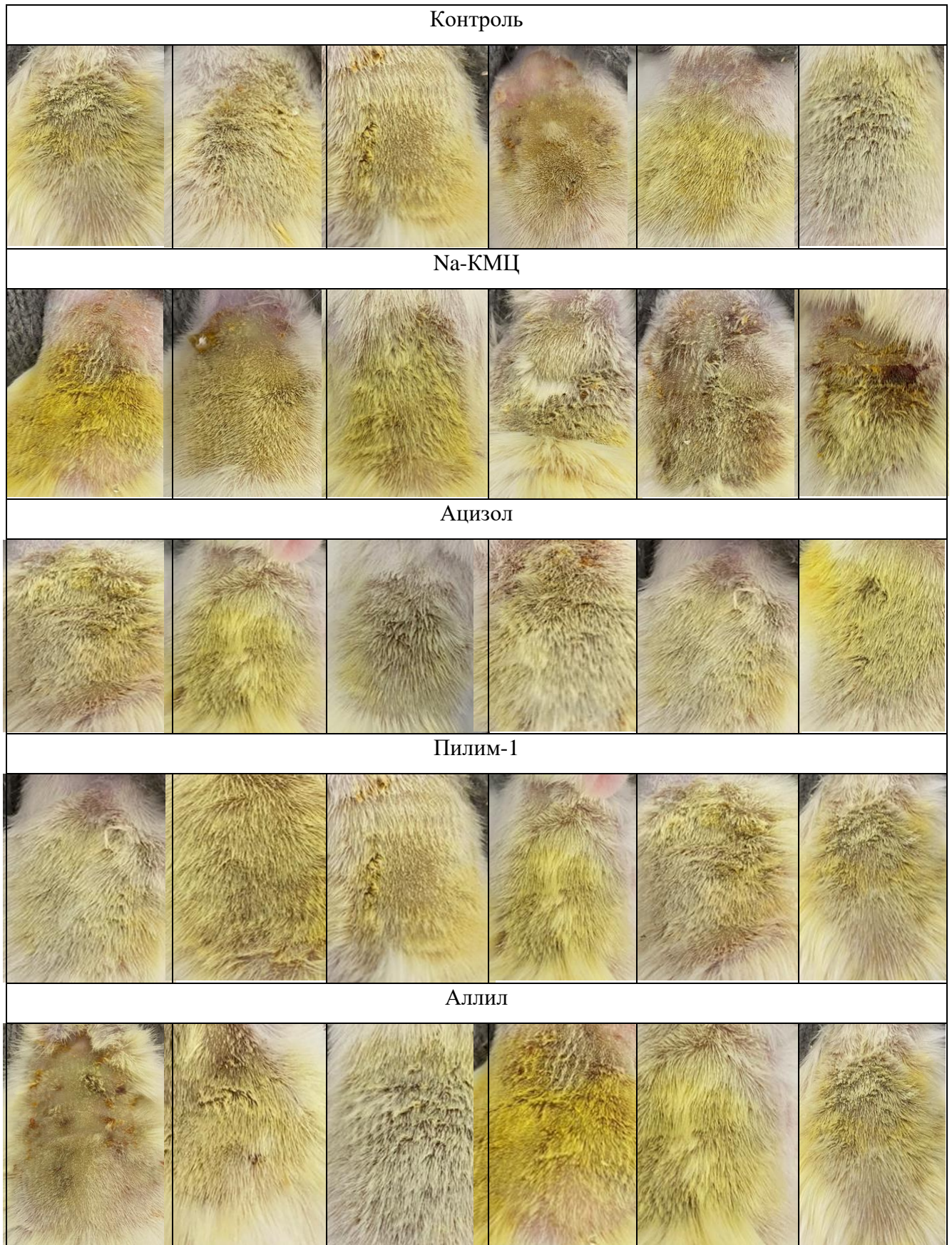
Группа	Время эксперимента, сутки				
	3	10	17	24	29
Na-КМЦ					
Na-КМЦ					
Na-КМЦ					
Ацизол					
Ацизол					
Ацизол					
Ацизол					
Ацизол					
Пилим					

Группа	Время эксперимента, сутки				
	3	10	17	24	29
Пилим					
Пилим					
Пилим					
Пилим					
Пилим					
Аллил					
Аллил					
Аллил					
Аллил					

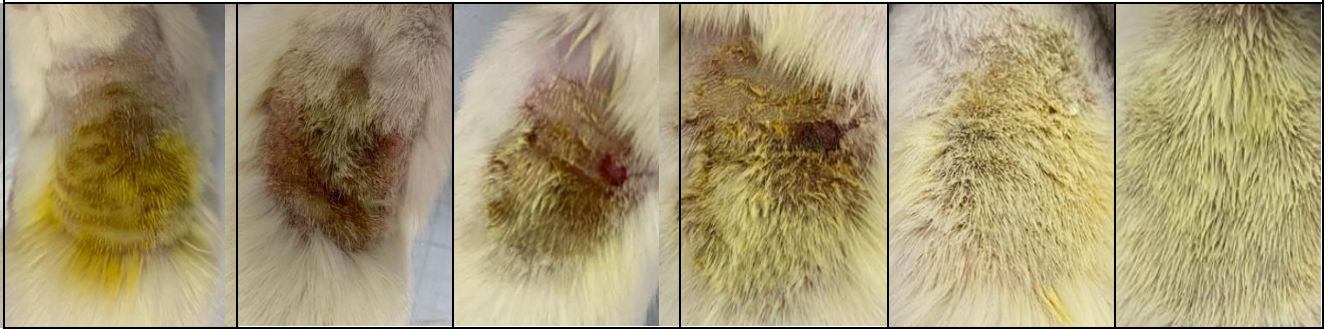
Группа	Время эксперимента, сутки				
	3	10	17	24	29
Аллил					
Аллил					
Аллил-2					
Аллил-2					
Аллил-2					
Цинка сульфат					
Цинка сульфат					
Цинка сульфат					
Цинка сульфат					

Группа	Время эксперимента, сутки				
	3	10	17	24	29
Цинка сульфат					
Цинка сульфат					
Метилурацил®					
Метилурацил®					
Метилурацил®					
Метилурацил®					
Метилурацил®					
Метилурацил®					

**ПРИЛОЖЕНИЕ Б. Состояние кожного покрова у крыс после однократных аппликаций
2,4-ДНХБ в течение 4 суток**



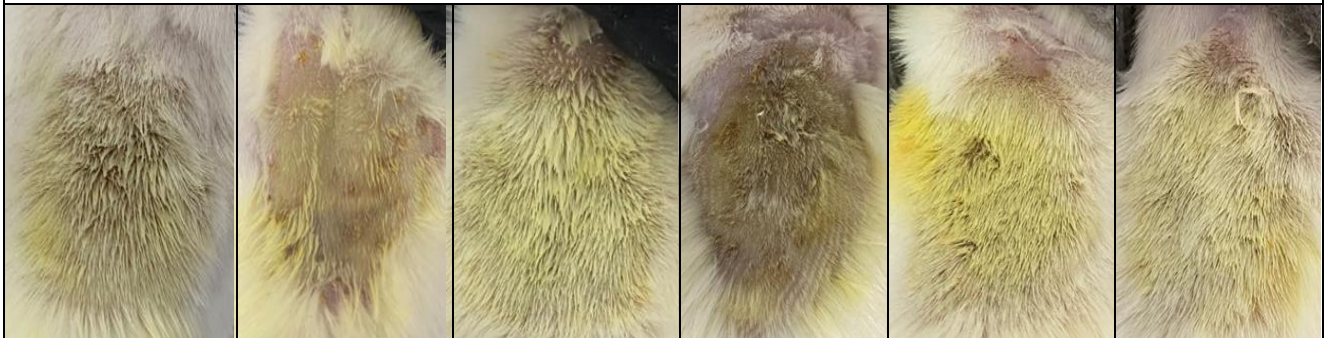
Аллил-2



Аллим-2



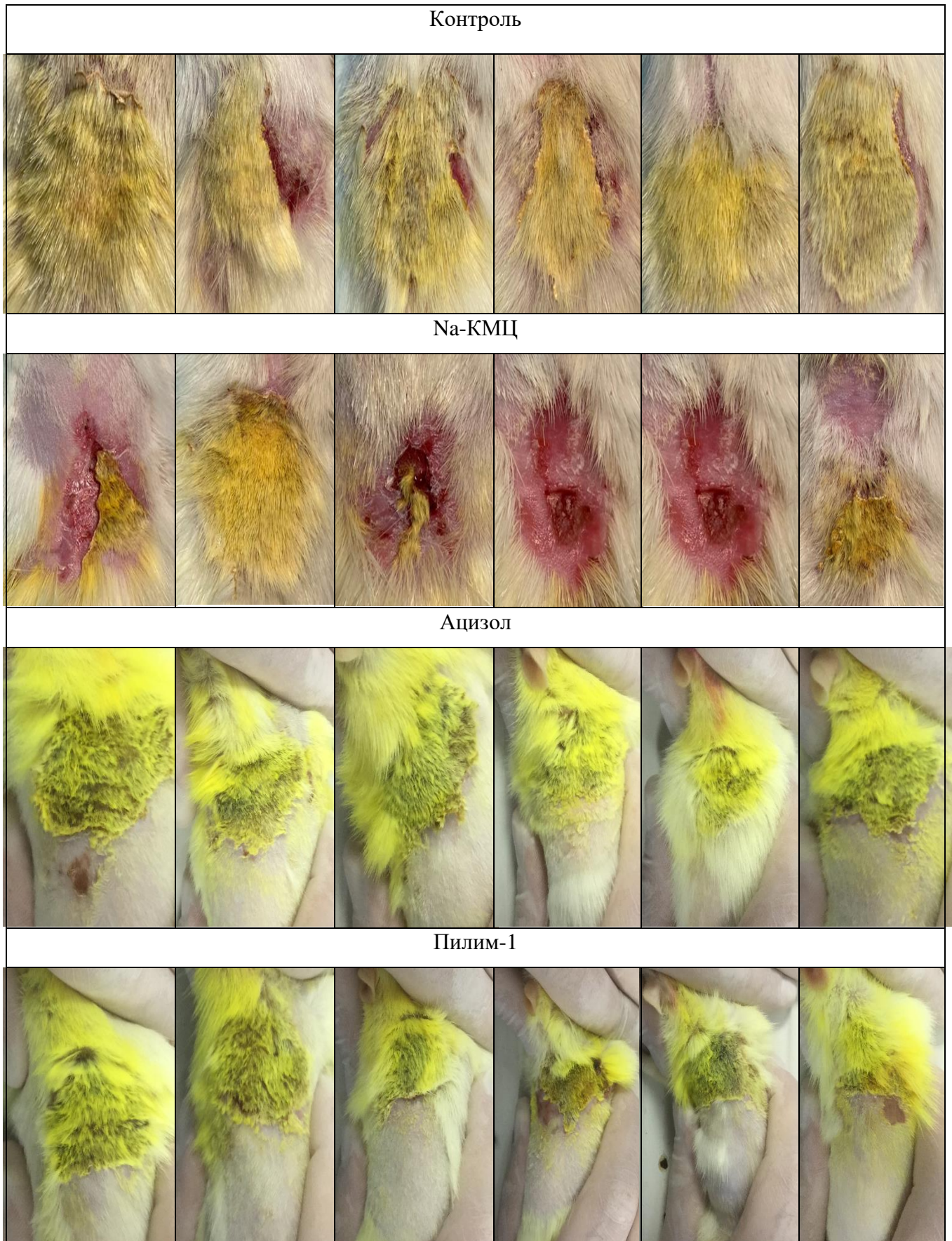
Пропаргил-2



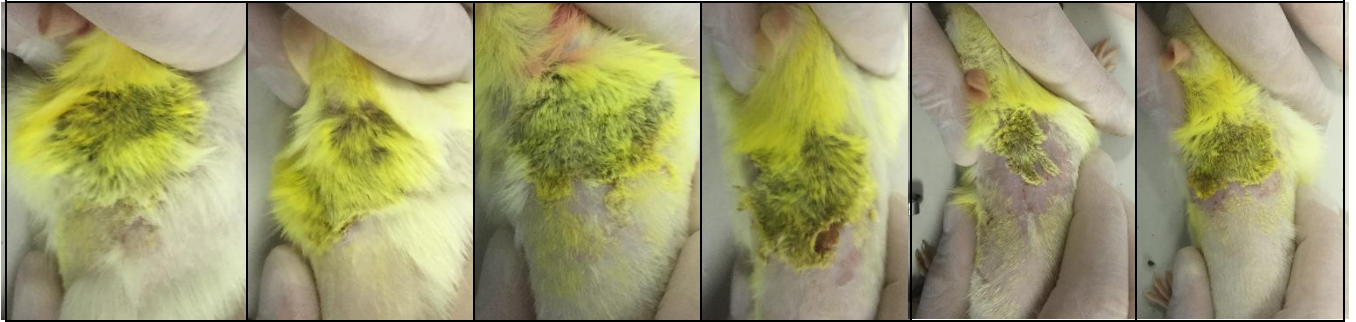
Акридерм®



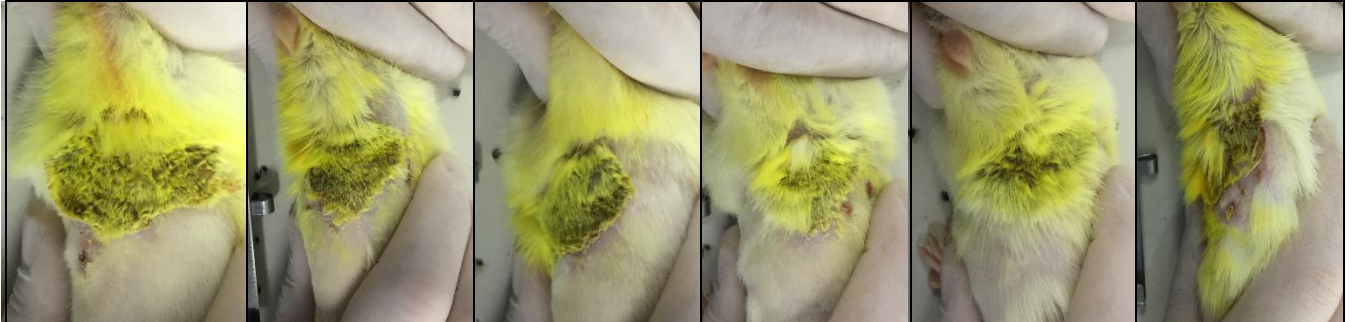
**ПРИЛОЖЕНИЕ В. Фоторяд, демонстрирующий состояние кожного покрова у крыс на 10
сутки после моделирования КД**



Аллил



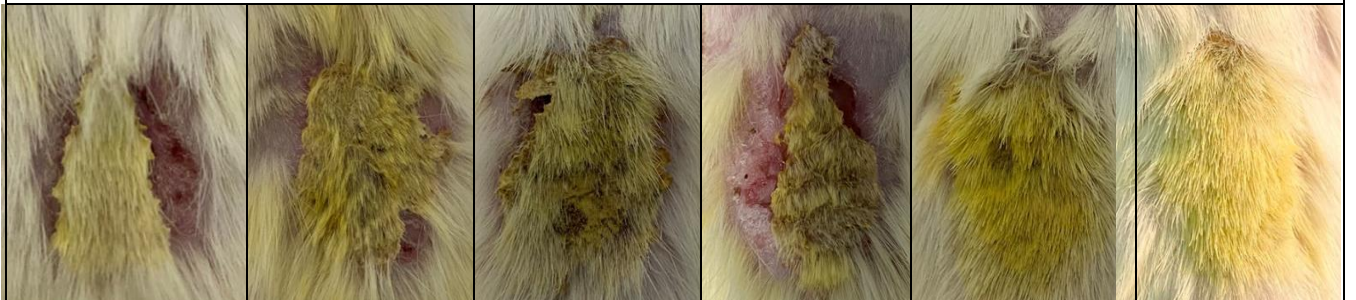
Аллил-2



Аллим-2



Пропаргил-2



Акридерм®

