

Вміст цитокінів у сироватці крові щурів з гнійно-некротичними ранами після використання композиції на основі протеолітичних ферментів з антарктичних гідробіонтів

Н.С. Нікітіна¹, Л.І. Степанова¹, Н.Г. Ракша¹, Т.І. Галенова¹, Т.Б. Вовк¹,
В.М. Маланчук², Т.В. Берегова¹

¹ІНЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка;

²ДУ Національний антарктичний науковий центр, Міністерство освіти і науки України;
e-mail: nataliianikitina@knu.ua

*Протеолітичні ферменти з холодоадаптованих антарктичних гідробіонтів (*Strechinus neumayeri* та *Odontaster validus*) є перспективною основою для створення нових препаратів, що ефективно лікують гнійно-некротичні рани, оскільки вони здатні високоактивно руйнувати некротичні тканини інфікованих ран. Метою нашої роботи було оцінити вплив композиції на основі цих ферментів на динаміку загоєння та вміст цитокінів у сироватці крові 50 щурів із гнійно-некротичними ранами. Рани щурів дослідної групи обробляли гелевою композицією з очищеними протеолітичними ферментами антарктичних гідробіонтів. Визначали швидкість загоєння гнійно-некротичної рани шкіри щурів для оцінки динаміки процесу. Вміст про- та протизапальних цитокінів у сироватці крові досліджували методом імуноферментного аналізу на різних етапах загоєння (3, 6, 9, 14-та доба та повна епітелізація). Застосування композиції прискорило загоєння: повна епітелізація настала на 27-му добу щодо 30 діб у контролі. Швидкість загоєння на 4–9 добу була у 8–13 разів вищою у дослідній групі. На 3-тю добу зафіксовано імуномодулюючий ефект: знизився вміст інтерлейкінів (ІЛ)-12, -6, фактора некрозу пухлин α та інтерферона- γ . У фазі проліферації підвищувався вміст ІЛ-8 та ІЛ-4, що свідчить про стимуляцію регенерації. Композиція на основі протеолітичних ферментів антарктичних гідробіонтів забезпечує прискорене загоєння гнійно-некротичних ран внаслідок ефективного очищення рани та нормалізації цитокінового балансу. Це підтверджує значний біотехнологічний потенціал таких ферментів для нових протизапальних та ранозагоювальних препаратів.*

Ключові слова: гнійно-некротична рана; цитокіни; протеолітичні фермент; морські гідробіонти.

ВСТУП

Гнійно-некротичні рани залишаються актуальною та складною проблемою сучасної медицини та фармакології, спричиняючи значні економічні витрати та вражаючи велику частину населення [1, 2].

Повномасштабна військова агресія проти України значно збільшила кількість поранених із глибокими пошкодженнями тканин, інфекційними ускладненнями та гнійно-некротичними процесами. Ця ситуація вимагає

невідкладного впровадження ефективних терапевтичних стратегій для прискорення регенерації та зниження ризику ускладнень. Хронічні рани, ускладнені такими факторами, як похилий вік, діабет чи системні захворювання, суттєво погіршують якість життя пацієнтів у фізичній та психосоціальній сферах [2, 3]. Основною перешкодою до загоєння є наявність некротичної тканини, яка перешкоджає регенерації та сприяє розвитку інфекції. Хоча хірургічне видалення

некрозу є сучасною клінічною нормою, його інвазивність може сповільнювати одужання. Тому існує потреба у м'якшому, нехірургічному методі очищення рани [4, 5]. Успішне загоєння залежить від підтримки оптимальних умов мікросередовища (належний рівень вологості, рН-баланс, вміст кисню) [6]. Традиційні методи, такі як марлеві пов'язки, часто висушують рану та викликають біль при їхньому знятті [7]. Альтернативою є ферментативне очищення – застосування протеолітичних ферментних препаратів для видалення некротичних тканин [8]. Особливий науковий інтерес являють собою протеолітичні ферменти, отримані з гідробіонтів (морське біорізноманіття), що є перспективним джерелом природних антиоксидантів та біоактивних пептидів. Ферменти, адаптовані до холоду й отримані з організмів, що мешкають в екстремальних умовах (наприклад, Антарктида), мають високу каталітичну ефективність при низьких температурах, зберігаючи при цьому активність при фізіологічній температурі (37°C). Це робить їх ідеальними для біомедичного застосування. Завдяки наявності різних класів протеаз (металозалежні, серинові) вони ефективно очищають рану від різних білкових забруднень. Важливо, що ці ферменти часто виявляють оптимальну активність при слаболужному рН (8,0–9,0), що збігається з показниками інфікованих та хронічних ран, забезпечуючи їхню ефективність на початкових етапах лікування [9].

Контроль тяжковиліковних запальних процесів, зокрема гнійно-некротичних уражень, є важливою проблемою сучасної медицини. Ця складність часто пов'язана з наявністю бактеріальних біоплівки – структур, які формуються на поверхні та всередині ран і постійно провокують імунну відповідь. Активуючи нейтрофіли та прозапальні макрофаги, вони спричиняють небезпечне накопичення запальних цитокінів [10]. Обмеженість класичних джерел ферментів зумовлює актуальність дослідження нових

природних біологічно активних компонентів. Тому особливу увагу привертають ферменти, виділені з водних організмів. Вони становлять перспективну основу для розробки сучасних дерматотропних препаратів із комплексною дією.

Метою нашого дослідження було оцінити вміст цитокінів у сироватці крові щурів з гнійно-некротичними ранами при застосуванні композиції на основі ферментів, очищених з гідробіонтів – морського їжака *Sterechinus neumayeri* та морської зірки *Odontaster validus*.

МЕТОДИКА

Дослідження проведено на 55 білих нелінійних щурах-самцях масою 200–250 г. Маніпуляції з тваринами проводили згідно з Європейською конвенцією про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей та чинним законодавством і нормативно-правовими актами про поводження та експериментальні дослідження з лабораторними тваринами (Страсбург, 1986; Київ, 2001). Проведення експериментів було схвалено Комітетом з біоетики наукових досліджень Київського національного університету імені Тараса Шевченка (протокол № 4 від 30 липня 2024 р.). Щурів утримували у віварії Навчально-наукового центру «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка за стандартних умов температурного режиму (21°C), освітлення (12/12 год), вологості та раціону харчування (повноцінний корм для лабораторних тварин К –12-4, «Різан-1», Україна), згідно зі «Стандартними правилами упорядкування, устаткування та утримання експериментальних біологічних клінік (віваріїв)». Усі больові маніпуляції проводили з використанням тілетаміну гідрохлориду («Золетил 100», «Virbac», Франція) у дозі 15 мг/кг (внутрішньоочеревинно) та ксилазину гідрохлориду («Ксила», «Interchemie», Нідерланди) у дозі 20 мг/кг (внутрішньоочеревинно).

но). Тварини перебували в індивідуальних клітках упродовж всього експерименту.

Щурів поділили на 3 групи. До 1-ї групи ввійшли здорові тварини (інтактні); до 2-ї – щури з гнійно-некротичними ранами (контроль); до 3-ї – з гнійно-некротичними ранами, які обробляли композицією на основі ферментів з гідробіонтів (дослід). Гнійно-некротичні рани моделювали підшкірним введенням 0,1 мл (10%) хлориду кальцію (CaCl_2). Звертали увагу на стандартизованість одержуваних ран, розміри яких не повинні були перевищувати 400 мм^2 . На 4-5-й день здійснювали некротомію уражених ділянок [11]. Для приготування композиції вико використовували фракції протеолітичних ферментів, очищені з гідробіонтів морського їжака *Sterechinus neumayeri* та морської зірки *Odontaster validus*. Для зручності нанесення, композицію готували у вигляді гелю, беручи за основу 0,6%-й карбопол («Carbopol 980»). Експеримент продовжували до повного загоєння ран, а саме до їх епітелізації. Тварин виводили з експерименту дислокацією шийного відділу хребта на 3, 6, 9, 14-ту добу експерименту та після повної епітелізації рани ($n = 5$). Для подальших досліджень використовували сироватку крові, яку отримували з цільної крові без антикоагулянта. Кров залишали при $+37^\circ\text{C}$ на 30 хв, потім чистою сухою скляною паличкою обережно відділяли згусток від стінок пробірки для пришвидшення отримання сироватки і центрифугували протягом 15 хв за 2500g . Зразки зберігали при -20°C до моменту використання.

Для оцінки динаміки гоєння рани фотографували впродовж експерименту. Для визначення площі ранової поверхні (S) фотографії переносили на комп'ютер, калібрували та вимірювали площу ранового пошкодження за допомогою програми ImageJ (НИН, «США»).

Швидкість загоєння ран вираховували за формолою:

$$V_{\text{заг.}} = (S_{\text{вихід.}} - S_{\text{досл.}}) / n,$$

де $S_{\text{вихід.}}$ – початкова площа рани, $S_{\text{досл.}}$ – пло-

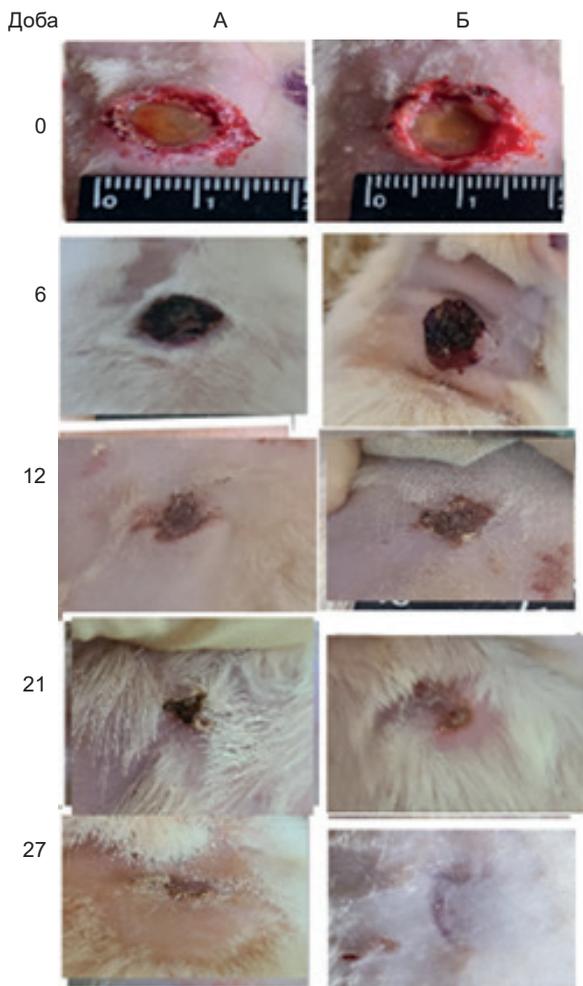
ща рани на відповідну добу експерименту, n – кількість днів експерименту.

Вміст цитокінів (інтерферон- γ , фактор некрозу пухлин α , інтерлейкіни (ІЛ)-4, 6, 8, 12, 17, 18R β) визначали методом непрямого імуноферментного аналізу (ELISA) за стандартним протоколом [12]. У лунки мікропланшета вносили по 100 мкл сироватки крові (попередньо розведеної 1:100 у 0,05 М тріс- HCl -буфері з 130 ммоль/л NaCl ; pH 7,4) та інкубували з відповідними специфічними первинними антитілами («Santa Cruz», США). Після цього вносили вторинні антитіла, кон'юговані з пероксидазою хрому («Sigma-Aldrich», США). Для появи кольорової реакції використовували о-фенілдіамін з додаванням H_2O_2 ; реакцію розвивали 7 хв у темряві при кімнатній температурі та зупиняли додаванням 1,5 М H_2SO_4 . Оптичну густину визначали при 492 нм. Результати виражали в умовних одиницях на 1 мг білка.

Статистичний аналіз результатів проводили методами варіаційної статистики в програмі Statistica 8.0. Для перевірки на нормальність використовували W тест Шапіро-Уїлка. Оскільки наші вибірки мали нормальний розподіл, для оцінки значущих відмінностей застосовували критерій t Стьюдента. Результати представлено у вигляді $M \pm SD$. Відмінності між групами вважались вірогідними при $P \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Як видно з рисунка, після некротомії рани є набряклими, почервонілими та з ознаками некрозу. На 6–12-ту добу відбувається формування нової тканини та зменшується набряк, а на 21-шу добу після застосування композиції рана зменшилась в розмірі, з'являється тонка плівка епітелію, тоді як в групі тварин без нанесення гелю з ферментами, ще спостерігається грануляційна тканина. На 27-му добу використання композиції на основі ферментів гнійно-некротична рана повністю загоїлася з формуванням невеликого рубця.



Гнійно-некротичні рани шкіри щурів (а), гнійно-некротичні рани шкіри при застосуванні композиції на основі ферментів (б)

Також нами було визначено динаміку загоєння гнійно-некротичної рани шкіри щурів на різних етапах ранового процесу (табл. 1). На 4–6-ту та 7–9-ту добу дослідження рани після повсякденного нанесення композиції на основі ферментів швидкість загоєння була в 13,47 ($P \leq 0,001$) та 8,29 ($P \leq 0,01$) разів більшою, ніж у групі без нанесення композиції. На 19–21-ту добу швидкість загоєння в дослідній групі тварин була більшою на 57,13% ($P \leq 0,01$) з повним загоєнням на 27-му добу. У групі тварин з гнійно-некротичними ранами повне загоєння було лише на 30-ту добу експерименту.

Таким чином, гнійно-некротичні рани, на які наносили композицію на основі ферментів, найкраще загоювалися на початку фази проліферації та ремоделювання. Фаза проліферації, характеризується збільшенням фібробластів, котрі сприяють міграції імунних клітин до місця запалення, та колагену, що призводить до утворення грануляційної тканини [13]. У фазі ремоделювання позаклітинний матрикс реструктурується, набуваючи вигляду здорової тканини, що спричинює утворення рубця. Цей процес регулюється переважно міофібробластами та епітеліальними клітинами [14, 15]. Пошкодження цілісності шкірних покривів ініціює каскад репаративних процесів, що регулюються взаємодією різних типів

Таблиця 1. Швидкість загоєння (%) гнійно-некротичної рани шкіри щурів-самців на різних етапах ранового процесу ($M \pm SD$, $n = 5$)

Доба дослідження	Гнійно-некротичні рани	Гнійно-некротичні рани та застосування композиції на основі ферментів
0–3	6,96 ± 0,44	3,76 ± 0,12*
4–6	0,63 ± 0,01	8,49 ± 0,80***
7–9	1,24 ± 0,54	10,28 ± 1,89**
10–14	10,22 ± 1,05	11,90 ± 1,12
15–18	11,64 ± 1,1	18,91 ± 2,21*
19–21	13,67 ± 1,73	21,48 ± 3,17**
22–27	16,37 ± 2,1	Повне загоєння
27–30	Повне загоєння	

* $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$ порівняно зі значенням у групі тварин з гнійно-некротичними ранами.

клітин, факторів росту та біоактивних молекул. Прозапальні цитокини забезпечують хемотаксис ефекторних клітин, зокрема поліморфноядерних лейкоцитів, моноцитів та макрофагів, до місця ушкодження. Після активації ці клітини посилюють секрецію медіаторів запалення, що створює позитивний зворотний зв'язок та підтримує необхідну інтенсивність запальної відповіді [16]. Тож наступним етапом наших досліджень було виміряти вміст цитокінів у сироватці крові щурів дослідних груп. Рани, зокрема гнійно-некротичного типу, викликають запальну реакцію, яка супроводжується вивільненням різних цитокінів, а саме ІЛ-1 β , ІЛ-6, ІЛ-8, ІЛ-12, ІЛ-17, фактор некрозу пухлин α або інтерферон- γ , а також протизапальні цитокини ІЛ-4, ІЛ-10 [17]. Запалення контролюється балансом між цими про- та протизапальними медіаторами; одночасне вироблення протизапальних цитокінів може протидіяти ефектам прозапальних цитокінів і модифікувати інтенсивність запальної реакції. Неконтрольоване вивільнення про- та протизапальних цитокінів сприяє імунологічній дисфункції, що призводить до погіршення стану [17]. Якщо системний імунітет не в змозі відновити цілісність організму, порушення регуляції імунної системи може призвести до системного запалення та імунного паралічу [18].

Імунні фактори, зокрема цитокини, є ключовими регуляторами гострого загоєння ран, але їхня дисрегуляція спричинює хронічне запалення та уповільнення відновлення тканин. Роль цитокінів залежить від фази загоєння та середовища рани (гостра чи хронічна) [19]. Фактор некрозу пухлин α є потужним прозапальним медіатором, який відіграє критичну роль на початкових етапах запалення, але стає патологічним фактором при хронічних ранах. Вивільняється тромбоцитами під час дегрануляції разом з іншими прозапальними факторами (ІЛ-1 α , ІЛ-1 β , ІЛ-6), сприяючи мобілізації системи комплементу. Секретується кератиноцитами,

посилюючи запальну відповідь. Зокрема, вивільнення фактора некрозу пухлин α тучними клітинами індукує вазодилатацію для покращення рекрутингу імунних клітин [20].

Вміст фактора некрозу пухлин α у групи щурів з гнійно-некротичними ранами, яким наносили композицію на основі ферментів, був меншим на 41,43% ($P \leq 0,05$) на 3-тю добу та більшим на 31,37% ($P \leq 0,05$) порівняно з групою без композиції на 14-ту добу. Також він був на 38,63% ($P \leq 0,05$) меншим порівняно з інтактними тваринами на 3-тю добу експерименту (табл. 2). У щурів з гнійно-некротичними ранами вміст інтерферону- γ був на 79,44% вищим, ніж в інтактних тварин ($P \leq 0,05$) на 3-тю добу (див. табл. 2). Вміст інтерферону- γ у групи щурів з гнійно-некротичними ранами, яким наносили композицію на основі ферментів, був також меншим на 46,52% ($P \leq 0,05$) 3-тю добу та більшим на 56,72% ($P \leq 0,05$) порівняно з групою без композиції на 14-ту добу. Фактор некрозу пухлин α та інтерферон- γ часто діють синергічно активуючи макрофаги, запускаючи каскад реакцій, спрямованих на знищення патогенів і очищення рани.

У гострій фазі рани цитокини, такі як фактор некрозу пухлин α , ІЛ-1 β , ІЛ-6 та ІЛ-8, ІЛ-12, ІЛ-17 забезпечують швидку та ефективну запальну відповідь, необхідну для очищення рани від патогенів. ІЛ-18R β є субодиницею рецепторного комплексу, який зв'язує ІЛ-18. Останній так само є потужним прозапальним цитокином, структурно подібним до ІЛ-1. Вміст ІЛ-18R β був достовірно більшим, починаючи з 6-ї доби, в обох досліджуваних групах. ІЛ-18 діє синергічно з ІЛ-12, посилюючи відповідь Th1-клітин і стимулюючи вивільнення інтерферону- γ Т- та НК-клітинами. Також сприяє вивільненню фактора некрозу пухлин α та хемокінів, підтримуючи запальну фазу [19].

Вміст ІЛ-6 був більшим на 94,83% ($P \leq 0,05$) на 3-тю добу у щурів з гнійно-некротичними ранами, а ІЛ-12 був підвищеним упродовж усього експерименту порівняно з групою

Таблиця 2. Вміст цитокінів у сироватці крові щурів з гнійно-некротичними ранами шкіри (M±SD, n = 5)

Показник, ум.од./мг білка	3-тя доба			6-га доба			9-га доба			14-та доба			Повне загоєння	
	Контроль (інтактні тварини)	Гнійно- некро- тичні рани шкіри	Гнійно- некротичні рани шкіри та введення композиції на основі ферментів											
Інтерферон-γ	6,18±1,12	11,09±2,06 ^x	5,93±1,01*	4,46±1,13	5,66±1,41	5,15±2,30	6,04±1,94	4,83±1,52	7,57±1,12*	6,35±1,95	6,12±2,92			
Фактор некрозу пухлин α	7,74±0,46	8,11±1,00	4,75±0,59*, ^x	5,26±1,43 ^x	6,06±0,82	5,31±1,30	6,36±0,73	6,47±1,59	8,50±1,34*	6,30±1,41	7,74±0,46			
Інтерлейкіни -4	10,05±1,65	11,66±2,29	9,00±1,77	9,07±2,55	10,98±4,06	8,86±3,55	10,92±1,75	8,95±1,05	11,48±1,38*	7,40±1,95 ^x	9,75±2,12			
-6	5,62±2,11	10,95±1,37 ^x	5,93±1,21*	5,32±1,73	5,68±1,18	5,37±1,89	5,74±1,73	6,12±2,23	7,72±1,85	7,33±1,85	5,20±2,00			
-8	9,37±2,12	6,56±2,04 ^x	6,73±1,50 [#]	8,03±2,15	9,14±1,82	9,82±2,88	16,61±2,85 ^{x,*}	8,34±1,15	11,82±1,1*	9,22±1,43	10,17±2,82			
-12	0,64±0,18	1,80±0,71 ^x	0,39±0,24 ^{**}	0,82±0,41	0,92±0,31	1,22±0,29 ^x	2,03±0,56 ^x	1,13±0,58	1,48±0,95 ^x	1,31±0,88 ^x	0,88±0,22			
-17	10,05±1,67	7,97±1,79 ^x	6,26±1,80 ^x	7,06±2,15	6,96±1,04	7,03±2,91	9,92±2,01	6,73±2,61	7,99±0,54	5,72±1,19 ^x	8,30±1,85			
-18Rβ	4,33±0,92	5,92±1,98	5,13±1,32	5,94±1,88 ^x	6,77±1,13 ^x	7,29±2,20 ^x	7,57±2,13 ^x	6,42±2,54 ^x	8,87±3,04 ^x	5,97±1,56 ^x	6,46±1,44 ^x			

^xR ≤ 0,05 порівняно з інтактними; *R ≤ 0,05, **R ≤ 0,01 порівняно зі значеннями у групі тварин з гнійно-некротичними ранами.

інтактних щурів. Вміст ІЛ-6 та ІЛ-12 був меншим 45,84% ($P \leq 0,05$) та 5 разів ($P \leq 0,01$) на 3-тю добу порівняно з групою тварин, яким на рани наносили дослідну композицію. Натомість вміст ІЛ-8 на 9-ту та 14-ту добу експерименту був більшим на 69,14% та 41,72% ($P \leq 0,05$) відповідно (див. табл. 2). На 3-тю добу експерименту вміст ІЛ-8 зменшувався на 28,17% ($P \leq 0,05$) в обох досліджуваних групах. На 3-тю добу експерименту вміст ІЛ-17 був меншим на 20,69% ($P \leq 0,05$) в групі тварин з гнійно-некротичними ранами, яким наносили композицію, порівняно з інтактними щурами. Також він був меншим на 37,71% ($P \leq 0,05$) та 43,08% ($P \leq 0,05$) в групі тварин з гнійно-некротичними ранами на 3-тю добу та день повного загоєння відповідно.

Протизапальні цитокіни (ІЛ-4, ІЛ-5, ІЛ-9, ІЛ-10 та ІЛ-13) викликають сильні гуморальні реакції беруть участь у захисті від позаклітинних паразитів [21]. Секреція ІЛ-4 сприяє посиленій проліферації фібробластів, відновленню тканин, ангиогенезу та утворенню рубця [22, 23]. У нашому дослідженні він збільшувався, починаючи з 6-ї доби експерименту зі зростанням на 28,26% ($P \leq 0,05$) на 14-ту добу у щурів з ранами, яким наносили композицію на основі протеолітичних ферментів, отриманих з гідробіонтів морського їжака *Sterechinus neumayeri* та морської зірки *Odontaster validus*.

Загоєння ран є високорегульованим процесом, що включає фазу запалення, яка контролюється балансом та протизапальних цитокінів. При гнійно-некротичному ураженні шкіри збільшується продукція прозапальних цитокінів, що призводить до тривалого, неконтрольованого запалення, руйнування позаклітинного матриксу і, як наслідок, до уповільнення загоєння [19]. Використання композиції на основі протеолітичних ферментів, отриманих з антарктичних гідробіонтів, імовірно, сприяє видаленню некротичних мас та фібрину, які є середовищем для бактерій та стимуляторами

хронічного запалення. Прискорене очищення рани зменшує стимуляцію імунних клітин, що, також, знижує системну продукцію ІЛ-6, ІЛ-8, ІЛ-12 та TNF- α . Це сприяє швидшому переходу від запальної до проліферативної фази. Усунення бар'єра з некротичних тканин дає змогу протизапальним цитокінам (ІЛ-4) ефективніше діяти в рановому ложі, що є важливим для проліферації фібробластів, ангиогенезу та епітелізації. Застосування композицій на основі протеолітичних ферментів антарктичних гідробіонтів (*Sterechinus neumayeri* та *Odontaster validus*) у щурів із гнійно-некротичними ранами прискорює швидкість загоєння та повну епітелізацію. Це прискорення загоєння є прямим наслідком успішного очищення рани та нормалізації цитокінового балансу.

ВИСНОВКИ

1. Застосування композиції на основі протеолітичних ферментів, очищених з антарктичних гідробіонтів (*Sterechinus neumayeri* та *Odontaster validus*), прискорює швидкість загоєння гнійно-некротичних ран шкіри щурів, особливо на початку фази проліферації. Повна епітелізація в дослідній групі тварин відбулася на 3 доби раніше, ніж у тварин, яким не наносили композицію.

2. Композиція ефективно модулює запалення на ранніх етапах (3-тя доба), системно знижуючи вміст прозапальних цитокінів, що прискорює перехід до проліферативної фази. У фазу ремоделювання (14-та доба) зростання вмісту ІЛ-8 та фактора некрозу пухлин α свідчить про успішний запуск регенерації та формування грануляційної тканини. Збільшення вмісту ІЛ-4 підтверджує посилену проліферацію фібробластів та прискорення епітелізації, нормалізуючи цитокіновий баланс.

3. Протеолітичні ферменти з антарктичних гідробіонтів є вискоелективним біотехнологічним засобом для лікування гнійно-некротичних ран. Вони мають

значний потенціал для створення нового покоління дерматотропних препаратів, що є критично важливим в умовах збільшення кількості поранених із глибокими гнійно-некротичними ускладненнями.

The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of co-authors of the article.

**N. Nikitina¹, L. Stepanova¹, N. Raksha¹,
T. Galenova¹, T. Vovk¹, V. Malanchuk², T. Beregova¹**

CYTOKINE CONTENT IN THE BLOOD SERUM OF RATS WITH PURULENT-NECROTIC WOUNDS AFTER USE OF A COMPOSITION BASED ON PROTEOLYTIC ENZYMES FROM ANTARCTIC HYDROBIONTS

¹ESC «Institute of Biology and Medicine» Taras Shevchenko National University of Kyiv;

²State Institution National Antarctic Scientific Center, Ministry of Education and Science of Ukraine;
e-mail: nataliianikitina@knu.ua

Proteolytic enzymes from cold-adapted Antarctic hydrobionts (*Stereochinus neumayeri* and *Odontaster validus*) are a promising basis for the creation of new drugs that effectively treat purulent-necrotic wounds, as they are capable of highly active destruction of necrotic tissues of infected wounds. Our work aimed to evaluate the effect of a composition based on these enzymes on the healing dynamics and cytokine content in the blood serum of 50 rats with purulent-necrotic wounds. The wounds of the rats in the experimental group were treated with a gel composition containing purified proteolytic enzymes from Antarctic hydrobionts. The healing rate of purulent-necrotic skin wounds in rats was determined to assess the dynamics of healing. The content of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in blood serum was determined by enzyme-linked immunosorbent assay at different stages of healing (3, 6, 9, 14 days and complete epithelialization). Using the composition accelerated the healing process, with complete epithelialization occurring on the 27th day, compared to 30 days in the control group. The healing rate on days 4-9 was 8-13 times higher in the experimental group. On the 3rd day, an immunomodulatory effect was recorded: the levels of interleukins 12, 6, tumor necrosis factor α , and interferon γ decreased. In the proliferation phase, an increase in IL-8 and IL-4 was observed, indicating stimulation of regeneration.

The composition based on proteolytic enzymes of Antarctic hydrobionts accelerated healing of purulent-necrotic wounds due to effective wound cleansing and normalization of cytokine balance. This confirms the significant biotechnological potential of these enzymes for new anti-inflammatory and wound-healing drugs.

Key words: purulent-necrotic wound; cytokine; proteolytic enzymes; marine hydrobionts.

REFERENCES

1. Sen C.K. Human wounds and its burden: An updated compendium of estimates. *Adv Wound Care*. 2019; 8(2):39-48.
2. Seth D, Cheldize K, Brown D, Freeman EF. Global burden of skin disease: Inequities and innovations. *Curr Dermatol Rep*. 2017, 6(3):204-10. doi: 10.1007/s13671-017-0192-7.
3. Zhao R, Liang H, Clarke E, Jackson C, Xue M. Inflammation in chronic wounds. *Int J Mol Sci*. 2016;17(12):2085. doi:10.3390/ijms17122085.
4. Mathioudaki E., Vitsos A., Rallis M.C. Proteolytic enzymes and wound debridement: a literature review. *Wounds*. 2024;36(11):357-65. doi:10.25270/wnds/23181.
5. Gounden V, Singh M. Hydrogels and wound healing: Current and future prospects. *Gels*. 2024 Jan 5;10(1):43.
6. Fadilah NIM, Phang SJ, Kamaruzaman N, Salleh A, Zawani M, Sanyal A, Maarof M, Fauzi MB. Antioxidant biomaterials in cutaneous wound healing and tissue regeneration: A critical review. *Antioxidants*. 2023 Mar 23;12(4):787.
7. Rezvani Ghomi E, Khalili S, Nouri Khorasani S, Esmaeely Neisiany R, Ramakrishna S. Wound dressings: Current advances and future directions. *J Appl Polym Sci*. 2019;136(30):47738.
8. Patry J, Blanchette V. Enzymatic debridement with collagenase in wounds and ulcers: a systematic review and meta-analysis. *Int Wound J*. 2017; 14(6):1055-65.
9. Raksha N, Halenova T, Vovk T, Koval T, Nikitina N, Stepanova L, Beregova T, Savchuk O. Collagenolytic enzymes from Antarctic hydrobionts: a promising biotechnological approach for accelerating purulent-necrotic wound healing. *Ukr Antarctic J*. 2025; 23(1(30)):51-63. <https://doi.org/10.33275/1727-7485.1.2025.743>.
10. Wu YK, Cheng NC, Cheng CM. Biofilms in chronic wounds: Pathogenesis and diagnosis. *Trends Biotechnol*. 2019;37(5):505-17. doi:10.1016/j.tibtech.2018.10.011.
11. Bilyayeva O, Neshta VV, Golub A, Sams-Dodd F. Effects of Sertasil on wound healing in the rat. *J Wound Care*. 2014 Aug;23(8):410-6. doi:10.12968/jowc.2014.23.8.410.
12. Crowther JR. *The ELISA guidebook*. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc., 2001.
13. Harries RL, Bosanquet DC, Harding KG. Wound bed preparation: TIME for an update. *Int Wound J*. 2016;13 Suppl 3:8-14.

14. Zainuddin ANZ, Mustakim NN, Rosemanzailani FA, Fadilah NIM, Maarof M, Fauzi MB. A comprehensive review of honey-containing hydrogel for wound healing applications. *Gels*. 2025;11(3):194. <https://doi.org/10.3390/gels11030194>.
15. Singer AJ. Healing mechanisms in cutaneous wounds: Tipping the balance. *Tissue Eng Part B Rev*. 2022 Oct;28(5):1151-67. doi:10.1089/ten.TEB.2021.0114.
16. Zgheib C, Xu J, Liechty KW. Targeting inflammatory cytokines and extracellular matrix composition to promote wound regeneration. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2014 Apr 1;3(4):344-55. doi:10.1089/wound.2013.0456.
17. Kunz M, Ibrahim SM. Cytokines and cytokine profiles in human autoimmune diseases and animal models of autoimmunity. *Mediator Inflamm*. 2009:979258.
18. Kim HS, Kim JH, Yim H, Kim D. Changes in the levels of interleukins 6, 8, and 10, tumor necrosis factor alpha, and granulocyte-colony stimulating factor in Korean burn patients: relation to burn size and postburn time. *Ann Lab Med*. 2012 Sep;32(5):339-44. doi:10.3343/alm.2012.32.5.339.
19. Raziyeva K, Kim Y, Zharkinbekov Z, Kassymbek K, Jimi S, Saparov A. Immunology of acute and chronic wound healing. *Biomolecules*. 2021 May 8;11(5):700. doi:10.3390/biom11050700.
20. Jang DI, Lee AH, Shin HY, Song HR, Park JH, Kang TB, Lee SR, Yang SH. The role of tumor necrosis factor alpha (TNF- α) in autoimmune disease and current TNF- α inhibitors in therapeutics. *Int J Mol Sci*. 2021; 22(5):2719. doi: 10.3390/ijms22052719
21. Gieseck RL, Wilson MS, Wynn TA. Type 2 immunity in tissue repair and fibrosis. *Nat Rev Immunol* 2018; 18(1):62-76.
22. Komi DEA, Khomtchouk K, Santa Maria PL. A review of the contribution of mast cells in wound healing: Involved molecular and cellular mechanisms. *Clin Rev Allerg Immun*. 2020;58(2):298-312. doi:10.1007/s12016-019-08729-w.
23. Zimmermann C, Troeltzsch D, Giménez-Rivera VA, Galli SJ, Metz M, Maurer M, Siebenhaar F. Mast cells are critical for controlling the bacterial burden and the healing of infected wounds. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2019;116(41):20500-4. doi:10.1073/pnas.1908816116.

*Матеріал надійшов
до редакції 13.11.2025*