

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ О.О. БОГОМОЛЬЦЯ

Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису

ГОРБАЧ АННА ОЛЕКСАНДРІВНА

УДК 615.454.1.014:665.7.033.23:616.5-085

ДИСЕРТАЦІЯ

**ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ДОЦІЛЬНОСТІ РОЗРОБКИ
НОВОГО КРЕМУ НА ОСНОВІ ОЧИЩЕНОГО НАФТАЛАНОВОГО
МАСЛА ДЛЯ ЛІКУВАННЯ ДЕРМАТОЛОГІЧНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ**

226 «Фармація, промислова фармація»

22 «Охорона здоров'я»

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

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

_____ А.О. Горбач
(підпис)

Науковий керівник Зайченко Ганна Володимирівна, доктор медичних наук,
професор

Київ – 2025

АНОТАЦІЯ

Горбач А.О. Експериментальне обґрунтування доцільності розробки нового крему на основі очищеного нафталанового масла для лікування дерматологічних захворювань. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 226 «Фармація, промислова фармація» (галузі знань 22 «Охорона здоров'я»). – Національний медичний університет імені О.О. Богомольця МОЗ України, Київ, 2025.

Дисертаційну роботу присвячено експериментальному обґрунтуванню доцільності розробки нових топічних лікарських засобів на основі очищеного нафталанового масла для лікування дерматологічних захворювань, а саме псоріазу.

Псоріаз – хронічне запальне захворювання шкіри автоімунної природи, на яке страждає від 2 % в азіатських і деяких африканських популяціях і до 11 % в кавказьких і скандинавських популяціях (Rendon et al., 2019, Bu et al., 2022, Damiani et al., 2021, Armstrong et al., 2021, Zhang et al., 2024). Ключовими етіопатогенетичними ланками псоріазу є фактори навколишнього середовища, порушення захисного бар'єра шкіри, дисфункція імунної системи з домінуючою віссю IL-23/Th17. Характерною ознакою псоріазу є тривале запалення, яке призводить до неконтрольованої проліферації кератиноцитів і дисфункціональної диференціації. Основними клінічними проявами захворювання є утворення гіперкератотичних бляшок та лущення шкіри, що супроводжується свербіжем, болем і значним зниженням якості життя пацієнтів. Сучасна терапія псоріазу визначається тяжкістю перебігу захворювання, його клінічними формами та наявністю супутніх патологій. Для пацієнтів із легкими та середньо-тяжкими формами перевага надається топічним засобам, серед яких найбільш поширеними є кортикостероїдні препарати, аналоги вітаміну D, саліцилова кислота та інгібітори кальциневрину. У випадках важкого перебігу застосовуються системні методи лікування, зокрема імунодепресанти (метотрексат, циклоспорин, ретиноїди), а

також біологічні агенти, що блокують ключові прозапальні цитокіни (IFN- α , IFN- β , IL-12, IL-23). Численні терапевтичні підходи – від топічних кортикостероїдів та кератолітиків до системної терапії і біологічних препаратів – часто мають обмеження, пов'язані з розвитком побічних реакцій (локальних та системних), розвитком толерантності та ризиком загострення супутніх патологій (Sandipan et al, 2014, Aayushi et al, 2016, Altenburg et al., 2018, Lockwood et al., 2018). Унаслідок цього формуються нові завдання для фармацевтичної науки: пошук природних сполук та інноваційних допоміжних речовин з мультифакторною дією, які можна оптимально поєднувати з уже відомими активними фармацевтичними інгредієнтами (АФІ).

Незважаючи на суттєвий прогрес у фармакотерапії псоріазу, низка проблем, пов'язаних із розвитком побічних ефектів, виникненням резистентності до існуючих лікарських засобів та довгостроковою безпекою застосування, все ще не вирішена остаточно. Це стимулює пошук та створення нових препаратів із високою ефективністю та сприятливим профілем безпеки, придатних як до монотерапії, так і до застосування в комбінації з іншими фармакотерапевтичними агентами. Одним із перспективних напрямків є дослідження природних сполук, зокрема очищеного нафталанового масла, яке завдяки своїм протизапальним, кератолітичним, регенеративним властивостям виявляє фармакологічний потенціал, і розглядається, як перспективна речовина для включення до складу топічних лікарських засобів для лікування псоріазу (Adigozalova, 2023).

Очищене нафталанове масло (ОНМ) являє собою один із природних продуктів, що традиційно використовувалися у бальнеології та фізіотерапії шкірних захворювань (нафталанські ванни, аплікації, мазі на основі нафталанової нафти) і має переваги перед неочищеним нафталановим маслом (так званим нафталаном), що протягом століття використовувався в традиційній медичній практиці (Vrzogić, 2003, Adigozalova, 2023). Наявні експериментальні дані про його протизапальні, кератолітичні, регенеративні властивості, більш сприятливий профіль безпеки, ніж у неочищеного нафталанового масла. Однак дослідження з безпосереднього включення ОНМ до складу нових топічних лікарських форм із

доведеною фармакологічною ефективністю при псоріазі, практично відсутні. З огляду на це, розробка та вивчення нових топічних лікарських форм з ОНМ набуває наукового та практичного значення. Вищенаведене зумовило актуальність теми дисертаційної роботи, визначило її мету і завдання.

У даній дисертаційній роботі проведено вивчення фармакологічних властивостей і детально обґрунтовано доцільність використання ОНМ як допоміжної речовини у комбінації з іншими фармакотерапевтичними інгредієнтами для лікування псоріазу.

У *першому розділі* дисертаційної роботи наведено аналіз сучасних літературних даних щодо епідеміології псоріазу, його етіопатогенезу, підходів до терапії. Особлива увага приділена сучасним методам лікування, включно з місцевими (кортикостероїди, аналоги вітаміну D, ретиноїди, кератолітики), системними (метотрексат, циклоспорин, інгібітори фосфодіестерази 4 типу, біологічні препарати). Висвітлено механізми, що зумовлюють обмеження у застосуванні існуючих засобів (наприклад, ризик системної токсичності при довготривалому застосуванні кортикостероїдів, розвиток толерантності тощо).

В огляді літератури також наведено обґрунтування доцільності залучення до терапії псоріазу природних речовин з нафти. А саме, ОНМ розглядається як перспективна речовина завдяки його впливу на запальний процес, здатності регулювати проліферацію та диференціювання кератиноцитів, а також підтримувати відновлювальні процеси у шкірі. У результаті критичного аналізу джерел сформульовано гіпотезу, що ОНМ може виконувати роль як допоміжного засобу – підсилювати проникнення АФІ, так і потенційно активного фармацевтичного компонента у складі м'яких лікарських форм місцевої дії для лікування шкірних захворювань, зокрема псоріазу. Це стало підґрунтям для формулювання мети і завдань дослідження.

У *другому розділі* описано матеріали та методи проведення дослідження – об'єкт, предмет, дизайн експериментів та методи, що використовувалися для оцінки протизапальної, аналгетичної, антипсоріатичної, цитотоксичної та місцевоподразнювальної видів дії. Зокрема, застосовано як фармакологічні моделі

in vivo (карагінанове запалення, іміквімод-індуковане псоріазоподібне ураження шкіри у лабораторних тварин), так і сучасні методи клітинних досліджень *in vitro* із залученням спеціальних клітинних ліній (HaCaT/P – кератиноцити з псоріазоподібними змінами). Використаний широкий набір сучасних інструментів для оцінки протизапальних, аналгетичних і антипсоріатичних показників, гістологічного дослідження тканин, а також визначення експресії ключових прозапальних цитокінів (IL-1 β , IL-8).

У *третьому розділі* детально висвітлено результати скринінгового дослідження протизапальної та аналгетичної дії експериментальних тест-зразків (ТЗ) кремів на гідрофільній основі з наступним складом: ТЗ із 10 % вазеліновим маслом; ТЗ із 10 % нафталановою нафтою; ТЗ із 10 % очищеним нафталановим маслом (ОНМ); ТЗ із 15 % очищеним нафталановим маслом (ОНМ). Як препарат порівняння (ПП) в даних експериментальних дослідженнях використовувався крем із 1 % гідрокортизоном ацетатом.

Для моделювання запального процесу використовували класичну модель карагінанового запалення у білих нелінійних щурів обох статей: у плантарний апоневроз задньої (правої) кінцівки лабораторних тварин вводили 0,1 мл 1 % водного розчину карагану. Результати показали, що ТЗ №3 (з 10 % вмістом ОНМ) продемонстрував найвищу протизапальну активність серед усіх досліджуваних зразків, перевищивши ПП у ранній фазі запалення на 2-гу годину (23 % проти $\approx$ 11–12 % у ПП). Проте на 4-ту годину активність ТЗ №3 знизилася до 16 %, що відповідає рівню ПП. Щодо аналгетичної активності, ТЗ №3 (крем з 10 % ОНМ) виявився менш ефективним: у тварин не спостерігалось значущого зменшення больового порогу, а в деяких серіях експериментів навіть відзначалося його зниження.

За результатами цього етапу встановлено, що ОНМ за сукупністю фармакологічних властивостей доцільно використовувати не як активний фармацевтичний інгредієнт, а як допоміжну речовину, можливо у комбінації з АФІ, які мають виражену протизапальну активність.

У четвертому розділі наведено результати поглибленого вивчення ТЗ кремів з ОНМ, як монокомпонентного крему так і в комбінації з дротаверином. Вивчено антипсоріатичну дію ТЗ кремів на моделі експериментального псоріазоподібного ураження шкіри, індукованого іміквімодом у мишей лінії BALB/c, за умов 21-о денного лікування. Для оцінки ефективності використано модифікований індекс PASI (mPASI), що включає оцінку гіперемії, інфільтрації та десквамації. Для поглиблених досліджень було відібрано тест-зразок лідер – крем із 10 % вмістом ОНМ, а також розроблено комбінації з 2 % дротаверином та 10 % вазеліновим маслом. Препаратом порівняння в даній серії досліджень був використаний 1 % крем гідрокортизону бутирату.

Ефективність досліджуваних кремів підтверджено редукцією індексу mPASI та поліпшенням морфологічної структури шкіри. Встановлено, що монокомпонентний крем із 10 % ОНМ демонструє певну антипсоріатичну та протизапальну активність, проте виявляється найменш ефективним серед досліджуваних зразків: на 21-шу добу лікування індекс mPASI знизився лише до Me (25%; 75%) = 2,0 (1,0; 3,0) бали.

Крем із 10 % ОНМ у комбінації з 2 % дротаверином – продемонстрував найвищу ефективність серед досліджуваних зразків, забезпечивши зниження mPASI до Me (25%; 75%) = 1,0 (0,0; 1,0) балу уже на 21-шу добу, перевищивши навіть показники ПП. Доведено, що дротаверин як неселективний інгібітор фосфодіестерази може зменшувати виразність запального процесу в шкірі, покращувати мікроциркуляцію, завдяки чому посилюється терапевтична дія ОНМ.

Крем із 10 % вазеліновим маслом у комбінації з 2 % дротаверином проявив помірну ефективність, знижуючи індекс mPASI до Me (25%; 75%) = 2,0 (1,0; 3,0), що свідчить про менший вплив вазелінового масла порівняно з ОНМ на редукцію псоріазоподібних уражень.

Загалом, отримані дані чітко вказують на перспективу використання ОНМ у комбінації з іншими фармакологічними агентами, насамперед із протизапальними та/або аналгетичними властивостями. Саме завдяки підсиленню проникності та синергетичній дії ОНМ можливо досягти більш вираженого та тривалого

антипсоріатичного ефекту, ніж канонічна допоміжна речовина – вазелінове масло, що виробляється також з нафти, протягом сторіччя використовувалася при розробці м'яких лікарських форм.

У *п'ятому розділі* наведено результати досліджень комплексної оцінки показників безпеки ОНМ *in vivo*, зокрема гостру токсичність при дермальному однократному нанесенні, субхронічну токсичність при тривалому 21-денному нашкірному нанесенні крему з 10 % ОНМ щурам, місцевоподразнювальну дію у мурчаків; *in vitro* із використанням клітинної лінії HaCaT (нормальних клітин) і модифікованих за псоріазоподібним типом кератиноцитів (HaCaT/P).

Вивчено гостру токсичність крему з 10 % ОНМ при одноразовому нашкірному нанесенні білим нелінійним щурам обох статей у дозах до 5000 мг/кг маси тіла. Встановлено, що досліджуваний крем не спричиняв загибелі тварин, не впливав на загальний фізіологічний стан, динаміку маси тіла, функціонування серцево-судинної та дихальної систем. Оцінка субхронічної токсичності за умов 21-добового нашкірного застосування крему також не виявила негативного впливу на стан щурів. Встановлено нормальну динаміку маси тіла, відсутність органотоксичності, а також збереження функціональної активності внутрішніх органів (печінки, нирок, серця, легенів, наднирників, яєчок). Крем не виявляв гендерних відмінностей щодо загального впливу. Отримані дані дозволяють класифікувати крем з 10 % ОНМ як малотоксичний засіб. Дослідження місцевої переносимості крему на моделях мурчаків не виявило місцевоподразнювальної дії: слабка мінуща еритема спостерігалася лише у поодиноких випадках і не була закономірною.

Оцінка безпеки ОНМ у клітинних модельних системах *in vitro* із застосуванням культури кератиноцитів HaCaT та HaCaT/P дозволила встановити його прийнятний рівень цитотоксичності у концентраційному діапазоні 0,16–2,5 %. Визначено, що модифіковані кератиноцити (HaCaT/P) мають підвищену чутливість до ОНМ, що може відображати специфічну активацію механізмів, залучених до патогенезу псоріазу. Значення IC_{50} для HaCaT/P у 8,8 рази нижче порівняно з

вихідною клітинною лінією, що свідчить про потенційну вибірккову дію препарату на патологічно змінені клітини.

Отже, отримані результати демонструють безпечність застосування крему з 10 % ОНМ, його відсутню токсичність за умов одноразового та тривалого нашкірного нанесення, а також потенційну безпечність для нормальних клітин шкіри людини. Це відкриває перспективи для подальшого доклінічного та клінічного вивчення препарату у дерматологічній практиці.

У шостому розділі було досліджено нові молекулярні фармакологічні ланки механізму дії ОНМ, зокрема його вплив на ключові показники проліферації клітин і апоптоз, рівень продукції активних форм кисню (АФК) та синтез прозапальних цитокінів (IL-1 β , IL-8), що мають важливе значення у патогенезі псоріазу.

Оцінка рівня апоптозу продемонструвала достовірне збільшення частки клітин у пізній фазі апоптозу після впливу ОНМ ($p \leq 0,05$), що може свідчити про його потенційну цитостатичну активність. Спостерігалось також збільшення кількості клітин у фазі середнього та раннього апоптозу, хоча ці зміни не були статистично значущими. Це може мати важливе значення для розуміння впливу ОНМ на процеси надмірної десквамації, лущення, врівноваження надмірної проліферації через посилення апоптозу. Це особливо важливо при псоріазі, де змінені патологічним процесом кератиноцити характеризуються підвищеною проліферацією і здатністю «уникати» природних механізмів загибелі. Сприяння програмованій загибелі аномальних клітин розглядається як один із перспективних підходів у терапії псоріазу, вперше виявлено для ОНМ, як сполуки, отриманої з нафти.

Дослідження рівня продукції АФК показало значне підвищення їх рівня після дії ОНМ у модифікованих кератиноцитах, проте цей ефект був значно менш вираженим, ніж у групі порівняння з гідрокортизоновим кремом, що може вказувати на більш слабкий, ніж у стероїдів, вплив ОНМ на окисно-відновний баланс клітин.

Виявлено, що ОНМ порівняно з 1 % гідрокортизоновим кремом більшою мірою інгібує ріст псоріазомодифікованих клітин (HaCaT/P), водночас зберігає

відносно високу життєздатність умовно нормальних кератиноцитів (HaCaT). Це свідчить про певну вибіркковість дії ОНМ, а також нижчу ймовірність виникнення побічних ефектів з боку здорових клітин при місцевому застосуванні.

Очищене нафталанове масло знижує експресію IL-8 (важливого учасника хемотаксису клітин під час запалення), що може гальмувати поширення патологічного процесу, сприяє контролю проліферації кератиноцитів та уповільнює розвиток запальних реакцій у шкірі. Це нові ланки в механізмі дії, що вперше виявлені в ОНМ.

Препарат порівняння 1 % гідрокортизоновий крем, хоча і мав певні переваги у зниженні IL-1 β , все ж асоціювався з більш вираженими побічними впливами на нормальні клітини. Очищене нафталанове масло у свою чергу продемонструвало кращий профіль безпеки, що є вагомим аргументом на користь розробки інноваційних лікарських форм із використанням похідних нафталану.

Отже, результати експериментальних досліджень фармакології безпеки підтверджують наявність в ОНМ вибіркової дії відносно патологічних клітин, що лежить в основі його потенційних переваг перед традиційними гормональними кортикостероїдними мазями та кремами, особливо при тривалій терапії псоріазу.

У розділі *«Аналіз та узагальнення результатів дослідження»* наведені ключові висновки, які випливають із проведених експериментальних та науково-практичних робіт, а також, на основі отриманих даних сформовано науково-обґрунтовану пропозицію щодо використання ОНМ як допоміжної речовини в комбінованих лікарських формах, які містять АФІ з вираженими протизапальними та анальгетичними властивостями. Сформовано висновок про високу ефективність ТЗ з 10 % ОНМ у комбінації з 2 % дротаверином, яка досягала значного зниження індексу mPASI до Me (25%; 75%) = 1,0 (0,0; 1,0) бал наприкінці 21-го дня лікування. Гістологічний аналіз підтвердив регенеративні зміни у структурі епідермісу та дерми у цій групі. Проведені фармакологічні експерименти підтвердили доцільність використання ОНМ як допоміжної речовини у лікуванні псоріазу, оскільки воно не лише поліпшує проникність активних компонентів, синергістично посилює протизапальну дію, але й виявляє власні, хоч і помірні, протизапальні,

кератолітичні властивості, посилює регенерацію клітин шкіри. Комбінація з дротаверином, наприклад, показала високу антипсоріатичну, аналгетичну та протизапальну активність, перевищивши ефективність стандартних кортикостероїдних препаратів у моделі псоріазоподібних уражень шкіри.

Результати дисертаційного дослідження було впроваджено в навчальний та науково-дослідний процес кафедр фармакології фармацевтичного і медичних ЗВО, зокрема: Національного фармацевтичного університету, Полтавського державного медичного університету, Одеського національного медичного університету, Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова, Харківського національного медичного університету, Запорізького державного медико-фармацевтичного університету.

Ключові слова: фармацевтична композиція, крем, м'які лікарські форми, очищене нафталанове масло, інгібітори фосфодіестерази, антипсоріатична дія, протизапальна дія, ушкодження шкіри, субстанції природного походження, доклінічні дослідження, мікроскопічні дослідження, гостра токсичність, місцеве застосування, допоміжні речовини, лікарський засіб.

Список публікацій здобувача за темою дисертації.

Наукові праці, в яких опубліковані основні результати дисертації:

1. Zaychenko G, Gorchakova N, Horbach A, Stan I, Simonov P. Teoretychne y eksperymentalne obgruntuvannya rozrobky dermatologichnykh likarskykh zasobiv na osnovi pryrodnykh spoluk naftalanskoï nafty [Theoretical and experimental justification of development of dermatological medicinal products based on natural compounds of Naftalan oil]. *Fitoterapiia. Chasopys – Phytotherapy. Journal.* 2024;3:52–61. <https://doi.org/10.32782/2522-9680-2024-3-52>.

2. Горбач, А. О., & Зайченко, Г. В. Порівняльна оцінка ефективності нових тест-зразків кремів з очищеним нафталановим маслом на експериментальній моделі псоріазу. *Фармацевтичний журнал.* 2024;(6):61-72. <https://doi.org/10.32352/0367-3057.6.24>.

3. Горбач А.О., Стан І.Ю., Луговський С.П., Зайченко Г.В. Вплив очищеного нафталанового масла у складі топічних препаратів на морфологічні зміни шкіри при експериментальному псоріазі. *Медична наука України* 2025;1 doi:10.32345/2664-4738.1.2025.01

4. Зайченко Г.В., Горбач А.О. Експериментальне обґрунтування механізму протизапальної дії очищеного нафталанового масла. «Здобутки клінічної і експериментальної медицини» №1(61) 2025. doi: 10.11603/1811-2471.2025.v.i1.15125

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

1. Zaychenko G, Horbach A. Perspective for the development of new medicines based on purified Naftalan oil for the treatment of dermatological diseases. Proceedings of the 15th Congress of the European Association for Clinical Pharmacology and Therapeutics (EACPT) (June 25–28, 2022) Athens, Greece. Springer; 2022:48-49;

2. Зайченко ГВ, Горбач АО, Стан ІЮ. Експериментальне моделювання псоріазоподібного ураження шкіри у інбредних мишей лінії BALB/c: матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю, присвячена 30-річчю заснування Інституту підвищення кваліфікації спеціалістів фармації Національного фармацевтичного університету «Безперервний професійний

розвиток фармацевтичних працівників: сучасний стан, проблеми та перспективи» (1–2 листопад 2023 р.). Харків, НФаУ, 2023:271-273;

3. Зайченко ГВ, Горбач АО. Вивчення протизапальної активності кремів із різною концентрацією очищеного нафталанового масла на моделі карагінанового набряку у щурів. Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю, присвяченої 25-річчю фармацевтичного факультету «Фармацевтична освіта, наука та практика: стан, проблеми, перспективи розвитку» (19–20 грудня 2023 р.) м. Київ: НМУ імені О.О. Богомольця. 2023:34-36.

4. Зайченко ГВ, Ляпунов МО, Безугла НП, Горбач АО. Модифікація макроскопічної оцінки антипсоріатичної активності топічних дермальних засобів. Матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю «Сучасна фармація: реалії сьогодення та перспективи розвитку» (9–12 квітня 2024 р.). Одеса, ОНУ, 2024:299-300;

5. Зайченко ГВ, Луговський СП, Горбач АО, Стан ІЮ. Морфологічна оцінка терапевтичної дії нових топічних засобів з очищеним нафталановим маслом при експериментальному псоріазі. Зб. Наук. Робіт за матеріалами Восьмої Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю «Теорія та практика сучасної морфології». м. Дніпро, 6–8 листопада 2024 р. Дніпро : ДДМУ; 2024:56-57;

6. Зайченко ГВ, Горбач АО, Стан ІЮ, Горчакова Н.О. Ренесанс нафтопрепаратів, що містять очищене нафталанове масло, і обґрунтування перспективи розробки на їх основі антипсоріатичних лікарських засобів. Збірник матеріалів наукового конгресу з міжнародною участю, залученням молодих вчених, студентів «Комплементарна/народна медицина, освіта, культура: від традиційних практик доклінічного дослідження» (13–14 червня 2024р.). Київ, ТНУ імені В.І. Вернадського, 2024:275.

ABSTRACT

Horbach A.O. Experimental substantiation of the feasibility of developing a new cream based on refined Naftalan oil for the treatment of dermatological diseases. – A qualification research paper in the form of a manuscript. A dissertation for the degree of Doctor of Philosophy in the Specialty 226 «Pharmacy, Industrial Pharmacy» (field of knowledge 22 «Healthcare»). – O.O. Bogomolets National Medical University of the Ministry of Health of Ukraine, Kyiv, 2025.

This dissertation is devoted to the experimental substantiation of the feasibility of developing new topical medicinal products based on refined Naftalan oil for treating dermatological diseases, namely psoriasis.

Psoriasis is a chronic inflammatory skin disease of autoimmune nature, which affects approximately 2 % of Asian and certain African populations, rising to as high as 11 % in Caucasian and Scandinavian populations (Rendon et al., 2019; Bu et al., 2022; Damiani et al., 2021; Armstrong et al., 2021; Zhang et al., 2024). The key etiopathogenetic factors of psoriasis include environmental triggers, skin protective barrier disruption, and immune system dysfunction dominated by the IL-23/Th17 axis. Psoriasis is characterised by persistent inflammation, leading to uncontrolled keratinocyte proliferation and dysfunctional differentiation. The main clinical manifestations of psoriasis involve the formation of hyperkeratotic plaques and skin scaling, accompanied by pruritus, pain, and a marked reduction in patients' quality of life. Current therapy for psoriasis depends on the severity of the disease, its clinical forms, and the presence of comorbid conditions. For patients with mild to moderate psoriasis, topical treatments are preferred – corticosteroids, vitamin D analogues, salicylic acid, and calcineurin inhibitors are the most commonly used. In severe cases, systemic treatments are used, including immunosuppressants (methotrexate, cyclosporine, retinoids) and biological agents that block key pro-inflammatory cytokines (IFN- α , IFN- β , IL-12, IL-23). A multitude of therapeutic approaches – ranging from topical corticosteroids and keratolytics to systemic therapy and biological drugs – often present limitations associated with side effects (both local and systemic), the development of tolerance, and the risk of exacerbating

comorbidities (Sandipan et al., 2014; Aayushi et al., 2016; Altenburg et al., 2018; Lockwood et al., 2018). Consequently, new objectives arise for pharmaceutical science: to discover natural compounds and innovative excipients with multifactorial activities that can be optimally combined with existing active pharmaceutical ingredients (APIs).

Despite substantial progress in psoriasis pharmacotherapy, several issues remain unresolved, including adverse effects, resistance to existing drugs, and long-term safety concerns. These challenges drive the quest for and creation of new medications with high efficacy and a favourable safety profile, suitable both for monotherapy and combination therapy alongside other pharmacotherapeutic agents. One promising direction involves investigating natural compounds, particularly refined Naftalan oil, which possesses anti-inflammatory, keratolytic, and regenerative properties, thereby demonstrating pharmacological potential and being considered a promising substance for incorporation into topical dosage forms for psoriasis treatment (Adigozalova, 2023).

Refined Naftalan oil (RNO) is one of the natural products traditionally employed in balneology and physiotherapy for skin diseases (naphthalan baths, topical applications, and ointments based on Naftalan oil). It holds advantages over unrefined Naftalan oil (so-called naphthalan), which has been used in traditional medical practice for centuries (Vrzogić, 2003; Adigozalova, 2023). Existing experimental data highlight its anti-inflammatory, keratolytic, and regenerative properties, and a more favourable safety profile compared to unrefined Naftalan oil. However, research focusing on the direct incorporation of RNO into new topical formulations with proven pharmacological efficacy for psoriasis is virtually lacking. Consequently, the development and investigation of new topical formulations with RNO are of scientific and practical relevance. The aforementioned factors define the relevance of the dissertation topic, as well as its aim and objectives.

In this dissertation, the pharmacological properties of RNO are examined in detail, and the feasibility of using RNO as an excipient in combination with other pharmacotherapeutic ingredients for the treatment of psoriasis is comprehensively substantiated.

In the **first chapter**, modern literature data on the epidemiology of psoriasis, its aetiopathogenesis, and therapeutic approaches are analysed. Special attention is paid to contemporary methods of treatment, including topical (corticosteroids, vitamin D analogues, retinoids, keratolytics) and systemic (methotrexate, cyclosporine, phosphodiesterase-4 inhibitors, biological drugs) approaches, as well as mechanisms underpinning limitations in the use of existing therapies (for instance, the risk of systemic toxicity following prolonged corticosteroid use, tolerance development, etc.).

The review also provides a rationale for incorporating natural petroleum-derived substances into psoriasis therapy. Specifically, RNO is seen as a promising substance due to its impact on the inflammatory process, capacity to regulate keratinocyte proliferation and differentiation, and ability to support regenerative processes in the skin. A critical literature analysis led to the hypothesis that RNO may serve both as an excipient – enhancing API penetration – and as a potentially active component in topical formulations for treating skin diseases, including psoriasis. This became the basis for the formulation of the aim and objectives of the study.

In the **second chapter**, the materials and methods of the study are described – objects, subjects, experimental design, and methods for assessing anti-inflammatory, analgesic, antipsoriatic, cytotoxic, and local irritant effects. The study applied pharmacological models both in vivo (carrageenan-induced inflammation and imiquimod-induced psoriasiform lesions in laboratory animals) and modern in vitro cell research involving specialised cell lines (HaCaT/P – psoriasiform keratinocytes). A broad array of contemporary techniques was used to evaluate anti-inflammatory, analgesic, and antipsoriatic parameters, histological examination of tissues, and the assessment of key pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-8).

In the **third chapter**, the results of a screening study on the anti-inflammatory and analgesic effects of experimental test samples (TS) of creams in a hydrophilic base with the following compositions are presented: a TS with 10 % vaseline oil; a TS with 10 % Naftalan oil; a TS with 10 % refined Naftalan oil (RNO); a TS with 15 % refined Naftalan oil (RNO). In these experiments, a cream containing 1 % hydrocortisone acetate served as the reference product (RP).

To model the inflammatory process, the classical model of carrageenan-induced inflammation in white outbred rats of both sexes was used, wherein 0.1 ml of a 1 % aqueous carrageenan solution was injected into the plantar aponeurosis of the right hind paw. The findings demonstrated that TS No. 3 (containing 10 % RNO) displayed the highest anti-inflammatory activity among all tested samples, exceeding the RP in the early inflammatory phase at 2 hours (23 % versus approximately 11–12 % in the RP). However, by 4 hours, the activity of TS No. 3 had declined to 16 %, equivalent to that of the RP. Concerning analgesic activity, TS No. 3 (a cream with 10 % RNO) proved less effective: no marked increase in the pain threshold was recorded, and in certain experimental series, it actually decreased.

Based on these results, it was concluded that, overall, RNO may be more suitably applied not as an active pharmaceutical ingredient, but rather as an excipient, potentially in combination with APIs possessing pronounced anti-inflammatory activity.

In the **fourth chapter**, the results of an in-depth study of RNO-based cream test samples are presented, examining both a monocomponent cream and a cream combined with drotaverine. Their antipsoriatic action was investigated in a model of imiquimod-induced psoriasiform lesions in BALB/c mice over a 21-day treatment period. The modified PASI (mPASI) index, which assesses erythema, infiltration, and desquamation, was used to gauge efficacy. The leading test sample – a cream with 10 % RNO – was selected for deeper investigation, alongside combinations with 2 % drotaverine and 10 % vaseline oil. A 1 % hydrocortisone butyrate cream served as the reference product.

The efficacy of these test creams was confirmed by reductions in the mPASI index and improvements in skin morphology. It was found that the monocomponent cream containing 10 % RNO exhibited some antipsoriatic and anti-inflammatory properties but was the least effective among the tested creams: by day 21 of treatment, the mPASI index had only decreased to Me (25%; 75%) = 2.0 (1.0; 3.0).

By contrast, the cream with 10 % RNO combined with 2 % drotaverine demonstrated the highest efficacy among all the samples studied, achieving an mPASI reduction to Me (25%; 75%) = 1.0 (0.0; 1.0) on day 21, surpassing even the RP. It was shown that, as a non-selective phosphodiesterase inhibitor, drotaverine can indirectly

reduce inflammation and enhance microcirculation, thereby reinforcing the therapeutic effect of RNO.

The cream containing 10 % vaseline oil combined with 2 % drotaverine showed moderate efficacy, lowering the mPASI index to Me (25%; 75%) = 2.0 (1.0; 3.0), indicating a weaker impact of vaseline oil compared to RNO in reducing psoriasiform lesions.

Overall, the results clearly indicate the potential of RNO use in tandem with other pharmacological agents, particularly those demonstrating anti-inflammatory and/or analgesic effects. By enhancing the permeability and providing synergistic effects, RNO may yield a more pronounced and long-lasting antipsoriatic impact than the traditional excipient – vaseline oil – derived from petroleum, which has been utilised in the formulation of soft dosage forms for centuries.

In the **fifth chapter**, the results of a comprehensive assessment of the safety indicators of RNO *in vivo* are presented. These include acute toxicity following single dermal application, subchronic toxicity after prolonged 21-day dermal application of a cream containing 10 % RNO in rats, and local irritant effects in guinea pigs. Additionally, *in vitro* studies were conducted using the HaCaT cell line (normal keratinocytes) and keratinocytes modified in a psoriasis-like manner (HaCaT/P).

The acute toxicity of a cream containing 10 % RNO was evaluated following a single dermal application in non-linear white rats of both sexes at doses up to 5000 mg/kg body weight. The results indicated that the tested cream did not cause mortality, did not affect the general physiological condition, body weight dynamics, or the functioning of the cardiovascular and respiratory systems. The subchronic toxicity assessment under conditions of 21-day dermal application also revealed no adverse effects on the condition of the rats. Normal body weight dynamics were observed, along with the absence of organ toxicity and preserved functional activity of internal organs (liver, kidneys, heart, lungs, adrenal glands, testes). The cream did not exhibit gender-specific differences in its general effects. These findings allow the classification of the cream with 10 % RNO as a low-toxicity agent. The study of local tolerability of the cream in guinea pig models did

not reveal any local irritant effects: mild transient erythema was observed only in isolated cases and was not consistent.

The safety assessment of RNO in in vitro cellular models using HaCaT and HaCaT/P keratinocyte cultures demonstrated an acceptable level of cytotoxicity within a concentration range of 0.16–2.5 %. It was determined that the modified keratinocytes (HaCaT/P) exhibited increased sensitivity to RNO, which may reflect specific activation of mechanisms involved in the pathogenesis of psoriasis. The IC₅₀ value for HaCaT/P was 8.8 times lower than that for the original cell line, indicating the potential selective action of the compound on pathologically altered cells.

Thus, the obtained results demonstrate the safety of using a cream containing 10 % RNO, its lack of toxicity under conditions of both single and prolonged dermal application, as well as its potential safety for normal human skin cells. These findings open up prospects for further preclinical and clinical studies of the preparation in dermatological practice.

In the **sixth chapter**, novel molecular pharmacological aspects of the mechanism of action of RNO are explored, particularly its impact on key indicators of cell proliferation and apoptosis, the level of reactive oxygen species (ROS) production, and the synthesis of pro-inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-8), which play a significant role in the pathogenesis of psoriasis.

The assessment of apoptosis levels demonstrated a significant increase in the proportion of cells in the late apoptosis phase following RNO exposure ($p \leq 0.05$), suggesting its potential cytostatic activity. An increase in the number of cells in the early and mid-apoptosis phases was also observed, although these changes were not statistically significant. This may have important implications for understanding the influence of RNO on processes of excessive desquamation and scaling, balancing excessive proliferation through enhanced apoptosis. This is particularly relevant for psoriasis, where keratinocytes affected by the pathological process exhibit increased proliferation and an ability to "evade" natural cell death mechanisms. Facilitating programmed cell death of abnormal cells is considered a promising approach in psoriasis therapy, and this property has been identified for the first time in RNO, a compound derived from Naftalan oil.

The study of ROS production levels revealed a significant increase following RNO exposure in modified keratinocytes; however, this effect was considerably less pronounced compared to the reference group treated with hydrocortisone cream, suggesting a weaker oxidative-stress-inducing effect of RNO compared to steroids.

It was found that RNO, compared to 1 % hydrocortisone cream, more effectively inhibited the growth of psoriasis-modified cells (HaCaT/P) while maintaining relatively high viability of conditionally normal keratinocytes (HaCaT). This indicates a certain selectivity of RNO action and a lower likelihood of side effects on healthy cells upon topical application.

Refined Naftalan oil reduces IL-8 expression (a key mediator of cell chemotaxis during inflammation), which may slow the spread of the pathological process, contribute to the regulation of keratinocyte proliferation, and mitigate inflammatory skin reactions. These represent novel mechanistic insights into RNO's action, identified for the first time.

Although the reference preparation, 1 % hydrocortisone cream, demonstrated certain advantages in reducing IL-1 β levels, it was also associated with more pronounced adverse effects on normal cells. In contrast, RNO exhibited a superior safety profile, providing a strong argument in favor of developing innovative pharmaceutical formulations utilizing Naftalan derivatives.

Thus, the results of experimental pharmacological safety studies confirm the selective action of RNO on pathological cells, which underpins its potential advantages over traditional corticosteroid creams and ointments, particularly in long-term psoriasis therapy.

In the section “**Analysis and Generalisation of the Study Results**”, the key findings derived from the experimental and scientific-practical work are presented. On the basis of the obtained data, a scientifically substantiated suggestion is put forth on using RNO as an excipient in combination drug products containing APIs with pronounced anti-inflammatory and analgesic properties. It is concluded that a test sample with 10 % RNO combined with 2 % drotaverine yielded a high level of efficacy, significantly reducing the mPASI index to Me (25%; 75%) = 1.0 (0.0; 1.0) by the end of the 21-day treatment. Histological analysis confirmed the regenerative transformations in

the structure of the epidermis and dermis in this group. Pharmacological experiments validate the rationale for using RNO as an excipient in psoriasis treatment, given that it not only enhances the penetration of active ingredients and synergistically boosts anti-inflammatory effects, but also exhibits its own moderate anti-inflammatory, keratolytic properties, and promotes the regeneration of skin cells. The combination with drotaverine, for instance, achieved potent antipsoriatic, analgesic, and anti-inflammatory activities, surpassing the efficacy of standard corticosteroid medications in a psoriasiform lesion model.

The findings of the dissertation have been implemented in the educational and research processes of the pharmacology departments of pharmaceutical and medical institutions of higher education, in particular: National Pharmaceutical University, Poltava State Medical University, Odessa National Medical University, Vinnytsia National Pirogov Memorial Medical University, Kharkiv National Medical University, Zaporizhzhia State Medical and Pharmaceutical University.

Keywords: pharmaceutical composition, cream, soft dosage forms, refined Naftalan oil, phosphodiesterase inhibitors, antipsoriatic action, anti-inflammatory action, skin lesions, substances of natural origin, preclinical studies, microscopic examinations, acute toxicity, topical application, excipients, medicinal product.

List of publications by the applicant on the dissertation topic

Scientific papers publishing the main results of the dissertation:

1. Zaychenko G, Gorchakova N, Horbach A, Stan I, Simonov P. Theoretical and experimental justification of the development of dermatological medicinal products based on natural compounds of Naftalan oil. *Phytotherapy. Journal.* 2024;3:52–61. <https://doi.org/10.32782/2522-9680-2024-3-52>.
2. Horbach A.O., Zaychenko G.V. Comparative evaluation of the effectiveness of new test samples of creams with refined Naftalan oil in an experimental psoriasis model. *Pharmaceutical Journal.* 2024;(6):61-72. <https://doi.org/10.32352/0367-3057.6.24>.
3. Horbach A.O., Stan I.Yu., Lugovsky S.P., Zaychenko G.V. The effect of purified Naftalan oil in topical preparations on morphological skin changes in experimental psoriasis. *Medical Science of Ukraine.* 2025;1. doi:10.32345/2664-4738.1.2025.01
4. Zaychenko G.V., Horbach A.O. Experimental justification of the anti-inflammatory mechanism of refined Naftalan oil. *Achievements of Clinical and Experimental Medicine.* 2025;(1)61. doi: 10.11603/1811-2471.2025.v.i1.15125

Scientific papers confirming the approval of the dissertation materials:

1. Zaychenko G, Horbach A. Perspective for the development of new medicines based on refined Naftalan oil for the treatment of dermatological diseases. *Proceedings of the 15th Congress of the European Association for Clinical Pharmacology and Therapeutics (EACPT) (June 25–28, 2022), Athens, Greece.* Springer; 2022:48-49.
2. Zaychenko G.V., Horbach A.O., Stan I.Yu. Experimental modeling of psoriasis-like skin lesions in BALB/c inbred mice: *Proceedings of the Scientific and Practical Conference with International Participation dedicated to the 30th Anniversary of the Institute for Advanced Training of Pharmacy Specialists of the National University of Pharmacy "Continuous Professional Development of Pharmaceutical Workers: Current State, Problems, and Prospects" (November 1–2, 2023), Kharkiv, NUPh.* 2023:271-273.

3. Zaychenko G.V., Horbach A.O. Study of the anti-inflammatory activity of creams with different concentrations of refined Naftalan oil in a carrageenan-induced rat paw edema model. Proceedings of the Scientific and Practical Conference with International Participation dedicated to the 25th Anniversary of the Faculty of Pharmacy "Pharmaceutical Education, Science, and Practice: Current State, Problems, and Prospects for Development" (December 19–20, 2023), Kyiv, Bogomolets National Medical University. 2023:34-36.

4. Zaychenko G.V., Lyapunov M.O., Bezuhla N.P., Horbach A.O. Modification of macroscopic evaluation of the antipsoriatic activity of topical dermal agents. Proceedings of the All-Ukrainian Scientific and Practical Conference with International Participation "Modern Pharmacy: Current Realities and Development Prospects" (April 9–12, 2024), Odesa, ONU. 2024:299-300.

5. Zaychenko G.V., Lugovsky S.P., Horbach A.O., Stan I.Yu. Morphological assessment of the therapeutic effects of new topical agents with refined Naftalan oil in experimental psoriasis. Collection of Scientific Papers based on the Eighth All-Ukrainian Scientific and Practical Conference with International Participation "Theory and Practice of Modern Morphology" (November 6–8, 2024), Dnipro, DSMA. 2024:56-57.

6. Zaychenko G.V., Horbach A.O., Stan I.Yu., Gorchakova N.O. The renaissance of petroleum-based preparations containing refined Naftalan oil and the justification for developing antipsoriatic drugs based on them. Proceedings of the Scientific Congress with International Participation, involving young scientists and students, "Complementary/Traditional Medicine, Education, Culture: From Traditional Practices to Preclinical Research" (June 13–14, 2024), Kyiv, V.I. Vernadsky TNU. 2024:275.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ ТА УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	26
ВСТУП.....	27
РОЗДІЛ 1. СУЧАСНІ ТА ТРАДИЦІЙНІ ПІДХОДИ ДО ЛІКУВАННЯ ПСОРІАЗУ: ОГЛЯД НАЯВНИХ ЗАСОБІВ І ОБҐРУНТУВАННЯ НЕОБХІДНОСТІ РОЗРОБКИ НОВИХ ЛІКАРСЬКИХ ПРЕПАРАТІВ_(огляд літератури).....	36
1.1 Сучасні уявлення про етіологію і патогенез псоріазу.....	36
1.2 Фармакотерапевтична корекція псоріазу: аналіз сучасних лікарських засобів.....	40
1.3 Роль фосфодіестерази 4 типу (ФДЕ4) у патогенезі та лікуванні псоріазу 47	
1.4 Обґрунтування застосування ЛЗ на основі нафтопродуктів в терапії псоріазу. Акцент на ефективність та недоліки	49
1.5 Обґрунтування розробки нових лікарських форм на основі ОНМ для лікування псоріазу.....	57
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	62
2.1 Індукція карагінанового запалення у щурів.....	64
2.2 Моделювання псоріазоподібного ураження шкіри у мишей лінії BALB/c	67
2.3 Індукція посиленого карагінаном запалення у мишей лінії BALB/c із сформованим псоріазоподібним ураженням шкіри	72
2.4 Гістологічне та морфометричне дослідження зразків шкіри	74
2.5 Дослідження гострої і субхронічної токсичності та місцевої переносимості очищеного нафталанового масла <i>in vivo</i>	74
2.6 Вивчення окремих показників безпеки досліджуваних тест-зразків на моделі псоріазу <i>in vitro</i>	77
2.7 Оцінка рівня апоптозу в клітинах методом проточної цитометрії	79
2.8 Визначення рівня продукції активних форм кисню, інтерлейкінів кератиноцитами.....	80
2.9 Статистичні методи обробки даних морфометричних досліджень.....	81

РОЗДІЛ 3. СКРИНІНГОВЕ ФАРМАКОЛОГІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ТЕСТ-ЗРАЗКІВ КРЕМУ З ОЧИЩЕНИМ НАФТАЛАНОВИМ МАСЛОМ ТА ВИЗНАЧЕННЯ ОПТИМАЛЬНОГО СКЛАДУ ЛІКАРСЬКОЇ ФОРМИ ЗА ДІЮЧОЮ ТА ДОПОМІЖНИМИ РЕЧОВИНАМИ.....	84
3.1 Вивчення аналгетичної дії.....	85
3.2 Вивчення протизапальної дії	88
РОЗДІЛ 4. ПОГЛИБЛЕНЕ ФАРМАКОЛОГІЧНЕ ВИВЧЕННЯ НОВИХ КРЕМІВ З ОЧИЩЕНИМ НАФТАЛАНОВИМ МАСЛОМ	92
4.1 Порівняльний аналіз дозових режимів іміквімоду для моделювання псоріазоподібного ураження шкіри мишей лінії BALB/c.....	92
4.2 Вплив тест-зразків кремів на загальний стан і показники життєдіяльності мишей лінії BALB/c на моделі псоріазоподібного ураження шкіри	96
4.3 Макроскопічна оцінка ефективності досліджуваних тест-зразків кремів на моделі псоріазоподібного ураження шкіри у мишей лінії BALB/c	98
4.4 Дослідження аналгетичної активності тест-зразків кремів на моделі посиленого карагінаном псоріазоподібного ураження шкіри у мишей лінії BALB/c	101
4.5 Дослідження протизапальної активності тест-зразків кремів на моделі псоріазоподібного ураження шкіри у мишей лінії BALB/c.....	104
4.6 Гістологічні зміни шкіри мишей лінії BALB/c на моделі псоріазоподібного ураження шкіри IMQ.....	106
4.6.1 Стан шкіри тварин групи інтактного контролю	106
4.6.2 Стан шкіри тварин групи КП.....	108
4.6.3 Гістологічна оцінка ефективності тест-зразків кремів з ОНМ при місцевому застосуванні на моделі псоріазоподібного ураження у мишей лінії BALB/c.....	119
РОЗДІЛ 5. ДОСЛІДЖЕННЯ ГОСТРОЇ, СУБХРОНІЧНОЇ ТОКСИЧНОСТІ, МІСЦЕВОЇ ПЕРЕНОСИМОСТІ КРЕМУ З ОЧИЩЕНИМ НАФТАЛАНОВИМ МАСЛОМ <i>IN VIVO</i> ТА БЕЗПЕКИ В УМОВАХ <i>IN VITRO</i> НА КЕРАТИНОЦИТАХ ЛЮДИНИ.....	138

5.1 Результати дослідження гострої токсичності крему з 10 % ОНМ.....	138
5.2 Результати дослідження субхронічної токсичності крему з 10 % ОНМ за умов його тривалого 21-денного застосування.....	141
5.3 Дослідження місцево-подразнювальної дії крему з 10 % ОНМ за умов тривалого застосування	143
5.4 Оцінка безпеки ОНМ в експериментальних клітинних модельних системах <i>in vitro</i>	144
РОЗДІЛ 6. ВИВЧЕННЯ ОКРЕМИХ ЛАНОК МЕХАНІЗМУ ДІЇ ОЧИЩЕНОГО НАФТАЛАНОВОГО МАСЛА В МОДЕЛЬНИХ СИСТЕМАХ IN VITRO	151
6.1 Оцінка рівня апоптозу та продукції АФК модифікованих кератиноцитів НаСаТ/Р внаслідок дії ОНМ та ПП	151
6.2 Оцінка продукції прозапальних цитокінів IL-8 та IL-1 β модифікованими кератиноцитами НаСаТ/Р після їх експозиції з ОНМ	154
АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	157
ВИСНОВКИ.....	171
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	174
ДОДАТКИ.....	192
Додаток А. Акти впровадження результатів роботи в науковий обіг та практичну діяльність	192
Додаток Б. Список публікацій здобувача за темою дисертації.....	197

ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ ТА УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

ІМQ – іміквімод

PASI (Psoriasis Area and Severity Index) – індекс площі та тяжкості псоріазу

mPASI (modified PASI) – модифікована версія індексу PASI

АА – аналгетична активність

АФІ – активний фармацевтичний інгредієнт

АФК – активні форми кисню

КН – карагінановий набряк

ОНМ – очищене нафталанове масло

ПБЧ – поріг больової чутливості

ПЗА – протизапальна активність

ПНА – протинабрякова активність

ПП – препарат порівняння

ТЗ – тест-зразок

ВСТУП

Обґрунтування вибору теми дослідження. Псоріаз належить до одних із найбільш поширених хронічних дерматологічних захворювань, яке вражає близько 125 мільйонів людей у всьому світі [23, 25]. За даними вітчизняних епідеміологічних досліджень, в Україні приблизно 1,5 млн пацієнтів страждають на псоріаз [76, 79]. Постійне зростання кількості випадків дерматологічних захворювань зумовлює підвищення рівня медико-соціальних проблем, пов'язаних із цим хронічним та часто рецидивуючим патологічним процесом. Псоріаз негативно впливає на якість життя хворих, зумовлюючи системні порушення, зокрема кардіометаболічні розлади, запальні артрити, а також значні психологічні та емоційні ускладнення [23].

Незважаючи на наявність суттєвої кількості лікарських засобів і методів лікування псоріазу, практична реалізація терапії залишається складною. Тривалий характер захворювання, рецидиви, можливе звикання до лікарських препаратів, побічні реакції та висока вартість лікування значно ускладнюють отримання довготривалої й стабільної ремісії. Застосування топічних глюкокортикостероїдів, які залишаються однією з основних груп препаратів місцевої терапії, нерідко супроводжується рядом ускладнень, зокрема атрофією шкіри та розвитком стійкості до лікування. Тому пошук і розроблення нових лікарських засобів, що поєднували б високу ефективність та належний профіль безпеки, є одним із пріоритетних завдань сучасної фармацевтичної науки й практики.

Серед перспективних напрямів створення інноваційних топічних препаратів для лікування псоріазу особливої уваги заслуговують природні речовини із полівалентним фармакологічним потенціалом. Однією з таких речовин є нафталанове масло, яке вирізняється вираженою протизапальною, протимікробною, анальгезуючою, ангіопротекторною та ранозагоювальною дією. До його позитивних ефектів належать здатність зменшувати ексудацію, підвищувати фагоцитарну активність лейкоцитів, зменшувати больовий синдром, прискорювати процеси репарації шкіри, сприяти розсмоктуванню крововиливів і

проявляти фотозахисні властивості шляхом поглинання ультрафіолетового випромінювання. Водночас використання звичайного нафталанового масла обмежується його токсичністю та потенційними канцерогенними властивостями за тривалого або неконтрольованого застосування [2, 6, 7].

З огляду на це, дослідження фармакологічних властивостей очищеного нафталанового масла, як нової речовини, що має покращені фармацевтичні властивості, посилює біодоступність і дію активних фармацевтичних інгредієнтів, виявляє помірні власні терапевтичні властивості, має сприятливий профіль безпеки, є важливим для фармацевтичної науки і практики. Розробка нових лікарських засобів місцевої дії на основі очищеного нафталанового масла для лікування псоріазу віддзеркалює сучасні вимоги медичної практики: поєднання високої клінічної ефективності, комплексної дії, мінімальних побічних ефектів, доступності для широкого кола пацієнтів. Застосування такого інноваційного компонента, як ОНМ, у складі антипсоріатичних засобів, може посилити безпеку й ефективність топічної терапії псоріазу, сприяти зменшенню доз кортикостероїдів, знижуючи загальне гормональне навантаження на організм пацієнтів, а також забезпечувати можливість проведення гормонозамісної терапії в період ремісії аутоімунних захворювань шкіри.

Саме ці чинники зумовили вибір теми дисертаційного дослідження, яка спрямована на розв'язання важливого практичного завдання сучасної фармацевтичної науки – розробку нових лікарських препаратів для місцевої терапії псоріазу із застосуванням нової речовини природного походження – очищеного нафталанового масла, для розширення асортименту вітчизняних лікарських засобів та імпортозаміщення в даній фармакотерапевтичній групі.

Зв'язок роботи з науковими програмами, темами, планами. Дисертаційна робота виконана на кафедрі фармакології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця відповідно до плану наукових досліджень за темою: «Фармакологічне дослідження м'яких лікарських форм на основі нафтопродуктів для терапії дерматологічних захворювань» (№ДР 0123U101124).

Мета і завдання дослідження. Мета дослідження полягала у експериментальному обґрунтуванні фармакологічних властивостей і доцільності розробки нових топічних лікарських засобів на основі очищеного нафталанового масла для лікування дерматологічних захворювань.

Досягнення мети зумовило постановку та вирішення таких **завдань**:

1. за результатами експериментального скринінгового дослідження нових кремів на основі природних речовин, отриманих з нафти (нафталанової нафти, вазелінового масла, очищеного нафталанового масла) визначити фармакологічні властивості (аналгетичні, протизапальні), оптимальний вміст і обґрунтувати можливість використання очищеного нафталанового масла як активної діючої або допоміжної речовини у складі антипсоріатичних лікарських засобів місцевої дії;
2. провести поглиблене фармакологічне вивчення антипсоріатичної дії монокомпонентного крему з очищеним нафталановим маслом і крему комбінованого складу з очищеним нафталановим маслом і дротаверином, на двох моделях експериментального псоріазоподібного ураження шкіри у мишей;
3. порівняти антипсоріатичну ефективність кремів з очищеним нафталановим маслом з дією топічного кортикостероїду (крем з 1 % гідрокортизону бутирату) за даними макро- і мікроскопічного дослідження стану шкіри на моделі експериментального псоріазоподібного ураження мишей;
4. оцінити окремі показники безпеки (гостру токсичність при однократному нашкірному нанесенні, субхронічну токсичність при тривалому 21-денному застосуванні у щурів, місцеву переносимість у мурчаків) *in vivo* і вивчити вплив на життєздатність, метаболічну активність очищеного нафталанового масла *in vitro* на кератиноцитах людини (інтактних HaCaT і псоріазозмінених HaCaT/P);
5. з'ясувати окремі ланки механізму реалізації антипсоріатичної дії очищеного нафталанового масла.

Об'єкт дослідження: експериментальна дерматологічна патологія (псоріазоподібне ураження шкіри у тварин).

Предмет дослідження: фармакологічні властивості, ефективність і безпека нових дерматологічних кремів монокомпонентного та

комбінованого складу, що містять ОНМ, в умовах експериментального псоріазоподібного ураження шкіри.

Методи дослідження: Теоретична основа дисертаційної роботи була узагальнена та сформована із застосуванням системного та структурного підходів до вивчення особливостей впливу тест-зразків кремів з очищеним нафталановим маслом на патологічні процеси, що моделюють гостре локальне запалення, і хронічне псоріазоподібне ураження шкіри у тварин.

Методичну основу роботи склав комплекс таких загальнонаукових та спеціальних методів:

- бібліосемантичний метод – для опрацювання літературних джерел з метою виявлення, систематизації і узагальнення наявних наукових даних стосовно поширення псоріазу, механізмів його розвитку, існуючих методів лікування;
- фармакологічні методи – визначення протизапальної дії нових кремів на моделі карагінан-індукованого гострого запалення і вивчення аналгетичної активності кремів в тесті «tail-flick» у щурів; вивчення антипсоріатичної активності на моделі іміквімод-індукованого псоріазоподібного ураження шкіри і посиленого карагінаном іміквімод-індукованого псоріазоподібного ураження шкіри у мишей лінії BALB/c;
- токсикологічні методи – оцінка гострої токсичності і місцевої переносимості *in vivo* при одноразовому дермальному нанесенні кремів з ОНМ щурам; вивчення безпеки ОНМ в дослідженнях *in vitro* на культурі кератиноцитів лінії HaCaT;
- гістологічні методи – морфологічне дослідження за допомогою світлової мікроскопії шкіри тварин з експериментальною псоріазоподібною патологією без фармакологічного втручання і під впливом досліджуваних кремів з ОНМ;
- метод проточної цитометрії – для оцінки життєздатності, рівня апоптозу, продукції активних форм кисню і прозапальних цитокінів IL-1 β і IL-8;
- статистичні методи – оцінка нормальності розподілу даних (критерій Шапіро-Уїлка); використання t-критерію Стюдента, тесту Манна-Уїтні та

дисперсійного аналізу (2-Way ANOVA) для порівняння показників між групами; розрахунок основних статистичних параметрів (середнє, стандартна похибка, медіана, довірчі інтервали) для оцінки достовірності отриманих даних.

Всі експерименти на тваринах проводилися згідно з Європейською конвенцією про захист хребетних тварин (1986 р.); положеннями Гельсінської декларації щодо гуманного поводження з тваринами (2000 р.); Директивою Ради Європейського Союзу 2010/63/EU щодо захисту тварин, які використовуються з науковою метою (2010 р.); Законом України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (2009 р.); протоколом №153 від 29.11.2021 р. Комісії з біоетики Національного медичного університету імені О.О. Богомольця.

Наукова новизна отриманих результатів полягає в тому, що вперше і експериментально обґрунтовано доцільність використання ОНМ при фармацевтичній розробці дерматологічних лікарських засобів як альтернатива неочищеному нафталановому маслу і іншим речовинам, отриманим при переробці нафти (наприклад вазеліновому маслу); проведено скринінг і визначено оптимальний вміст (10 %) ОНМ у складі м'яких лікарських форм; здійснено комплексне експериментальне дослідження протизапальної і антипсоріатичної дії тест-зразків кремів з ОНМ, як у монокомпонентному складі, так і в комбінації з іншими активними фармацевтичними інгредієнтами, в умовах модельованого псоріазоподібного ураження шкіри. Доведено вплив ОНМ на ключові ланки патогенезу псоріазу (регуляція апоптозу кератиноцитів, інгібування синтезу ключового цитокіну IL-8), що підтверджено методом гістологічної оцінки тканин шкіри та молекулярно-біологічними дослідженнями. Одержані результати розширюють наукові уявлення про можливі механізми реалізації фармакологічної дії і обґрунтовують застосування ОНМ, природної речовини, отриманої з нафталанської нафти як допоміжного інгредієнта у складі комбінованих лікарських форм топічної дії для терапії псоріазу.

Уперше:

- проведено комплексне дослідження протизапальної, анагетичної та антипсоріатичної дії нових кремів однокомпонентного і багатокомпонентного

складу з ОНМ, зокрема в комбінації з інгібітором фосфодіестерази дротаверином, визначено оптимальний вміст і можливість синергістичного поєднання зазначених компонентів у складі лікарських засобів топічної дії;

- експериментально доведено можливість використання дротаверину, як інгібітору фосфодіестерази з вираженою протизапальною дією, у складі топічних лікарських форм з ОНМ, що розширює його фармакодинаміку і сферу клінічного застосування в медичній практиці, зокрема як потенційного антипсоріатичного засобу.

Удосконалено:

- склад допоміжних речовин у складі антипсоріатичних кремів, зокрема поєднання ОНМ з гідрофільною кремовою основою, що забезпечує покращену проникність інгредієнтів в шкіру, стабільність фармацевтичних і покращення фармакологічних властивостей;

- методологічний підхід до оцінки цитотоксичності речовин *in vitro*, зокрема ОНМ, виявлено більшу чутливість патологічно змінених кератиноцитів людини (лінія HaCaT/P), порівняно з умовно нормальними клітинами (лінія HaCaT), що дозволяє припустити більш високу активність лікарських засобів з ОНМ у пацієнтів з псоріазомодифікованими змінами шкіри.

Набуло подальшого розвитку:

- науково-практичне обґрунтування використання ОНМ як природного інгредієнту, отриманого шляхом сучасних фармацевтичних технологій з нафталанської нафти для розробки лікарських засобів, засобів лікувальної косметики, що відрізняє його від неочищеного нафталанового масла за фармацевтичними і фармакологічними властивостями.

Практичне значення отриманих результатів полягає в тому, що розроблені підходи й результативні дані дозволяють рекомендувати очищене нафталанове масло, як речовину з покращеними фармацевтичними, фармакологічними властивостями, сприятливим профілем безпеки для розробки нових лікарських засобів місцевої дії для лікування дерматологічних захворювань. Встановлено, що завдяки наявності декількох механізмів протизапальної дії

(гальмування синтезу медіаторів ранньої фази запалення – гістаміну, медіатору пізньої фази запалення (IL-8), впливу на процеси апоптозу (що зменшує десквамацію епітелію і лущення шкіри), ОНМ виявляє спектр фармакологічних ефектів (протисвербіжну дію, здатність посилювати протизапальну дію активності інших антифлогістиків, наприклад, інгібіторів фосфодіестерази), обґрунтовують його використання як допоміжної речовини з покращеними фармацевтичними і фармакологічними властивостями у складі комбінованих лікарських форм (кремів, мазей) для лікування псоріазу й інших дерматологічних захворювань, лікувально-косметичних засобів для догляду за чутливою шкірою пацієнтів з захворюваннями шкіри. Наявність стероїдоподібних сполук у складі ОНМ, виявлені фармакодинамічні властивості, сприятливий профіль безпеки відкривають перспективи подальших доклінічних досліджень і клінічних випробувань нових антипсоріатичних засобів топічної дії, що дозволить поповнити асортимент ліків новими препаратами вітчизняного виробництва. Експериментально обґрунтовано можливість зменшення дози кортикостероїдних препаратів чи інших протизапальних засобів за рахунок синергетичної дії ОНМ, що може сприяти підвищенню безпеки та переносимості терапії, відкриває перспективи для покращення результатів лікування пацієнтів з незадоволеними потребами або резистентністю до існуючих антипсоріатичних лікарських засобів.

Результати наукових розробок дисертанта використовують у навчальному процесі медичних і фармацевтичного ЗВО при викладанні дисциплін «Фармакологія», «Побічна дія ліків», «Фармаконагляд». Результати впровадження запропонованих підходів підтверджено актами впровадження у практичну діяльність та освітній процес (Додаток Б).

Особистий внесок здобувача. Дисертаційна робота є самостійно виконаним завершеним науковим дослідженням. Дисертанту була відведена вирішальна роль, зокрема, в обґрунтуванні програми і об'єктів дослідження, проведенні експериментальної частини, обробці, інтерпретації результатів, узагальненні здобутих досягнень і побудуванні наукових положень та висновків на їх основі, отримані дані й виносяться на захист. Співавторами наукових робіт виступили

науковий керівник та співвиконавці окремих експериментів. У наукових роботах, опублікованих у співавторстві (д.мед.н., проф. Зайченко Г.В., д.мед.н., проф. Горчакова Н.О., проф. Луговський С.П., доц. Апихтіна О.Л., ас. Сімонов П.В.) дисертанту належить фактичний матеріал і основний творчий доробок, що внесено в анотації дисертаційної роботи. Формування мети і завдань, обговорення результатів, висновків відбувалось разом із науковим керівником.

Апробація результатів дослідження. Основні положення, результати, висновки та пропозиції роботи доповідалися та обговорювалися на 7 науково-практичних заходах міжнародного і всеукраїнського рівнів, а саме: 15th Congress of the European Association for Clinical Pharmacology and Therapeutics (EACPT) (Athens, Greece, 2022); 19th World Congress of Basic & Clinical Pharmacology 2023 (WCP 2023) (Glasgow, Scotland, 2023); науково-практичній конференції з міжнародною участю, присвяченій 30-річчю заснування Інституту підвищення кваліфікації спеціалістів фармації Національного фармацевтичного університету «Безперервний професійний розвиток фармацевтичних працівників: сучасний стан, проблеми та перспективи» (Харків, НФаУ, 2023); науково-практичній конференції з міжнародною участю, присвяченій 25-річчю фармацевтичного факультету «Фармацевтична освіта, наука та практика: стан, проблеми, перспективи розвитку» (Київ, НМУ імені О.О. Богомольця, 2023); Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Сучасна фармація: реалії сьогодення та перспективи розвитку» (Одеса, ОНУ, 2024); восьмій Всеукраїнській науково-практичній конференції з міжнародною участю «Теорія та практика сучасної морфології» (Дніпро, ДДМУ, 2024); науковому конгресі з міжнародною участю, залученням молодих вчених, студентів «Комплементарна/народна медицина, освіта, культура: від традиційних практик доклінічного дослідження» (Київ, ТНУ імені В.І. Вернадського, 2024).

Публікації. За результатами виконаного дослідження опубліковано 10 наукових праць. З них 4 роботи – статті в журналах відповідно до «Переліку наукових фахових видань України, в яких можуть публікуватися результати дисертаційних робіт на здобуття наукових ступенів доктора і кандидата наук», у

тому числі – 1 у виданнях, віднесених до бази даних Scopus; 6 тез доповідей у матеріалах науково-практичних конференцій.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається зі вступу, 6 розділів, узагальнення, загальних висновків, списку використаних джерел і додатків. Обсяг основного тексту дисертації становить 173 сторінки. Текст містить 31 таблицю (з яких 4 займають 2 повні сторінки) і 22 рисунки. Список використаних джерел налічує 170 найменувань та викладений на 20 сторінках. 2 додатків розміщені на 3 сторінках.

РОЗДІЛ 1

СУЧАСНІ ТА ТРАДИЦІЙНІ ПІДХОДИ ДО ЛІКУВАННЯ ПСОРІАЗУ: ОГЛЯД НАЯВНИХ ЗАСОБІВ І ОБҐРУНТУВАННЯ НЕОБХІДНОСТІ РОЗРОБКИ НОВИХ ЛІКАРСЬКИХ ПРЕПАРАТІВ (огляд літератури)

1.1 Сучасні уявлення про етіологію і патогенез псоріазу

Псоріаз – це хронічне імуніопосередковане захворювання шкіри, мультифакторної природи з генетичним фактором, що характеризується гіперпроліферацією та порушенням диференціювання епідермальних клітин, із дисбалансом між про- та протизапальними цитокінами [107, 112, 124, 146].

Поширеність псоріазу серед населення за даними різних авторів понад 125 мільйонів людей загальної популяції (від 0,1–3 % до 2–10 % в залежності від регіону) [12, 13, 38, 112, 124, 141, 168]. Наразі псоріаз розглядається як системне захворювання через його зв'язок із супутніми психологічними, метаболічними, суглобовим та серцево-судинними захворюваннями. Внаслідок цього скорочується тривалість життя у хворих на псоріаз. Крім психологічного та соціального тягаря, пов'язаного із псоріазом, витрати для пацієнтів та системи охорони здоров'я є значними [34, 162]. Захворювання може виникнути у будь-якому віці, проте у більшості пацієнтів спостерігається до 35 років. У 2014 р. ВООЗ визнала псоріаз серйозним неінфекційним захворюванням [12, 36, 79, 116, 168].

Етіологія захворювання до кінця не відома, тригерними факторами можуть бути як екзогенні, так і ендогенні чинники. Зовнішні фактори, що можуть спровокувати виникнення псоріатичного ураження шкіри: локальна травма (феномен Кебнера), УФ-випромінювання, забруднене повітря, прийом певних лікарських засобів (β -адреноблокатори, препарати літію, протималарійні препарати, системні стероїди, інтерферони, іміквімод, інгібітори АПФ, тербінафін, тетрациклін, НПЗЗ, фібрати), інфекційні захворювання (ВІЛ, β -гемолітичний стрептокок) [69, 107, 124]. Патогенез виникнення псоріазу, асоційованого з використанням певних груп препаратів цілком не з'ясований, молекулярні

механізми є складними. Наявні дані, що деякі лікарські засоби впливають на гіперпроліферацію кератиноцитів і вісь IL-23/IL-17. Циклічний аденозинмонофосфат (цАМФ) є внутрішньоклітинним месенджером, котрий регулює стимуляцію білків для клітинної диференціації та пригнічення проліферації клітин, β -адреноблокатори призводять до зниження інтраепідермального цАМФ, викликаючи гіперпроліферацію кератиноцитів. Іміквімод-індуковане запалення шкіри найбільш широко розповсюджена модель псоріазу на тваринах. Іміквімод активує toll-подібний рецептор-7/8, який може індукувати та загострити псоріаз, критично залежний від осі IL-23/IL-17 [53, 69, 140, 155].

Псоріаз часто асоційоване з іншими коморбідними станами (ендогенні чинники), включаючи: метаболічний синдром, цукровий діабет 2 типу, кардіометаболічні захворювання (атеросклероз, артеріальна гіпертензія, гіперліпідемія, інфаркт міокарда, судинні захворювання), хвороба Крона, розсіяний склероз, онкологічні захворювання, психіатричні захворювання (тривожний синдром, депресія, зниження самооцінки, сексуальна дисфункція, суїцидальні думки) [78, 141, 164]. Перебіг захворювання хронічний, характеризується загостреннями з періодами ремісії, це емоційно та фізично виснажує пацієнта та має значний психоемоційний вплив на пацієнта [13, 107, 141, 146].

Захворювання відноситься до генетично-обумовлених дерматозів, але тип успадкування не відомий. Завдяки різним геномним дослідженням підтверджується, що численні гени людського лейкоцитарного антигену (HLA) найбільше пов'язані з ризиком розвитку псоріазу, особливо HLA-C*06:02 (HLA-Cw6 з лоскутом сприйнятливості до псоріазу (PSORS1), а також різними специфічними мутаціями інтерлейкінів (наприклад, IL-17, IL-23 та IL-12 та ін.), що опосередковують запальний процес [11, 107, 112, 136, 154].

Бляшковий псоріаз є найпоширенішою формою псоріазу в 80–90 % випадків [13, 151, 107, 112, 136, 124]. Проявляється у вигляді чітко обмежених еритематозних папул та бляшок, покритими сріблясто-білими лусочками, що

підвищуються над рівнем шкіри, найчастіше локалізуються на волосяній частині шкіри голови, розгинальній поверхні ліктьових та колінних суглобів, тулубі та кінцівках (долонях та підошвах) [59, 121]. Основні клінічні ознаки псоріазу виявляються на зовнішньому шарі шкіри, однак розвиток псоріатичної бляшки не обмежується запаленням в епідермальному шарі, а скоріше формується взаємодією кератиноцитів з багатьма різними типами клітин (клітинами вродженого та адаптованого імунітету), що охоплюють дермальний шар шкіри [124].

Псоріаз системне запальне захворювання, що має добре сформовану імуногенетичну основу. Вісь IL-23/IL-17 відіграє важливу роль у розвитку псоріазу. Запальний шлях $\text{TNF}\alpha$ -IL-23-Th17 характеризує псоріаз бляшкового типу [124, 133]. У патогенезі псоріазу беруть участь антимікробні пептиди (AMP), дендритні клітини (DC), фактор некрозу пухлин (TNF) α , інтерлейкін (IL)23, Th17, IL-17, IL-22, а також сигнальний перетворювач і активатор транскрипції STAT3 [146, 163]. STAT3 регулює розвиток і поляризацію Т-клітин [26, 56]. Спочатку дендритні клітини активують і вивільняють IL, зокрема IL-12 та IL-23. IL-12 стимулює диференціювання клітин Th1, тоді як IL-23 сприяє диференціюванню Т-клітин Th17. Клітини Th17 – це спеціальні популяції CD4⁺ Т-клітин, які виробляють IL-17, IL-21, IL-22, TNF- α та інші цитокіни та експресують специфічний для лінії транскрипційний фактор Retinoic acid Related Orphan Receptor (RORC) [48, 117]. Цитокіни Th17, а саме IL-17, IL-21 та IL-22 активують проліферацію кератиноцитів в епідермісі [124]. Окрім клітин Th17 у псоріатичному епідермісі були виявлені клітини CD8 (Tc17), що продукують IL-17 [154]. При бляшковому псоріазі первинний шлях включає опосередковану IL-23 активацію Т-клітин Th17, що призводить до секреції цитокінів, таких як IL-17, IL-22 і TNF- α [30]. Це вивільнення цитокінів імунними клітинами порушує гомеостаз шкіри, що призводить до запалення та збільшення проліферації кератиноцитів, які є характерними ознаками псоріазу [11]. IL-17A є членом сімейства IL-17, який в основному продукується клітинами Th-17 і клітинами $\gamma\delta$ T, діючи як прозапальний цитокін, він бере участь у багатьох запальних процесах [18, 68]. На сьогоднішній день відомо, що кластер диференціювання (CD4⁺), IL-17 – продукують Th17 є центральними протагоністами

псоріазу [113]. Вивільнення IL-17 (найголовніше IL-17A) викликає гіперплазію епідермісу і сприяє активації імунних клітин, створюючи таким чином замкнуте коло запалення [21]. Участь IL-17A в патогенезі псоріазу була ретельно продемонстрована, шляхом прямої активації IL-17R кератиноцитів і запуску низхідної передачі сигналу, IL-17A індукував експресію кількох прозапальних цитокінів і хемокінів, які рекрутують нейтрофіли та моноцити, а потім активують Т-клітини, зрештою викликає гіперпроліферацію кератиноцитів і генерацію псоріазу [167]. Це призводить до гіперпроліферації епідермальних кератиноцитів та порушення їх диференціювання, фібробластів, ендотеліальних клітин, які в свою чергу починають виробляти фактори росту кератиноцитів та адгезивні молекули, ускладнюючи запальні процеси в ділянці ураження [7, 26, 136].

Значне надходження лейкоцитів у дерму та епідерміс, що призводить до появи характерних псоріатичних бляшок. Епідерміс інфільтрований великою кількістю активованих Т-клітин, які індукують проліферацію кератиноцитів. Гіперпроліферативний та аутоімунний розлад в результаті активації зрілих Т-клітин, які виділяють цитокіни, що індукують судинні зміни та модифікацію кератиноцитів, а також збільшення проліферації та зниження дозрівання клітин [107].

Патогістологічне дослідження є найбільш поширеною діагностичною процедурою для діагностики псоріазу та підтвердження діагнозу. Мікроскопічні ознаки псоріазу: епідермальна гіперплазія (регулярний акантоз з рівномірним подовженням дермальних валиків); у дермі спостерігаються розширені звивисті судини з набряком сосочків і змішаним нейтрофільним мононуклеарним інфільтратом (мікроабсцеси Манро); запальний інфільтрат лейкоцитів, переважно в дермі [70, 97, 146, 124]. Значне зменшення або відсутність зернистого шару, витончення м'язового шару на сосочком шкіри, розширення або зміщення телеангіектазій та інфільтрацією лімфоцитів і нейтрофілів навколо ділянки ураження [59].

1.2 Фармакотерапевтична корекція псоріазу: аналіз сучасних лікарських засобів

Лікування псоріазу залишається складним завданням, і потребує індивідуального підходу та комплексної терапії. Вибір оптимального методу терапії залежить від клінічної форми та тяжкості захворювання, від ефективності попередніх схем лікування, супутніх захворювань, та уподобань пацієнта, такі як вартість та зручність застосування [93, 103]. Для лікування псоріазу використовують місцеву та системну терапію. Досягнення терапевтичного ефекту за допомогою комбінації топічної та системної терапії сприяє взаємному потенціюванню та доповненню їх лікувального ефекту. Більшість клінічних випадків псоріазу піддаються лікуванню за допомогою місцевих методів терапії [45, 73].

Поглиблене розуміння патофізіології псоріазу сприяло розробці високоефективних та патогенетично обґрунтованих методів лікування. Лікування псоріазу включає: топічні та системні препарати, фототерапію, різні допоміжні засоби, зволожуючі креми та зниження факторів стресу [17, 33, 47]. За даними досліджень, стрес є суттєвим фактором, що може загострити або навіть викликати псоріатичне ураження шкіри. Для лікування псоріазу використовують наступні групи лікарських засобів: місцеві кортикостероїди (бетаметазон, мометазон), кератолітичні засоби (саліцилова кислота, сечовина) використання їх може сприяти більш прямому контакту стероїдів із шкірою, аналоги вітаміну D (наприклад кальцитріолова мазь, кальципотріол), інгібітори кальципоневрину (такролімус, пімекролімус), місцеві ретиноїди (тазаротен водний гель і крем 0,05 % і 0,1 %), антиметаболіти (метотрексат), імуномодулятори (такролімус місцево 0,1 %, циклоспорин, алефасепт, устекінумаб), інгібітори фосфодіестерази-4 (апреміласт, рофлуміласт), інгібітори TNF- α (інфліксимаб, етанерцепт, адаліумаб, цертолізумаб), інгібітори IL-12/IL-23 (устекінумаб), інгібітори IL-17 (секукінумаб, іксекізумаб, бродалумаб), інгібітори IL-23 (гуселкумаб, тілдракізумаб) [13, 26, 53, 71, 91, 93, 105, 120].

Першою лінією для топічного лікування псоріазу є глюкокортикостероїди, у вигляді різних лікарських формах: мазі, креми, піни, спреї або лосьйони [43, 150]. Мазі є найбільш ефективною формою, адже їх здатність утворювати оклюзію сприяє кращому проникненню кортикостероїдів у шкіру. Вони також найефективніші для дуже сухих ділянок ураженої шкіри. Креми поступаються мазям в ефективності, але вони менш жирні і тому краще переносяться пацієнтами. Лосьйони та розчини, що являють собою рідкі суміші, найкраще підходять для нанесення на волосяні ділянки, наприклад на шкіру голови. Гелі часто являють собою суміші на основі спирту або ацетону, добре проникають, але можуть сушити шкіру; вони також ефективні на волосяних ділянках [33, 153, 159]. Для кортикостероїдів характерна імуномодуюча, антимітотична, судинозвужувальна, апоптотична, протизапальна, гліюконеогенна активність. Топічні кортикостероїди проявляють протизапальну дію за рахунок пригнічення синтезу медіаторів запалення в шкірі та зменшення проникності судин [50]. Зокрема, відбувається інгібування фосфоліпази A2 та запальних факторів транскрипції, таких як NF- κ B [3]. За рахунок збільшення ліпокортину, ендогенного білка, та зменшення мітозу клітин епідермісу, пригнічення проліферації клітин і синтезу колагену проявляється антимітотичний ефект місцевих кортикостероїдів у лікуванні псоріазу. Імуносупресивні ефекти топічних кортикостероїдів включають інгібування гуморальних факторів, що беруть участь у запальній реакції та міграції лейкоцитів до вогнища запалення, а також пригнічення дозрівання, диференціації та проліферації всіх імунних клітин. Основною перевагою топічних кортикостероїдів є швидкість досягнення бажаного ефекту, порівняно низька вартість препаратів. Суттєвим недоліком топічних кортикостероїдів є відомі місцеві та загальні побічні ефекти: підвищений ризик атрофії шкіри (особливо на обличчі), стрії, телеангіектазії, глаукома, катаракта, пригнічення функції надниркових залоз, розвиток тахіфілаксії, ризик розвитку опортуністичних інфекцій (*Candida spp.*, цитомегаловірус та ін.) [44, 152]. Ризик розвитку побічних ефектів зростає зі збільшенням активності кортикостероїду та тривалістю його застосування. Немає доказів того, що при тривалому застосуванні місцевих

кортикостероїдів з часом виникає тахіфілаксія. Проте відміна кортикостероїдів (тобто звикання до кортикостероїдів) може виникнути після припинення їх тривалого застосування на обличчі та статевих органах, викликаючи еритему, лущення, поколювання, печіння, папули, пустули та набряк. Використання топічних кортикостероїдів на більше ніж 10 % площі тіла не рекомендується, через підвищений ризик системної абсорбції [5, 102, 152].

Використання аналогів вітаміну D (кальцитріол, кальципотрієн) патогенетично обґрунтований та ефективний метод лікування псоріазу [122, 138]. Їх дія полягає не лише у антипроліферативній дії, а й у стимуляції диференціації кератиноцитів, регулюють вивільнення прозапальних цитокінів [22, 87]. Препарати цієї групи взаємодіють зі специфічними рецепторами в клітинах-мішенях шкіри. Їх вплив є вибірконим і залежить від ступеня диференціації кератиноцитів [87, 149]. Аналоги вітаміну D гальмують розмноження недиференційованих кератиноцитів, але при повільній проліферації вони стимулюють ріст диференційованих кератиноцитів [5, 44, 102, 142]. Аналоги вітаміну D відносно безпечні з незначною кількістю побічних ефектів. Найпоширенішим несприятливим ефектом є подразнення шкіри на псоріазних бляшках або навколо них. Особливо схильні до роздратування обличчя та міжшкірні ділянки. Кальцитріол має кращу переносимість на чутливих ділянках порівняно з кальципотрієном, тому є кращими варіантами для цих ділянок [148].

Тазаротен, похідне вітаміну A, перший синтетично розроблений ретиноїд схвалений FDA для лікування псоріазу. Випускається у вигляді гелю або крему в концентрації 0,1 % або 0,05 %. Зовнішнє застосування ретиноїдів обмежене низькою ефективністю та недостатньо досліджені. Механізм їх дії спрямований на всі патогенетичні ланки розвитку псоріазу, вибірково зв'язується з β - та γ -ретиноєвою кислотою на клітинній мембрані кератиноцитів і потім транспортується до ядра, змінюючи транскрипцію генів у кератиноцитах [123, 148]. Це призводить до пригнічення запалення, нормалізації проліферації і диференціації кератиноцитів [41]. На даний момент топічні ретиноїди в основному

використовують у поєднанні із топічними кортикостероїдами (клобетазолу пропіонат 0,01 % + тазаротена 0,045 %) або з кальципотріолом [44].

Топічні інгібітори кальциневрина (0,03 % та 0,1 % мазь такролімусова, 1 % крем пімекролімус) мають виражену протизапальну дію і не мають побічних ефектів, характерних для топічних стероїдів. Механізм дії інгібіторів кальциневрина полягає в пригніченні синтезу протизапальних цитокінів. У цитоплазмі клітин-мішеней пімекролімус і такролімус зв'язуються з внутрішньоклітинним білком макрофіліном-12, також відомим як FKBP (білок, що зв'язує FK506). Імуносупресивна активність є результатом пригнічення активності кальциневрина, залежного від кальцію і кальмодуліну. Протизапальна активність реалізується через активність Т-допоміжних клітин, які впливають на синтез та вивільнення протизапальних цитокінів, і блокування транскрипції цитокінів Th1 і Th2, залежних від інтерлейкінів (IL-2, IL-3, IL-4, IL-5), інтерферону γ , фактора некрозу пухлини α (TNF- α). Такролімус і пімекролімус інгібують активацію тучних клітин і нейтрофілів та вивільнення медіаторів запалення. Такролімус впливає на функцію базофілів і еозинофілів, а також на функцію та індукцію апоптозу клітин Лангерганса. Топічні інгібітори кальциневрина використовуються, коли використання топічних глюкокортикостероїдів та комбінованих препаратів обмежено обличчям, шиєю, вушними раковинами, ділянкою статевих органів, складками. Тривалість використання препаратів – 4–6 місяців [5].

Кератолітичні препарати сприяють зменшенню лущення та гіперкератозу, викликають розм'якшення та десквамацію рогового шару. Вони дуже ефективні при дуже товстих та лускатих псоріатичних бляшках [122, 159]. До кератолітичних препаратів відносяться засоби, що містять в різній концентрації саліцилову кислоту (1–5 %), молочну кислоту (5–12 %), сечовину (2–30 %). Основний механізм дії залежить від відсоткового складу: кератолітики у високих концентраціях призводять, передусім, до відшарування та пом'якшення, у більш низьких концентраціях – зволоження, відновлення еластичності у вогнищах ураження, що обумовлює симптоматичну дію цих препаратів при псоріазі [118]. Традиційним місцевим кератолітиком є саліцилова кислота. В концентрації 2–3 % проявляє

антисептичну, протизапальну, кератопластичну дію, а в концентрації більше 5 % – кератолітичну дію. Кератолітичний ефект пов'язаний зі зменшенням сили зчеплення між епідермальними клітинами, підвищенням гідратації кератину. Саліцилова кислота легко проникає в шкіру, а 1–2 % саліцилова кислота в поєднанні з іншими лікарськими засобами посилює їх адсорбцію. Широко використовується в практиці в складі лосьйонів, кремів і мазей самотійно або в комбінації з іншими препаратами. 2 % саліцилова кислота показана при прогресуючій стадії псоріазу, засоби з вищою концентрацією саліцилової кислоти 3–5 % – при стаціонарній і регресуючій стадіях можливе [44, 87, 148].

Використання препаратів з сечовиною сприяє збільшенню гідратації рогового шару та його здатності утримувати воду, а також зменшує трансепідермальну втрату води, свербіж, лущення та гіперкератоз у пацієнтів з псоріазом [122]. Сечовина відіграє важливу роль у регулюванні проліферації кератиноцитів, бар'єрній функції шкіри та антимікробному захисті. У низьких концентраціях (2–10 %) сечовина показана для зволоження, сприяє транспортуванню через шкіру та нігті глюкокортикостероїди, протигрибкові засоби. Висока концентрація сечовини (10–50 %) може бути використана для лікування гіперкератотичних бляшок псоріазу [66].

Препарати дьогтю, кам'яновугільний дьоготь, використовуються для лікування псоріазу як монотерапія, а також у поєднанні з УФБ-фототерапією, топічними кортикостероїдами. Дьоготь має кератопластичну, антисептичну, антипаразитарну, судинозвужувальну, знеболювальну, протизапальну, протисвербіжну види дії. Суттєвим недоліком препаратів дьогтю є специфічний запах, подразнення непошкодженої шкіри по периферії вогнищ, розвиток сухості та тріщин, що вимагає додаткового застосування засобів, які зволожують та пом'якшують шкіру, поява акнеформних висипань на здоровій шкірі та у виняткових випадках при тривалому застосуванні канцерогенний ефект [5, 44].

Використання емоментів як допоміжних засобів до місцевих та системних препаратів з метою пом'якшення ураженої шкіри, зменшують лущення, усувають свербіж та тріщини. Вони сприяють розм'якшенню гіперкератичних лусочок для

покращення проникнення інших препаратів. Використання емоментів попереджає трансепідермальній втраті води, завдяки зволоженню рогового шару [5, 148]. Зволожуючі засоби випускаються у різних формах: креми, мазі, лосьйони, ванні олії та мило-замінники. Креми та мазі в порівнянні з лосьйоном, як правило більш ефективніші. Завдяки щільній текстурі та вищим оклюзивним властивостям вони краще звожують шкіру [159]. Мазі краще підходять для дуже сухої, потовщеної та ламкої шкіри і можуть використовуватися вночі. Для денного використання краще підходять більш легкі, менш жирні креми чи лосьйони. Найбільш поширеними емоентами є вазелін, рідкий парафін та мінеральні олії [148].

У травні 2022 р. FDA був схвалений новий препарат для місцевого лікування бляшкового псоріазу – 1 %, крем Тапінароф (Tapiarof) у дорослих віком від 18 років (Vtama, Dermavant Sciences). Тапінароф – нестероїдний препарат для місцевого застосування, є агоністом арил-вуглеводневих рецепторів. У псоріатичній шкірі арил-вуглеводневий рецептор присутній у шкірних бляшках і регулює запальну реакцію, а також кінцеву диференціацію кератиноцитів і Т-лімфоцитів. Тапінароф специфічно зв'язується і активує ці рецептори, ліганд-залежний фактор транскрипції, що призводить до пригнічення прозапальних цитокінів, включаючи IL-17, IL-22, та експресії білків шкірного бар'єра, пов'язаних з диференціацією кератиноцитів, включаючи філаггрін та лорикрин, таким чином сприяючи нормалізації шкірного бар'єра. Рекомендується наносити його безпосередньо на псоріатичні бляшки та обережно масажувати до повного всмоктування. Наносити щоденно, вранці, тривалість курсу складає 4–12 тижнів [42, 67, 111].

Для системної терапії середньої та тяжкої форми псоріазу використовують метотрексат, циклоспорин А.

Метотрексат є аналогом фолієвої кислоти, впливає на метаболізм фолієвої кислоти, шляхом конкурентного гальмування ферменту дигідрофолатредуктази блокує біосинтез пурину і далі деактивує фолієву кислоту. Чинить протизапальну, антипроліферативну та імуносупресивну дію [35, 123]. Більшість лікарів призначають одну тижневу пероральну дозу; зазвичай починають з низької дози,

щоб зменшити побічні ефекти, а потім її поступово збільшують для досягнення ефективності [104]. Початкова рекомендована доза 7,5–10 мг/тиждень може бути збільшена до максимуму 25 мг/тиждень. Метотрексат можна вводити перорально, внутрішньовенно, внутрішньом'язево або підшкірно [35]. Метотрексат має гепатотоксичну дію, може викликати мієлосупресію, що призводить до розвитку інфекційних та лімфопроліферативних захворювань [20, 124].

Циклоспорин – імунодепресант, що пригнічує Т-клітини, з групи інгібіторів кальциневрина [29, 135]. Механізм його дії полягає в інгібуванні кальциневрина, що призводить до зниження ІЛ-2. Циклоспорин ефективний як індуктор ремісії при псоріазі та як підтримуюча терапія протягом двох років. Потенційні побічні реакції: артеріальна гіпертензія, ниркова токсичність, немеланомний рак шкіри [124].

Але при їх використанні виникають небажані побічні реакції і це потребує постійного лабораторного та клінічного моніторингу протягом всього курсу лікування. Часті протипоказання до застосування системних препаратів: захворювання печінки та нирок, анемія, гіпертонічна хвороба, гепатит В, С, активний туберкульоз, онкологічні захворювання, планування вагітності, дитячий або старечий вік, зловживання алкоголем.

Генно-інженерні біологічні препарати, інгібітори фактора некрозу пухлини- α (TNF- α) (адаліумаб, етанерцепт, цертолізумаб пегол, інфліксімаб), ІЛ-12/23 (устекінумаб), ІЛ-17А (секукінумаб, іксекізумаб), ІЛ-17R (бродалумаб) та ІЛ-23p19 (гуселкумаб, різанкізумаб, тілдракізумаб), що чинять імуносупресивну дію, селективно блокують певні прозапальні цитокіни [123]. Використання даної групи препаратів може підвищити ризик розвитку інфекцій, включаючи опортуністичні захворювання та реактивацію латентного туберкульозу, погіршення перебігу демієлінізуючих захворювань, розвиток застійної серцевої недостатності [109, 137]. Огляд літератури свідчить про наявність значної доказової бази щодо ефективності нових системних методів терапії із застосуванням біологічним препаратів. Однак висока вартість цих препаратів залишається основним чинником, що унеможлиблює для більшості пацієнтів доступ до такого виду терапії.

Незважаючи на хороший терапевтичний ефект традиційних топічних дерматологічних засобів, вони мають недоліки: специфічний запах, забруднення одягу, обмежену зручність застосування та видалення зі шкіри, що при сучасному темпі життя та високих вимогах до косметичних характеристик лікувального засобу все частіше призводить до відмови від їх використання. Основні вимоги до засобів для догляду за шкірою при псоріазі: достатнє зволоження шкіри, нейтральний запах, зручність у використанні, не подразнює шкіру та не забруднює одяг. Таким чином, пошук нових, більш ефективних та зручних методів лікування псоріазу залишається актуальним завданням.

1.3 Роль фосфодіестерази 4 типу (ФДЕ4) у патогенезі та лікуванні псоріазу

Одним із шляхів виникнення запальної реакції при псоріатичному ураженні шкіри є активація циклічного аденозинмонофосфату (цАМФ), внутрішньоклітинного вторинного білка, що відіграє ключову роль в патогенезі захворювання [52, 128]. ФДЕ4 проявляється, як внутрішньоклітинний нерцепторний фермент, присутній в кератиноцитах, нейтрофілах, клітинах Лангерганса та Т-клітинах, модулює запалення та цілісність епітелію [89]. Потенційне терапевтичне використання інгібіторів ФДЕ4 при бляшковому псоріазі базується на визнаній внутрішньоклітинній ролі ФДЕ4 у кератиноцитах. Лейкоцити, що циркулюють у пацієнтів з псоріазом, мають активність ФДЕ4, яка була пов'язана з більшою продукцією прозапальних медіаторів і меншою продукцією протизапального медіатора IL-10, частково через гідролізацію цАМФ. Пригнічення активності ферменту ФДЕ4 призводить до підвищення вмісту цАМФ – вторинного посередника, що поширює внутрішньоклітинний сигнал [39, 106]. Молекули цАМФ зв'язуються з каталітичними субодинами внутрішньоклітинного ферменту протеїнкінази А, який викликає фосфорилювання транскрипційних факторів, що відповідають за регуляцію запальної відповіді [49, 89]. Каскад фосфорилюючих реакцій призводить до дезактивації нуклеарного

фактора каппа В та пригнічення продукції $\text{TNF-}\alpha$, IL-12, IL-17, IL-22, IL-23 та інших прозапальних цитокінів, що відповідають за підтримку запального процесу [89, 123]. Зниження рівня цАМФ, призводить до посилення транскрипції численних цитокінів, прискорюючи низку внутрішньоклітинних функцій, які беруть участь у гострому та хронічному запаленні.

Для зменшення системного впливу місцевий інгібітор ФДЕ4 з невеликою трансдермальною біодоступністю може бути клінічно вигідним, оскільки системне лікування препаратами цього класу досі було скомпрометовано значною частотою пов'язаних із їх механізмом побічних реакцій, особливо шлунково-кишкового дискомфорту та головного болю. Таким чином, багатообіцяючим є те, що низька молекулярна маса інгібіторів ФДЕ4 забезпечує відмінне проникнення через шкіру, та дослідження безпеки показали мінімальне системне поглинання. В даний час існує кілька досліджень, які досліджують 5 різних інгібіторів ФДЕ4 для місцевого застосування.

Для лікування псоріазу в 2022 р. Food and Drug Administration (FDA, регуляторний орган США) було затверджено два нових препарати для системного та топічного застосування. Апреміласт новий системний низькомолекулярний препарат синтетичного походження, селективний інгібітор ФДЕ4, з внутрішньоклітинним механізмом дії [52]. Апреміласт селективно пригнічує ФДЕ4, фермент, який експресується дендритними клітинами, Т-лімфоцитами, макрофагами і моноцитами. Апреміласт призводить до накопичення внутрішньоклітинного цАМФ. Збільшення вмісту цАМФ в клітинах, супроводжується пригніченням синтезу багатьох прозапальних цитокінів, в тому числі фактора некрозу пухлини- α ($\text{TNF-}\alpha$), IL- γ , IL – 12, 17, 22, 23 та хемокінів (CXCL9, CXCL10, CCL4), що задіяні в патогенезі псоріазу [52, 108]. Одночасно з блокуванням ФДЕ4 апреміласт підвищує вироблення протизапальних медіаторів, включаючи IL-10, що забезпечує зменшення клітинної інфільтрації в шкірі. Таким чином, завдяки дії апреміласту відбувається блокування розвитку запального каскаду на початковому етапі та регуляція продукції компонентів запальної відповіді. З'являється можливість регулювати спектр прозапальних та

протизапальних цитокінів, комплексно діє на системне запалення, що виникає при псоріазі [134].

Апреміласт схвалений до застосування у пацієнтів із середньою та тяжкою формою псоріазу в дорослих при недостатній дії або наявності протипоказань до інших базисних протизапальних препаратів, включаючи метотрексат та циклоспорин, або лікарські засоби, що використовуються разом з ультрафіолетовим А-опроміненням, а також при непереносимості або протипоказаннях до застосування біологічної терапії [54, 55, 127].

У липні 2022 р. був схвалений FDA новий топічний селективний інгібітор ФДЕ4 – Рофлуміласт крем 0,3 % [40, 154]. Механізм дії цього препарату полягає в інгібуванні внутрішньоклітинного ферменту ФДЕ4, що призводить до підвищення внутрішньоклітинних рівнів цАМФ, сигнальної молекули, яка опосередковує біологічні відповіді на позаклітинні подразники. Одним із наступних ефектів цАМФ є індукція прозапальних медіаторів, таких як TNF- α , IFN- γ , IL-17 та IL-23 [114]. Псоріатична шкіра має більшу активність ФДЕ4, отже, рофлуміласт буде знижувати регуляцію цих прозапальних медіаторів [39, 119, 129]. Показаний для лікування бляшкового псоріазу на всіх ділянках тіла [154].

1.4 Обґрунтування застосування ЛЗ на основі нафтопродуктів в терапії псоріазу. Акцент на ефективність та недоліки

Людство з давніх часів широко використовувало природні ресурси в народній медицині для лікування дерматологічних захворювань. Ранні згадки про використання нафталанової нафти у лікувальних цілях можна знайти у творах Нізамі Гянджеві (1141–1201). Він описував у своїх поемах про те, як каравани верблюдів перевозили в бурдюках змішану з піском нафту через гори та пустелі до інших країн з селища Сафі-Кюрд, розташованого в 15 км від сучасного міста Нафталан [79-81, 125, 143, 157]. Завдяки своєму унікальному складу нафталанова нафта з давніх часів застосовувалася як лікувальний засіб для лікування різноманітних захворювань, в різних видах терапії: бальнеотерапія, шкірні

аплікації. У другій половині XIX століття в періодичній медичній літературі почали з'являтися статті про лікування нафталановою нафтою екземи, сверблячки, псоріазу, опіків та інших уражень шкіри. Використання нативного нафталану, циклоаліфатичного маслянистого вуглеводню, як поверхнево-активну складову в основах мазей і при виготовленні ліків, враховуючи його всмоктуваність, що сприяла більш швидкому проникненню лікувальних препаратів в епідерміс [1, 2, 81]. Багато лікарів того часу не лише вважали нафталанову нафту лікувальним засобом, але й рекомендували застосовувати її в косметологічних цілях для пом'якшення шкіри обличчя та розгладження зморшок. У 1902 р. використовували косметологічну продукцію (маски та креми) з нафталаном в найкращих косметологічних салонах Парижа [80].

Нафталанова нафта являється єдиною в світі лікувальною нафтою, завдяки своєму унікальному бальнеологічному фактору, якому немає рівних в світі як за фізико-хімічними, біологічними особливостями, так і за лікувальними властивостями [1, 143]. З 1898 р. нафталанова нафта була визнана офіційною медициною і стала ефективним природним джерелом біологічно активних речовин як для бальнеології, так і для фармацевтичної хімії [157]. Згідно із встановленими критеріями, лише верхня частина геологічного розрізу відкладень основної нафтоносної товщі Нафталанського родовища майкопської свити насичена лікувальною нафтою [64, 166]. У нижній її частині залягає легка промислова нафта, що відрізняється своїми властивостями від лікувальної нафталанської нафти [2].

Нафталан – це природний продукт з нафти (місце видобування м. Нафталан, Азербайджан), густої сиропоподібної консистенції, буро-коричневого кольору з ароматичним запахом, по зовнішньому вигляду майже не відрізняється від інших видів нафти і наближається до тяжких смолистих нафт [2, 64, 81, 143, 166]. Нафталанова нафта – це сильно смолиста, малосірчаниста, безпарафінова нафта, у ній відсутні бензинові фракції та в незначній кількості наявний лігроїновий компонент і вона немає горючих властивостей [80, 125, 143, 157]. За своїми фізико-хімічними особливостями суттєво відрізняється від звичайних промислових видів нафт, а саме: у дисперсності, розмірі діаметра частинок, коефіцієнті дифузії та

залежності даних параметрів від температури, різним вуглеводним вмістом, природою наноклоїдів нафти [6–9]. Нафталанова нафта являє собою складну суміш природних геогенних сполук, що не розклалися. В її складі наявні наступні сполуки та суміші речовин: нафтеніві вуглеводні та кислоти, смолисті речовини та сполуки, вуглеводні з ароматичними фрагментами, а також сполуки на основі марганцю, азоту, цинку, міді, бору, літію, бромю, йоду та інших елементів періодичної таблиці. За даними багаточисельних досліджень встановлено, що насичені компоненти нафталанової нафти представлені в основному нафтеновими вуглеводнями [6–9, 64, 96, 125]. Нафталан складається із різних вуглеводнів: нафтенових (від 50 % до 60 %), ароматичних (31 %). В його складі також присутні смоли (14 %), нафтеніві кислоти (від 0,5 % до 1 %), азотисті основи (до 0,3 %), вода 10–15 % [166]. Критеріями оцінки терапевтичних властивостей нафталанової нафти слугували її фізико-хімічні характеристики. Зокрема, вивчалася важка нафта з щільністю ρ_{420} в межах 0,927–0,960 г/см³, яка традиційно застосовувалася й проходила спеціалізовані клінічні дослідження в нативному вигляді ще в 30-х роках XX століття [2].

У складі нафталанової нафти відсутні легкі фракції, наявні нафтеніві, ароматичні вуглеводні у великій кількості. За рахунок наявності в її складі ароматичних вуглеводнів та смолистих речовин, зумовлює її токсичну дію [143].

За результатами багатьох досліджень встановлено, що нафтеніві вуглеводні є найбільш біологічно активними компонентами і наділяють нафталанову нафту позитивними лікувальними властивостями [157, 166]. Нафтеніві вуглеводні нетоксичні та не мають канцерогенних і тератогенних властивостей. При детальному дослідженні нафталанської нафти було встановлено, що вміст у ній поліциклічних нафтенових вуглеводнів досить високий [7, 80, 81]. Серед них особливо виділялися вуглеводні, що є похідними циклопентанопергідрофенантрени, з яких переважно складаються окремі фракції. За даними досліджень Ю.Г. Мамедалієва в окремих фракціях нафтенів нафталанової нафти містяться поліциклічні вуглеводні з 4 та 5 циклами в молекулі, по структурі аналогічні або близькі до структури

циклопентанопергідрофенантрону, що є складовою частиною багатьох важливих для організму речовин, та забезпечують біологічну активність нафталанової нафти [143]. Структура циклопентанопергідрофенантрону нафти дуже схожа із структурою ядра деяких ендокринних препаратів, вітамінів, біоактивних речовин – кортизону, АКТГ та ін. стероїдних гормонів [6, 7, 9, 143]. У літературі наявні дані по вивченню гормоноподібної дії нафталанової нафти на організм, в бітуміозних речовинах (вугілля, нафта) містяться естрогенні початки, які схожі на біологічні властивості з фолікулярним гормоном, науковці припускають, що нафталанова нафта містить подібні речовини [143]. Були опубліковані дані про наявність вітаміну К і гормоноподібних речовин в нафталані, що становить суттєвий інтерес до подальших досліджень [6, 143].

У науковій літературі зазначається, що лікувальні властивості в нафталановій нафті проявляються за наявності в ній поліциклічних нафтенових вуглеводнів з боковими ланцюгами [1, 2]. Поступово очищуючи нафталанову нафту від асфальтенів, ароматичних вуглеводнів, смол, він виявив, що після кожного очищення лікувальні властивості збільшуються і зменшуються побічні ефекти, в тому числі токсичні [9]. За даними літератури доведено, що знесмолений нафталан, деякі важкі фракції і особливо нафтові вуглеводні нафталану являються препаратами більш ефективними в порівнянні з нативним нафталаном. У них відсутні смоли, асфальтени і менше токсичних баластних речовин. Азотисті речовини нафталанової нафти мають судинорозширювальну активність [80, 143]. Багатьма спеціалістами-дослідниками було виявлено, що під дією нафталанової нафти розширюються судини, підвищується проникність шкіри, посилюється функція залоз внутрішньої секреції, спостерігається резорбтивна, протизапальна та болезаспокійлива види дії [1, 2].

Особливості хімічного складу нафтенових вуглеводнів нафталанської нафти зумовлюють універсальність та різноманітність її лікувальної дії. Цю дію викликає не якийсь один тип вуглеводнів (наприклад, циклопентанопергідрофенантренової структури, як вважалося раніше), а сукупність різних сполук нафтового характеру, присутніх у нафті. До них можуть бути віднесені як стеранові, так і

тритерпанові вуглеводні, а також вуглеводні місткового типу сполучення. У складі нафталанської нафти містяться численні вуглеводні, та їх поєднання в окремих фракціях, а також природою азот- і сірковмісних з'єднань і нафтових кислот, що наділяють її особливими властивостями [7-9].

За даними літератури, при дослідженні різних видів нафти в нафталановій нафті найбільший вміст поліциклічних вуглеводнів, не знайдено твердих парафінів та мінімальний вміст ізорапафінових та максимальний вміст біциклічних нафтових структур. У своєму складі нафталанова нафта містить 98 % поліциклічних нафтових вуглеводнів з короткими боковими ланцюгами, циклоалканоаренів і достатньо низький вміст ізопарафінових вуглеводнів (2 %) [80, 7]. Формування нафталанової нафти відбувалося під впливом глинистих порід, що зумовило її унікальний склад. У структурі переважають специфічні циклічні вуглеводні, зокрема похідні дриману, адамантани та перегруповані стерани. Саме ця особливість забезпечує високий рівень біологічної активності та надає їй лікувальні властивості. Вважається, що наявність стеранів у складі нафти відіграє ключову роль у її терапевтичному ефекті.

Згідно з літературними джерелами, клінічні, лабораторні та експериментальні дані частково пояснюють механізм біологічного впливу нафталанової нафти на організм людини та тварин, а також розкривають суть її терапевтичної дії. Важливо зазначити, що цей вплив супроводжується значними й різноплановими функціональними та морфологічними змінами в організмі. Нафталанова нафта спричиняє фізико-хімічні зміни в тканинах і порушення обміну речовин (білкового, вуглеводного, мінерального, водно-сольового, пігментного), які впливають на кровотворення, а також на функціонування серцево-судинної, дихальної, ендокринної, імунної та інших систем організму [64].

Аналіз бібліографічних матеріалів показав, що ця нафта є цінним бальнеологічним фактором при лікуванні підгострих або хронічних форм екземи, нейродерміта і псоріазу, фективність нафталанотерапії залежить від давності і тяжкості захворювання. Протипоказане лікування цією нафтою шкірних захворювань, що супроводжуються гостро-запальним процесом. Особливістю дії

нафталанової нафти при нашкірному нанесенні вважалося зменшення напруженості та больових відчуттів та порівняно швидка ліквідація патологічного процесу [1, 2, 7-9, 80]. При нанесенні на шкіру нафталанської нафти та мазі з неї не виникає подразнення, розширюються шкірні капіляри (почервоніння в місці нанесення), що призводить до розсмоктування запальних ділянок, при свербіжі та опіках проявляють болезаспокійливу дію [1, 80, 81].

При шкірних захворюваннях: екземі, псоріазі, корості, склеродермії, іхтіозі, себорей, грибкових захворюваннях шкіри, рожі, фурункулах, опіках, варикозних виразках, ударах, ранах, розтягненнях, укусах комах дослідники відмічали хороших лікувальний ефект від використання нафталанової мазі [65, 80, 143]. За даними літератури знесмолений нафталан і нафтеніві вуглеводні при топичному нанесенні позитивно впливають на запальний процес в шкірі – зменшуючи його, шкіра стає м'якою та еластичною, зменшується свербіж, біль, пришвидшується загоєння ран. Ці препарати нетоксичні та не викликають побічних реакцій. Протизапальна дія настає швидко при застосуванні нафтенівіх вуглеводнів [80, 81, 125].

Вплив компонентів нафталанової нафти на шкірні покриви залежить від дози нафти, площі та місця нанесення, тривалості дії, а також від реакції організму на інші фактори. Нашкірне змащування великими дозами нафталанової нафти може спричинити порушення функцій печінки та підшлункової залози [2].

Під дією нафталану активуються протеолітичні ферменти, посилюється дезоксирибонуклеїнопротеїновий обмін у всіх тканинних компонентах аплікованої шкіри, і в першу чергу, в епітеліальних і сполучно-тканинних структурах. В тканинних структурах шкіри вміст РНК і ДНК підвищується по мірі збільшення кратності нанесення нафталанових аплікацій [1, 2, 6-9, 58, 80, 81, 125]. При гістохімічних дослідженнях гомогенатів шкіри відбувається різке посилення інтенсивності Фельген-реакції в ядерних субстанціях і помітне збільшення ступеня піронінофілії цитоплазми епітеліальних та дермальних клітинних елементів з одночасним посиленням в них активності ферментів метаболізму нуклеїнових кислот та їх попередників (5-нуклеотидаза, дегідрогенази глюкозо-6-фосфату та 6-

фосфоглюконату, ДНК-залежна РНК-полімераза). Після закінчення нанесення нафталанової нафти на шкіру біо- та гістохімічні параметри вирівнюються до початкового рівня. Ці дані свідчать про те, що дія нафталана пов'язана із збільшенням біосинтезу нуклеїнових кислот в тканинах шкіри [1, 2, 6–9, 166]. Крім, вище сказаного можна відмітити, що нафталан як неспецифічний подразник, викликає певні запальні процеси, проявляє цитотоксичну дію, внаслідок чого вивільняються продукти клітинного розпаду та деградації нуклеїнових кислот, які власне і є стимуляторами антитілоутворення та факторами формування стійких форм клітин. Таким чином, узагальнюючи всі ці дані, ендogenous речовини, що утворюються під дією нафталану із клітинних та тканинних елементів, активують імуногенез і сприяють загальній фізіологічній перебудові організму, і тим самим створюють сприятливі умови для ліквідації патологічних процесів [58, 64].

Очищене нафталанове масло – це високоочищена загальна фракція нафтових вуглеводнів, отримана із нафталанської нафти, субстанція прозорого кольору, із слабким характерним запахом. Має анальгезуючу, протизапальну, десенсибілізуючу, ангіопротекторну активність. Масло виявляє вазодилатуючу дію, стимулює регенерацію та пригнічує запальний процес при дерматологічних захворюваннях, стимулює зворотній розвиток та розсмоктування псоріатичних уражень [80, 81].

Нафталанове масло застосовувалося як самостійний дерматологічний лікарський засіб, так і як допоміжна речовина для виготовлення мазей комбінованого складу. Нафталанове масло добре проходить крізь шари шкіри, особливо під дією інфрачервоного спектру світла та фонофорезу. Використання нафталанового масла як допоміжної речовини в лікарських засобах, сприяє покращеному проникненню діючої речовини (активному фармацевтичному інгредієнту (АФІ)) в шкіру. Мазі виготовлені на нафталановій або вазеліновій основі, обумовлюють різну проникність шкіри [80]. Топічні засоби з використанням нафталанового масла збільшують трансдермальну доставку АФІ незрівнянно в більшій мірі, ніж засоби на вазеліновій основі. Покращення проникності в шкіру АФІ за допомогою нафталанового масла має велике значення,

лікарські речовини легко проникають всередину клітин і здійснюють терапевтичну дію. Нафталанова нафта являється прекрасною допоміжною речовиною для мазей, вона добре з'єднується з іншими основами рослинного та мінерального походження.

У складі неочищеного нафталанового масла наявні токсичні компоненти такі, як ароматичні вуглеводні, смоли, асфальтени, що робить її не придатною для безпосереднього застосування при лікуванні хронічних дерматологічних захворюваннях та потребує очищення від цих токсичних сполук. Серед головних недоліків застарілих засобів з неочищеним нафталановим маслом можна виділити наступні: високі ризики канцерогенної дії; здатність всмоктуватися та виявляти системні токсичні реакції (гепатотоксичність, нефротоксичність тощо); обмежена ефективність; забруднення білизни та одягу; неприємні органолептичні властивості. Очищене нафталанове масло отримують шляхом ретельного очищення неочищеного нафталанового масла в кілька етапів: зневоднення та знесолення; знесмолення з отриманням очищеного (рафінованого) нафталану; процес деароматизації [81]. Вважається, що після очищення нафталанового масла збільшуються лікувальні властивості та зменшуються побічні ефекти, в тому числі токсичні, канцерогенні, алергогенні. Очищене нафталанове масло має ряд переваг перед неочищеним нафталановим маслом. У нього відсутній запах, забарвлення та токсичні фракції, що робить його більш безпечним для застосування. За рахунок високої концентрації поліциклічних нафтенових вуглеводнів у складі очищеного нафталанового масла це сприяє лікувальним ефектам, зокрема покращені протизапальні властивості (стероїдоподібні) за рахунок стероїдоподібних ефектів гопанів та стеранів [7]. Очищене нафталанове масло не забруднює постільну білизну та одяг [81].

Препарати нафталанської нафти проявляють протизапальну, пом'якшувальну, відшаровувальну, антисептичну, кератолітичну, знеболювальну та регенеруючу дії. В малих концентраціях вони мають кератопластичну активність, а у більш високих (5–10 %) – ексfolіативну активність. Завдяки розширенню судин препарат виявляє розчинну дію, сприяючи швидкому

розчиненню вогнищ інфільтрації. Протизапальний ефект підтримується здатністю препарату стимулювати вироблення глюкокортикостероїдів корою надниркових залоз. Недоліком цієї нафти є специфічний запах та колір. При псоріазі ефективно використання 10–30 % нафталанової мазі чи пасти, 1–2 р/д на шкірне нанесення [7].

За даними проведених досліджень [81] автори відзначають, що 3 тижнева терапія нафталаном призвела до статистично значущого зниження індексу PASI у 28 пацієнтів з псоріазом легкого та середнього ступеня. Результати дослідження свідчать про наявність антипроліферативної активності нафталану на іморталізованих кератиноцитах та підвищену експресію маркерів диференціації кератину 10/11 та інволюкрину. Також зменшується кількість імунокомпетентних клітин та зменшується швидкість ангіогенезу в псоріатичних ураженнях шкіри при використанні нафталану. Нафталан добре переноситься при топічному застосуванні, не проявляє гепатотоксичності, цитотоксичності та гострої токсичності.

Згідно з наявними в літературі клінічних, лабораторних та експериментальних даних, можна певною мірою зрозуміти механізм біологічного впливу нафталанової нафти на організм людини та експериментальних тварин, а також природу її лікувального ефекту.

1.5 Обґрунтування розробки нових лікарських форм на основі ОНМ для лікування псоріазу

Псоріаз є хронічним запальним захворюванням шкіри, що значно впливає на повсякденне життя пацієнтів та їх якість життя. Наявність дерматологічних змін у вигляді висипів, лущень та свербіж змушує пацієнтів адаптувати свій вибір одягу, дотримуватися певних дієтичних обмежень з метою мінімізації дискомфорту та запобігання загостренню симптомів. Це захворювання може значно обмежувати щоденну діяльність, що негативно позначається на психоемоційному стані та соціальному благополуччі людей, які страждають на псоріаз [147]. Основні цілі лікування псоріазу включають: зменшення запальних процесів, усунення шкірних висипів та уражень, контроль над системними проявами захворювання, зменшення ризиків виникнення ускладнень, досягнення ремісії та запобігання загостренню.

Комплексний та індивідуальний підхід до терапії псоріазу направлений на покращення клінічної картини, запобігання прогресуванню патологічних змін, а також підвищення якості життя пацієнтів за рахунок досягнення ремісії.

Сучасні наукові дослідження в галузі фармакології та дерматології направлені на пошук та розробку нових лікарських засобів, дія яких направлена на блокування ключових механізмів розвитку псоріазу. Протягом останніх років зросла кількість біологічних препаратів для лікування псоріазу, проте більша частина з них ще перебувають в процесі доклінічних та клінічних досліджень. Але ефективність та віддалені наслідки застосування даних препаратів потребують подальших досліджень, крім того ці препарати мають високу вартість, що обмежує доступність для пацієнтів.

Нестероїдні протизапальні препарати та кортикостероїди зробили вагомий внесок у лікування запальних процесів, проте серйозні віддаленні побічні реакції при їх тривалому застосуванні зменшують прихильність пацієнтів до цих груп препаратів. Негативний вплив псоріазу на якість життя пацієнтів спонукає наукову спільноту до подальших досліджень у цій сфері. Отже, наявна нагальна потреба у пошуку та створенні нових лікарських засобів для поліпшення стану пацієнтів з хронічними запальними дерматологічними захворюваннями, таким як псоріаз. Актуальним залишається питання про розробку нового препарату для безпечного місцевого застосування, який би забезпечував ефективну терапевтичну дію з мінімальними проявами побічних реакцій у пацієнтів з псоріазом.

З давніх часів питання використання нафталанового масла в медицині викликало численні наукові дискусії та зацікавленість у дослідників різних галузей медицини, зокрема гістологів, біохіміків, фізіологів, патофізіологів, онкологів, фармакологів та інших спеціалістів. Незважаючи на тривалий період вивчення все ще залишається ряд нез'ясованих питань, які потребують подальших досліджень та роз'яснень на рівні сучасної доказової медицини. До препаратів природного походження зростає інтерес в медицині, як доповнення до основної терапії, нафталанова нафта привертає особливу увагу.

Нафталанова нафта являється єдиною в світі лікувальною нафтою і являє собою унікальний бальнеологічний фактор, якому немає рівних за фізико-хімічними і біологічними властивостями. Порівняно з промисловими видами нафти, вона більш молода за своїм походженням та відрізняється високим вмістом кисню, підвищеною густиною, наявністю високомолекулярних органічних з'єднань, які мають циклічну будову. Унікальні властивості нафталанової нафти обумовлені особливою будовою вхідних в її склад численних вуглеводнів, їх поєднання в окремих фракціях, а також природою азот- і сірковмісних сполук нафтових кислот. Слід зазначити, що використання нафталанового масла не втратило своєї актуальності та значимості для медицини. Поліциклічні нафтові вуглеводні можуть виявитися цінною сировиною для виготовлення нових, більш ефективних лікарських засобів для лікування псоріазу. Згідно з результатами досліджень [7] вивчення ефективності, переносимості та безпечності нафталанового крему (30 %) у пацієнтів з псоріазом дослідники відмічали високу ефективність даного крему, хорошу переносимість, протягом 20 днів топічного застосування не відмічали алергічних реакцій та суб'єктивних побічних реакцій. Ці результати свідчать про перспективність подальшого вивчення та використання нафталанового масла в лікуванні псоріазу.

Також м'які лікарські форми, що містять в своєму складі очищене нафталанове масло, можуть знайти широке застосування в практичній медицині як засоби з пом'якшувальними та протинабряковими властивостями для лікування дерматологічних захворювань.

Наукові дослідження підтверджують потенціал застосування природних речовин у медичній практиці. Перспективи подальших досліджень використання очищеного нафталанового масла як допоміжної речовини в лікарських засобах для топічної терапії хронічних дерматологічних захворювань відкривають можливості для продовження вивчення даної проблематики. Це дозволить розширити арсенал терапевтичних засобів для ефективного та безпечного лікування псоріазу, використовуючи цінні властивості природної сировини.

Висновки до розділу 1

1. Проведений огляд сучасних літературних джерел дозволив проаналізувати складний етіопатогенез псоріазу. Патологічна гіперпроліферація кератиноцитів та хронічний запальний процес у шкірі обумовлені дисбалансом прозапальних цитокінів (IL-1 β , IL-17, IL-23, IL-8 та ін.). Псоріаз залишається поширеним хронічним запальним захворюванням шкіри, що погіршує якість життя пацієнтів. Поширеність та коморбідність даної патології потребує розробки нових препаратів, дія яких буде спрямована на різні ланки патогенезу.

2. На фармацевтичному ринку наявна значна кількість лікарських засобів, зокрема кортикостероїдів, що мають низку небажаних побічних ефектів при тривалому використанні (атрофія шкіри, токсична дія). Виникає потреба в безпечних та одночасно ефективних препаратах, які впливатимуть на основні патофізіологічні механізми псоріазу.

3. Нафталанова нафта з давніх давен привертає увагу дослідників завдяки своїм терапевтичним властивостям, а саме регенеративною та протизапальною дією. Біологічна активність цієї нафти пов'язана з високим вмістом поліциклічних нафтонових вуглеводнів, що здатні регулювати обмінні та регенеративні процеси в епідермісі та дермі, нормалізують кровообіг та зменшують топічні прояви запалення. Але в нативній (неочищеній) нафталановій нафті містяться смоли, ароматичні вуглеводні та інші токсичні фракції, які можуть спричинити ряд побічних небажаних реакцій (алергічні реакції, канцерогенна, гепато- та нефротоксична дія).

4. Очищення нафталанової нафти шляхом знесмолення та дезароматизації, видалення токсичних домішок, зменшують ризики розвитку побічних небажаних реакцій при тривалому використанні. В очищеному нафталановому маслі зберігається висока концентрація поліциклічних нафтонових вуглеводнів, які проявляють протизапальну, регенеративну, пом'якшувальну, антисептичну, кератолітичну дію. Важливими перевагами очищеного нафталанового масла є відсутність різкого запаху, безбарвність, нездатність забруднювати одяг і перев'язувальні матеріали. Це підвищує безпеку, лікувальні

фармакологічні і фармацевтичні властивості, комплаєнтність, що є вкрай важливим при тривалому лікуванні псоріазу.

5. За даними літератури, топічне застосування очищеного нафталанового масла на псоріатичні вогнища на шкірі відзначається зменшення дискомфорту (болю та свербіж) завдяки зниженню інтенсивності місцевої запальної відповіді. Відбувається стимуляція природної регенерації шкіри, нормалізація проліферації та диференціювання кератиноцитів, покращується мікроциркуляція у вогнищах ураження.

6. Використання очищеного нафталанового масла як допоміжної речовини у м'яких лікарських формах (кремах, мазях, пастах, лініментах) підсилюватиме проникність активних фармацевтичних інгредієнтів у глибші шари шкіри, що може потенційно покращити клінічний ефект комбінованих лікарських засобів. Ця особливість очищеного нафталанового масла має практичне значення в терапії тяжких форм псоріазу.

7. Результати аналізу літературних джерел підтверджують доцільність використання очищеного нафталанового масла у складі нових лікарських засобів для місцевої терапії псоріазу. Його використання може покращити ефективність від топічної терапії, шляхом зменшення вираженості проявів запалення, прискорення репарації та покращення життя пацієнтів. Це все обґрунтовує перспективу подальших фармакологічних досліджень щодо розробки і впровадження препаратів на основі очищеного нафталанового масла в дерматологічну практику.

Даний розділ висвітлено в матеріалах наступної публікації:

Zaychenko G, Gorchakova N, Horbach A, Stan I, Simonov P. Teoretychne y eksperymentalne obgruntuvannia rozrobky dermatolohichnykh likarskykh zasobiv na osnovi pryrodnykh spoluk naftalanskoi nafty [Theoretical and experimental justification of development of dermatological medicinal products based on natural compounds of Naftalan oil]. *Fitoterapiia. Chasopys – Phytotherapy. Journal.* 2024;3:52–61. doi:10.32782/2522-9680-2024-3-52.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

З метою оцінки протизапальної активності та терапевтичної ефективності при псоріазоподібному ураженні шкіри проведено скринінгове та поглиблене фармакологічне дослідження нових тест-зразків (ТЗ) кремів, до складу яких входять нафтопродукти та допоміжні речовини. Дослідження були проведені на базі ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України» згідно договору про співробітництво від 02.09.2021 р. У рамках даної роботи було застосовано комплексний підхід, що включав оцінку терапевтичної ефективності досліджуваних ТЗ кремів за комплексом клінічних, дерматоскопічних та гістологічних параметрів, що дозволило отримати об'єктивні дані про їх властивості. Також було проведено вивчення ефективності та окремих показників безпеки ТЗ в досліджах *in vitro* на кератиноцитах людини лінії HaCaT на базі Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології імені Р.Є. Кавецького НАН України згідно угоди про наукове співробітництво від 23.06.2016 р. та додаткової угоди від 10.01.2023 р.

Згідно з метою та завданнями дисертаційної роботи, експериментальні дослідження були виконані відповідно до схеми основних етапів експериментального дослідження, що наведено на рис. 2.1.

Експериментальні дослідження були проведені на лабораторних тваринах: білих нелінійних щурах (n=89) обох статей, мишах лінії BALB/c (n=46) обох статей та мурчаках (n=10) обох статей, які знаходилися у віварії ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України».

Тварини утримувалися на стандартному раціоні в умовах віварію з дотриманням міжнародних нормативних документів, що регулюють проведення біомедичних досліджень за участю тварин. Зокрема, робота проводилася відповідно до положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986), «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», прийнятих на

Першому національному конгресі з біоетики (Київ, 2001), Директиви 2010/63/EU Європейського Парламенту та Ради Європи про захист тварин, що використовуються в наукових цілях, а також Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» №1759-IV від 15.12.2009 р., а також Експертного висновку Комісії з питань біоетичної експертизи та етики наукових досліджень Національного медичного університету імені О.О. Богомольця (протокол №153 від 29.11.2021 р.).

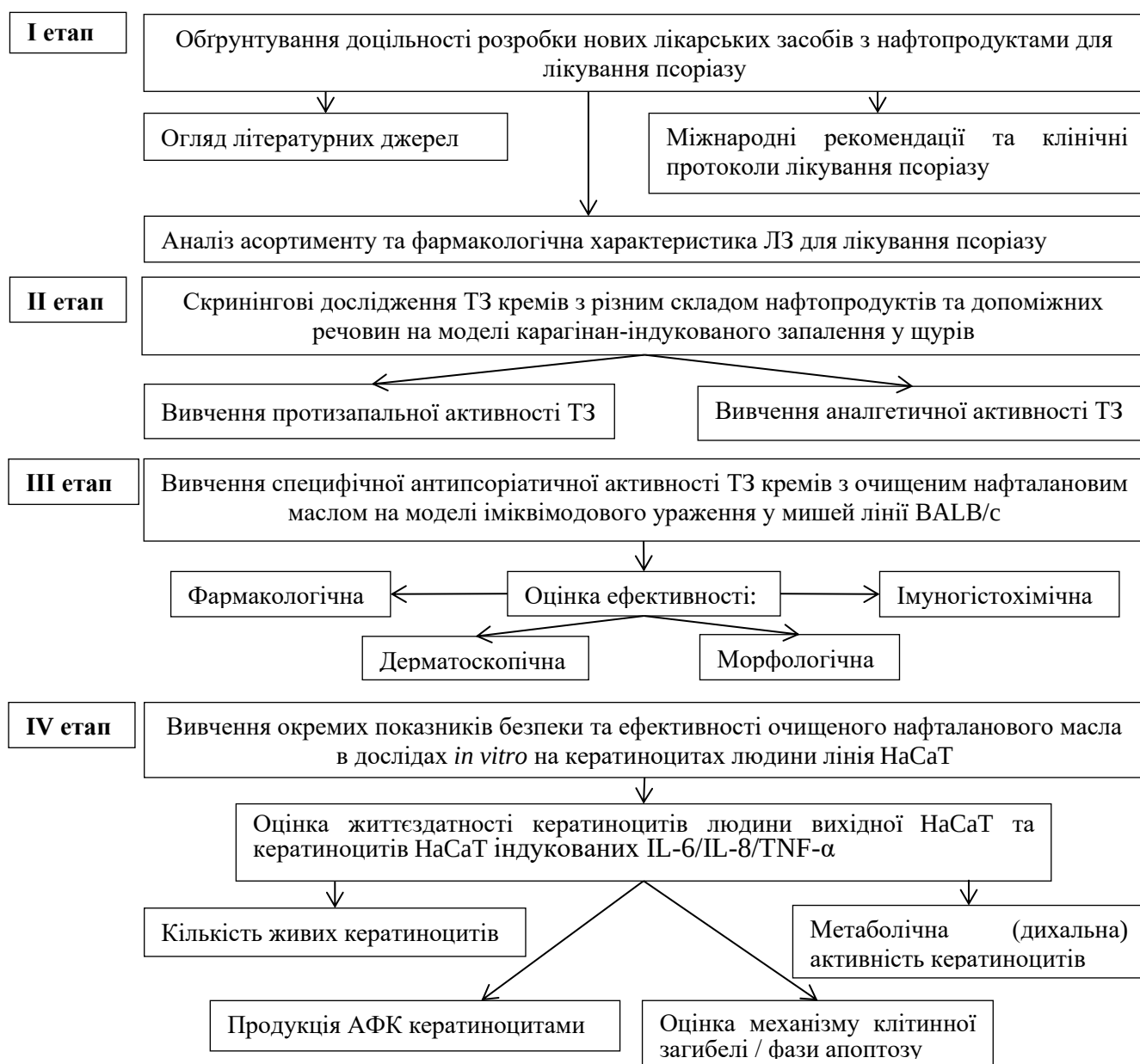


Рисунок 2.1 – Схема основних етапів експериментального дослідження

2.1 Індукція карагінанового запалення у щурів

На першому етапі дисертаційного дослідження було проведено скринінгове дослідження ТЗ кремів із різним складом нафтопродуктів та допоміжних речовин на моделі карагінан-індукованого запалення у щурів. Для цього під керівництвом професора Ляпунова Миколи Олександровича на базі ДНУ «Науково-технологічний комплекс «Інституту монокристалів» НАН України» (договір про наукове та освітньо-наукове співробітництво від 03.06.2024 р.) були розроблені та виготовлені ТЗ кремів на гідрофільній основі із різним складом нафтопродуктів і допоміжних речовин (табл. 2.1)

Таблиця 2.1 – Склад ТЗ кремів для скринінгового дослідження

Діючі та допоміжні речовини	Вміст речовин, % мас., у зразках:			
	№ 1 С. 1120521	№ 2 С. 2120521	№ 3 С. 3120521	№ 4 С. 4120521
Очищене нафталанове масло	0	0	10,0	15,0
Нафталанська нафта (чорна)	0	10,0	0	0
Вазелінове масло	10,0	0	0	0
Вазелін білий	5,0	5,0	5,0	0
Диметикон 100	1,0	1,0	1,0	1,0
Цетилпіридинію хлорид (в перерахунку на 100 % сухої речовини)	0,5	0,5	0,5	0,5
Цетостеариловий спирт	5,2	5,2	5,2	5,2
Пропіленгліколь	10,0	10,0	10,0	10,0
Динатрію едетат (трилон Б)	0,3	0,3	0,3	0,3
Вода очищена	68,0	68,0	68,0	68,0

На цьому етапі дослідження як препарат порівняння (ПП) використовувався крем з 1 % гідрокортизоном ацетатом на гідрофільній основі (№5, с. 5120521). Усі ТЗ кремів були зафіксовані в тубах об'ємом по 30 г.

Експериментальне дослідження проведено на статевозрілих нелінійних білих щурах обох статей з вихідною масою тіла $204,04 \pm 15,24$ г ($n=79$), які утримувалися у віварії на стандартному раціоні харчування за умов вільного доступу до корму та питної води, яка відстоювалася протягом 24 год.

На момент початку експерименту, згідно з даними листків здоров'я тварин, що були надані ветеринарним лікарем віварію, всі тварини були здоровими,

активними, збереженими фізіологічними рефlekсами, нормальними поведінковими реакціями та без порушень вегетативних функцій. Споживання їжі та води відповідало фізіологічним нормам.

Аналогічна фізіологічна картина спостерігалася у щурів після двотижневої адаптації у лабораторних умовах. Тварини активно реагували на зовнішні подразники, рефlekси, поведінкові та рухові реакції у всіх щурів зберігалися на фізіологічному рівні, шерстний покрив залишався гладеньким, чистим, видимі слизові оболонки мали світло-рожевий колір.

На момент отримання тварин з віварію, а також упродовж двох тижнів адаптації досліджували масу тіла щурів (вихідну, через 7 діб та через 14 діб з моменту отримання тварин із віварію). Отримані результати представлені у табл. 2.2.

Таблиця 2.2 – Маса ($M \pm m$, г) тіла у щурів та її приріст (Δ , %) упродовж адаптаційного періоду в лабораторному приміщенні

Вихідна	Через 7 діб	Через 14 діб
$204,04 \pm 15,24$	$218,0 \pm 13,13$	$224,45 \pm 17,14$
Δ	6,3	10,0

Встановлено, що під час адаптаційного періоду у тварин спостерігався фізіологічний приріст маси тіла, що свідчить про відсутність суттєвих змін гомеостазу у щурів.

На 15-й день (до початку експерименту) у всіх тварин була здійснена реєстрація вихідних (0) значень порогу больової чутливості (ПБЧ) та об'єму стопи (V, у. о.). За отриманими результатами були вилучені з дослідів тварини, показник ПБЧ яких був за межами середньостатистичного показника у популяції [132]. Такі тварини не використовувалися у подальших дослідженнях. Експериментальні групи сформовано методом випадкової вибірки з вихідним ПБЧ у діапазоні від 4 с до 12 с [37, 99, 132].

Група тварин №1 (інтактний контроль, $n=6$), інтактні тварини, утримувалися в лабораторному приміщенні в окремих клітках за ознакою статевої приналежності.

Їм забезпечувався звичайний режим годування з вільним доступом до їжі та води впродовж того ж періоду, що і тваринам інших експериментальних груп.

Група тварин №2 (контроль патології, n=20), цій досліджуваній групі тварин вводили у підшовний апоневроз задньої (правої) кінцівки 0,1 мл 1 % водного розчину карагінану для індукції запального процесу [98, 99].

Експериментальні групи тварин №3 (n=14), №4 (n=14), №5 (n=7), №6 (n=7) отримували ТЗ досліджуваних кремів. Тварини групи №7 (n=11) отримували ПП. За 30 хвилин до індукції запального процесу (карагінанового набряку – КН) на стопу правої кінцівки хірургічним шпателем наносили ТЗ кремів №1, №2, №3, №4 або ПП відповідно за умов м'якої (ручної) фіксації кожної тварини протягом 180 с від моменту нанесення кремів. Через 30 хв, тваринам з експериментальних груп №3–7 вводили у підшовний апоневроз карагінан. Далі, ще через 30 хв після ін'єкції карагінану всім тваринам груп №3–7 наносили на уражену стопу ТЗ кремів №1–№4 або ПП і так само за умов ручної фіксації витримували період аплікації ТЗ протягом 180 с. Через 2 та 4 години від моменту введення карагінану проводили реєстрацію ПБЧ та V стопи у тварин усіх експериментальних груп, яким було нанесено досліджувані ТЗ кремів або ПП, а також у щурів контрольної та інтактної груп.

Для оцінки анагетичної активності (АА) досліджуваних ТЗ кремів використовували тест «tail flick», робота якого базується на вимірюванні латентного періоду больової реакції (відсмикування хвоста) при фокусуванні інфрачервоного променя на проксимальну частину хвоста тварини. Кількісна оцінка анагезії проводилася шляхом визначення ПБЧ за допомогою анагезиметра моделі виробництва компанії Ugo Basile® (Італія). Показники ПБЧ визначали у секундах, враховуючи інтервал від 4 до 12 секунд.

Протинабрякову активність кремів оцінювали за допомогою плетизмометра виробництва компанії Ugo Basile® (Італія). Цей метод ґрунтується на вимірюванні об'єму стопи тварини шляхом занурення кінцівки у трубку з електропровідною рідиною. Зміни об'єму рідини фіксували з точністю до 0,01 мл. Це дозволяло з

високою точністю оцінювати динаміку набряку кінцівки тварини до і після індукції запалення та вплив ТЗ на його зменшення у порівнянні з контрольною групою.

Під час дослідження також здійснювали комплексну оцінку життєдіяльності тварин, включаючи візуальний огляд зовнішнього вигляду тварин, оцінку рухової активності, поведінкових реакцій, споживання води та їжі, зоосоціальних відносин, здатності реагувати на зовнішні (звукові, механічні) подразники, а також стан вегетативних функцій.

Статистичну обробку отриманих даних проводили за визначення нормальності розподілу, що оцінювалася за критерієм Shapiro-Wilk (W). Отримані значення підлягали нормальному розподілу. Дані представлені у вигляді середнього арифметичного та стандартної похибки репрезентативності середнього значення. Вірогідність між середніми значеннями у двох вибірках визначали за t-критерієм Стьюдента. Статистично значущими вважали відмінності при рівні значущості не менше 95 % ($p < 0,05$).

2.2 Моделювання псоріазоподібного ураження шкіри у мишей лінії BALB/c

Другим етапом дослідження ТЗ кремів з очищеним нафталановим маслом (ОНМ) було вивчення специфічної антипсоріатичної активності на моделі імквімод-індукованого ураження у мишей лінії BALB/c. Для даного дослідження були виготовлені ТЗ кремів з 10 % ОНМ під керівництвом професора Ляпунова М.О. на базі ДНУ «Науково-технологічний комплекс «Інституту монокристалів» НАН України». Детальний склад ТЗ представлено в табл. 2.3.

Поглиблене фармакологічне вивчення нових ТЗ кремів з ОНМ проводили на моделі псоріазоподібного ураження шкіри у мишей, індукованого імквімодом (IMQ). Нами було проведено пошук відповідної експериментальної моделі серед зарубіжних публікацій. Аналіз бази даних PubMed виявив, що найбільш часто зустрічаються посилання на методику моделювання псоріазоподібного ураження шкіри за допомогою топічного нанесення IMQ [10, 19, 46, 51, 57, 60, 90, 92, 110, 115, 155, 131, 160, 161,]. IMQ-індукована модель дозволяє відтворити максимально

схожі до захворювання у людей клінічні та гістологічні прояви псоріазу, тому далі ми будемо використовувати термін «псоріазоподібне ураження шкіри у тварин».

Таблиця 2.3 – Склад ТЗ кремів для поглибленого вивчення їх фармакологічних властивостей

	Крем (ОНМ)	Крем (ОНМ+Д)	Крем (ВМ+Д)
Склад АФІ	10 % Очищене нафталанове масло	10 % Очищене нафталанове масло + 2 % Дротаверин	10 % Вазелінове масло + 2 % Дротаверин
Допоміжні речовини	цетилпіридинію хлорид – 0,5 %, пропіленгліколь – 10,0 %, вазелін білий – 5,0 %, диметикон 100 – 1,0 %, динатрію едетат – 0,3 %, цетостеариловий спирт – 5,2 %, вода очищена до 100 г (68,0 г)	пропіленгліколь – 15,0 %, вазелін білий – 11,0 %, цетиловий спирт – 4,7 %, стеариловий спирт – 2,5 %, цетостеариловий ефір макроголу 20 – 2,3 %, вода очищена до 100 г (52,5 г)	пропіленгліколь – 15,0 %, вазелін білий – 11,0 %, цетиловий спирт – 4,7 %, стеариловий спирт – 2,5 %, цетостеариловий ефір макроголу 20 – 2,3 %, вода очищена до 100 г (52,5 г)
Серія	11 10 22	02 02 22	01 02 22
К-ть	15 г (3 туби)	15 г (3 туби)	15 г (3 туби)

Для дослідження використовувався ІМҚ доступний у лікарській формі – крем, у вигляді сертифікованого лікарського засобу «Кераворт®», що містить 5 % іміквімоду (в 1 саше міститься 250 мг крему, доза іміквімоду – 12,5 мг), зареєстрований в Україні (серія №19215269 виробник Glenmark Pharmaceuticals Ltd., Індія). Дана методика має переваги у доступності, відносній простоті відтворення та здатності імітувати ключові патологічні прояви псоріазу.

Експериментальне дослідження було проведено на здорових статевозрілих мишах лінії BALB/c обох статей віком 6–12 тижнів. За даними листка здоров'я тварин, що був отриманий від ветеринарного лікаря віварію, на момент початку експерименту, усі тварини були здоровими, активними, споживали їжу (стандартизований комбікорм) та воду за умов вільного доступу до корму та поїлок. Розладів вегетативних функцій у тварин не зафіксовано. Після 14-денного періоду акліматизації у лабораторному приміщенні було проведено зважування всіх мишей. Для дослідження були взяті тварини з вихідною масою тіла в діапазоні від 20,0 г до 24,0 г. Методом випадкової вибірки сформовані експериментальні групи тварин, кожна з яких включала однакову кількість мишей кожної статі. Протягом

усього періоду дослідження тварини утримувалися у роздільних клітках, окремо самці та самки, у лабораторному приміщенні на звичайному режимі харчування. Усі маніпуляції з лабораторними тваринами проводилися з дотриманням етичних норм та принципів гуманного поводження, відповідно до міжнародних стандартів біоетики. Дослідження було сплановано та реалізовано згідно з вимогами належної лабораторної практики (GLP) рекомендаціями щодо проведення доклінічних випробувань. Методологія дослідження відповідала сучасним науковим протоколам вивчення анальгезуючої та протизапальної дії фармакологічних засобів в експериментальних умовах. Зокрема, були враховані рекомендації провідних міжнародних наукових організацій щодо дослідження механізмів болю та запалення при гострих і хронічних патологічних процесах [31, 99].

На етапі формування експериментальних груп у тварин визначені вихідні (0) значення параметрів: маси тіла, ПБЧ (с) та об'єму стопи (V, у. о.), а також зареєстровано первинну оцінку ступеня ураження поголеної ділянки шкіри спини за індексом mPASI (модифікований індекс площі та тяжкості псоріазу) та за цим же індексом визначена ефективність щодо терапевтичної ефективності досліджуваних ТЗ крему та ПП при псоріазоподібному ураженні шкіри тварин.

На початковому етапі моделювання патологічного процесу було проведено дослідження з метою визначення найбільш ефективного дозового режиму ІМQ для адекватного відтворення клінічно підтвердженого (макроскопічно та дерматоскопічно) розвитку псоріазоподібного ураження шкіри у експериментальних тварин. На основі аналізу наукової літератури [46, 51, 57, 60, 90, 92, 160, 161] визначено, що найбільш часто у дослідженнях використовуються дози ІМQ у кількості 42,0 мг та 62,5 мг на тварину. Ми провели порівняльну оцінку ефективності двох доз ІМQ (42,0 мг та 62,5 мг) для індукції псоріазоподібного ураження шкіри у мишей лінії BALB/с. Ця оцінка базувалася на аналізі інтенсивності та швидкості розвитку патологічних змін шкіри [165].

Формування псоріазоподібного ураження шкіри у тварин відбувалося шляхом щоденного (упродовж 9 діб) топічного нанесення патогенного агента – ІМQ у двох дозах – 42,0 мг і 62,5 мг на тварину на попередньо поголену ділянку

шкіри спини мишей площею 6 см². Оцінка розвитку патологічного процесу у тварин здійснювалася з використанням модифікованого індексу площі та тяжкості псоріазоподібного ураження шкіри (mPASI) [62, 100]. Щоденно, перед нанесенням патогенного агента (IMQ), ТЗ кремів та ПП, візуально та пальпаторно визначали наявність 3-х показників: гіперемія (еритема), ущільнення (потовщення, інфільтрація), лущення (поява лусочок) на ураженій ділянці шкіри спини кожної тварини. Оцінка кожного показника здійснювалася за шкалою від 0 до 4 балів, де 0 – відсутні ознаки ураження, 1 – легко виражені патологічні зміни, 2 – помірно виражені патологічні зміни, 3 – виражені патологічні зміни, 4 – яскраво виражені патологічні зміни. Враховуючи той факт, що патогенний агент, ТЗ та ПП наносили на фіксовану за площею ділянку шкірного покриву, оцінка площі ураження не визначалася. Після визначення кожного параметра псоріазоподібних проявів у всіх експериментальних тварин, обчислювали сумарний бал за кожним відповідним параметром для всіх мишей кожної з групи. Тобто, сумарний бал розраховувався від 0 до 12 балів. На основі отриманих даних розраховувалося медіанне значення індексу mPASI для кожної експериментальної групи.

Перша експериментальна група – інтактний контроль (ІК, n=6). Протягом 9 днів, щоденно, 1 раз на добу на попередньо депільовану ділянку шкіри тварин наносили дистильовану воду у вигляді аплікації.

До другої групи були віднесені тварини контрольної патології (КП, n=12) з псоріазоподібним ураженням шкіри за допомогою IMQ, які не отримували лікування. Упродовж 9 діб (один раз на добу, з 12 години до 14 години) їм наносили патогенний агент за допомогою очного шпателя у дозах 42,0 мг (n=6) та 62,5 мг (n=6) на тварину (на 6 см²). Через 9 діб припинилося нанесення патогенного агента, і всі досліджувані ТЗ кремів та ПП наносилися на ділянку шкіри спини, на якій вже відзначалося псоріазоподібне ураження. Після визначення оптимального режиму топічного нанесення IMQ, що викликав ураження шкіри, всі подальші дослідження проводилися з використанням 62,5 мг = 3,125 мг активної речовини – IMQ – на кожну мишу (емпірично визначена доза).

За допомогою порівняльного аналізу виявлено, що доза ІМQ 62,5 мг виявилася оптимальною з наступних причин. Швидкість розвитку патологічних змін, що дозволило скоротити період індукції патологічного процесу. Формувалися більш виражені клінічні ознаки псоріазоподібного ураження, що підтверджувалося як за візуальним оглядом, так і дерматоскопічно. Кількісна оцінка за індексом mPASI доза 62,5 мг демонструвала статистично значуще вищі показники порівняно з дозою 42,0 мг. За результатами цього етапу дослідження обрано дозовий режим моделювання псоріазоподібного ураження шкіри у мишей, що становив 9 разове нанесення ІМQ дозою 62,5 мг на тварину.

На наступному етапі з 10-ї доби від початку експерименту (від першого дня нанесення патогенного агента – ІМQ) за наявності чітких ознак сформованого псоріазоподібного ураження шкіри були сформовані експериментальні групи тварин для подальшого вивчення ТЗ, що були відібрані після скринінгових досліджень.

Досліджувані ТЗ: крем з 10 % ОНМ; крем з 10 % ОНМ у комбінації з 2 % дротаверином; крем з 10 % вазеліновим маслом у комбінації з 2 % дротаверином. Дані ТЗ кремів мають амфіфільні властивості. Як препарат порівняння (ПП) використовували крем з 1 % гідрокортизоном бутиратом (серія №220922, виробник ТОВ «Фармацевтична компанія «Здоров'я», Україна).

Третя група тварин (n=8) отримували ТЗ крему з 10 % ОНМ (експериментальна група «ОНМ»). Четверта група (n=7) отримувала ТЗ крему з 10 % ОНМ у комбінації з 2 % дротаверином (експериментальна група «ОНМ+Д»). П'ята група (n=7) – ТЗ крему 10 % вазелінового масла у комбінації з 2 % дротаверином (експериментальна група «ВМ+Д»). Шоста група тварин (n=6) отримувала ПП (експериментальна група «ПП»). Досліджувані ТЗ кремів наносили на уражену ділянку шкіри щоденно протягом 21 доби. Оцінку антипсоріатичної дії досліджуваних ТЗ кремів проводилася за редукцією основних патологічних проявів експериментальної патології за індексом mPASI (макроскопічна оцінка стану шкіри за допомогою дерматоскопа) і мікроскопічних змін шкіри на 7-му, 14-ту та 21-шу добу лікування.

На етапі поглибленого вивчення відібраних найбільш активних ТЗ кремів проводилася оцінка антипсоріатичної активності ТЗ кремів за макроскопічними змінами з боку шкіри (оцінка за допомогою дерматоскопії), за фармакологічними методами дослідження (вивчення аналгетичної та протизапальної дії) та гістологічними методами дослідження шкіри (світлова мікроскопія зрізів шкіри).

2.3 Індукція посиленого карагінаном запалення у мишей лінії BALB/c із сформованим псоріазоподібним ураженням шкіри

Експериментальне дослідження було проведено з використанням комплексного підходу для оцінки аналгетичної та протизапальної активності ТЗ кремів на моделі псоріазоподібного ураження шкіри та посиленого карагінан-індукованим запаленням у мишей лінії BALB/c.

Мета даного експерименту полягала в оцінці аналгетичної активності ТЗ кремів за умов додаткового введення бустеру – карагінану, що дозволив відтворити гострий запальний процес у мишей лінії BALB/c з індукованим псоріазоподібним ураженням шкіри, спричиненим ІМҚ. Використання карагінанової моделі запалення дозволило вивчити вплив ТЗ кремів на різні типи запалення (гостре і хронічне), що значно розширює можливості оцінки їхньої ефективності. Карагінанова модель запалення є широко визнаною та стандартизованою в фармакологічних дослідженнях. Ця модель дозволяє оцінити як протизапальну, так і аналгетичну активність фармакологічноактивних речовин, що є важливим для розробки комплексних топічних препаратів. Іміквімод викликає псоріазоподібне ураження шкіри, яке є хронічним запальним процесом. Карагінан викликає гостре запалення, що має інший механізм розвитку. Додаткове введення карагінану дозволило оцінити ефективність досліджуваних ТЗ кремів не лише при хронічному запаленні, але й у контексті розвитку гострої запальної реакції, яке може виникати у пацієнтів з псоріазом, що внаслідок свербіжів механічно травмують шкіру, при цьому може бути приєднання інфекції, розвиток інфекційно-запального процесу. При псоріазі доволі часто виникає коморбідний стан, псоріатичний артрит. Тому

така модель дозволяє комплексно оцінити вплив препаратів на різні типи запалення, з'ясувати можливий механізм їх фармакологічної дії.

Карагінан вводили тваринам після того, як псоріазоподібне ураження вже розвинулося під дією ІМҚ (10-й день). Аналгетичну активність оцінювали шляхом вимірювання порогу больової чутливості (ПБЧ) за тестом відсмикування хвоста («tail flick»), як у попередніх дослідженнях. Результати ПБЧ фіксували на 14-у і 21-у добу експерименту та через 2 і 4 години після введення карагінану.

Оцінка знеболювальної та протинабрякової активності досліджуваних ТЗ кремів проводилася не лише на фоні псоріазоподібного ушкодження шкіри мишей лінії BALB/c, а й за умов розвитку ноцицептивної реакції, що індукована карагінаном [9]. Методологія цього етапу дослідження була аналогічною до скринінгового вивчення протизапальної та аналгетичної дії, але з використанням карагінану як додаткового флогогенного агента до ІМҚ. На відміну від скринінгового дослідження, в цьому були використанні лінійні миші BALB/c.

Оцінка знеболювальної дії ТЗ кремів за тестом «tail-flick» з метою визначення порогу больової чутливості (ПБЧ) у всіх експериментальних групах мишей проводилася, як зазначалося вище, до індукції патологічного процесу (вихідні дані), на фоні сформованої патології (на 10 добу – після дев'ятиразового щоденного нанесення патогенного агента), а також через 14 та 21 добу від початку лікування досліджуваними ТЗ кремів і ПП.

Оцінка протизапальної дії ТЗ кремів та ПП проводилася за тестом протинабрякової активності за умов дослідження об'єму (V, у. о.) стопи за допомогою плетизмометра у ті ж самі терміни, що й оцінка знеболювальної дії. Розраховувалася протинабрякова активність (ПНА) ТЗ.

Оцінку клінічних проявів здійснювали як власне при патологічному стані, так і за умов застосування досліджуваних ТЗ кремів. Комплексний аналіз включав наступні параметри: показники зовнішнього вигляду тварин, рівень рухової активності, поведінкові зміни, здатність споживання води та їжі, зоосоціальні відносини, здатність реагувати на зовнішні подразники (звукові, механічні), а також стан вегетативних функцій. Така багатфакторна оцінка дозволила отримати

загальну характеристику стану експериментальних тварин та ефективності досліджуваних ТЗ кремів.

2.4 Гістологічне та морфометричне дослідження зразків шкіри

Для гістологічного дослідження відбирали зразки шкіри розміром 1x1x0,5 см, які з метою фіксації занурювали на 72 години в 10 % розчин забуференого формаліну. Після фіксації зразки зневоднювали в градієнті розчинів етанолу (70 %; 80 %; 96 % і 100 %), просвітляли у 2-х порціях ксилолу та заключали в парапласт (тип 6, Richard-Allan Scientific, США) у відповідності до загально прийнятого протоколу [15]. За допомогою ротаційного мікротому HM 325 (Microm, Німеччина) із парафінових блоків готували зрізи товщиною 5–7 мкм, які забарвлювали гематоксиліном і еозином і за методом Массона в модифікації Зербіно-Лукаевича (надалі MSB метод), що застосований для виявлення на гістологічних зрізах сполучної тканини [15].

Гістологічні дослідження проводили за допомогою світлового мікроскопу Olympus BX51, обладнаного системою отримання зображень Olympus DP-Soft 3.2 (Японія), що разом із програмним продуктом ImageJ 1.45S (National Institutes of Health, США; вільний доступ) дозволило провести визначення товщини епідермісу шкіри (мм).

2.5 Дослідження гострої і субхронічної токсичності та місцевої переносимості очищеного нафталанового масла *in vivo*

Досліди з вивчення гострої та субхронічної токсичності ОНМ за його тривалого 21-денного застосування проведено на нелінійних статевозрілих білих щурах обох статей (n=10), що утримувалися на стандартному раціоні харчування у віварії за температури (20–22)°С, з вільним доступом до їжі та води, за режимом утримання «день-ніч». Всі тварини знаходилися у пластикових клітках з підстилкою, не більш, як по 7 особин у кожній, згідно вимог до роботи з лабораторними тваринами [77]. Тварини кожної статі утримувалися окремо.

До початку дослідів тварини переносилися з віварію до лабораторного приміщення, де перебували на адаптивному терміні упродовж 14 діб за аналогічних умов утримання [75, 139].

До експерименту відібрано тварин без зовнішніх ознак захворювань. Усі експериментальні процедури проводились у відповідності до міжнародних вимог про гуманне ставлення до тварин, що окреслені Європейською конвенцією про захист хребетних тварин (Директива 86/609/ЕС, Страсбург) і використовуються в експериментальних та інших наукових цілях. Правила евтаназії та утилізації загиблих тварин відповідали вимогам умов доклінічної практики [31, 139].

Індивідуальна маса тіла тварин реєструвалась з 10⁰⁰год до 11⁰⁰ год перед нанесенням препарату, а потім через 3, 7 і 14 днів після застосування препарату ОНМ той самий час. Реакція тварин на зовнішні подразники, зовнішній вигляд, здатність споживати їжу та воду, рухові реакції оцінювалися щоденно упродовж 14 діб.

Режим нанесення препарату ОНМ на депільовану ділянку шкіри щурів: щоденно, 1 раз на добу, упродовж 21 доби, у дозі 500 мг/кг маси тіла щура (доза складає 10 % від максимально нанесеної дози за дослідження гострої токсичності).

Критеріальними показниками токсичності ОНМ за його тривалого застосування були виживання тварин, динаміка маси тіла упродовж терміну спостереження, маса внутрішніх органів щурів, поведінкові, вегетативні та рухові реакції тварин після щоденного (упродовж 21 доби) нанесення препарату на депільовану ділянку шкіри у зоні спини щура. Для характеристики функціонування основних життєво-важливих систем – серцево-судинної і дихальної – реєстрували частоту серцевих скорочень (ЧСС) на поліграфі «NikchonKohden» (Японія) і частоту дихання (ЧД) щурів на реографі РП-2.

Індивідуальна маса тіла тварин реєструвалась з 10⁰⁰год до 11⁰⁰год перед нанесенням препарату, а потім через 7, 14 та 21 добу після застосування препарату ОНМ. Досліди виконано на білих щурах з вихідною середньою масою (228,53±2,9) г.

Реакція тварин на зовнішні подразники, зовнішній вигляд, здатність споживати їжу та воду, рухові реакції оцінювалися упродовж 21 доби.

Макроскопія. Через 21 добу після нанесення препарату ОНМ усі тварини були знеживлені шляхом цервікальної дислокації під легким ефірним наркозом. Усі знеживлені тварини підлягали повному зовнішньому огляду, розтину і детальному дослідженню внутрішніх органів. Перед знеживленням вкінці експерименту всі тварини голодували протягом 3-х годин.

Маса внутрішніх органів. Були зважені наступні органи: печінка, нирки, селезінка, легені, серце, яєчки. Парні органи були зважені разом.

Дослідження місцевоподразнювальної дії проведено на мурчаках ($n=10$) обох статей (по 5 особин кожної статі) (510–530) г. Тваринам за умов м'якої ручної фіксації на спеціальній дерев'яній полиці, що була розташована на лабораторному столі, ножицями із заокругленими браншами вистригали шкіру на поверхні спини (з обох боків від хребта). Площа депільованої частини спини складала 9 см^2 (3 см х 3 см) з кожного боку. Правий бік спини кожної тварини був контролем, на який наносили (вазелінове масло). На лівий бік кожного мурчака наносили ОНМ у дозі 500 мг/ кг маси тіла тварини. Фіксація тварин відбувалася упродовж 5 хв після кожного нанесення ОНМ. Препарат наносили на шкіру, щоденно з 10⁰⁰ год до 11⁰⁰ год., один раз на добу, щоденно протягом 7 днів (тобто, 7 разів).

Показниками наявності місцево-подразнювальної дії ОНМ були визначені такі реакції, як гіперемія, набряк, порушення цілісності шкірного покриву, злущування епітелію. Оцінювалися частота та ступінь ураження шкірного покриву (за бальною шкалою) [100, 139]. Крім того, оцінювали наявність больової реакції у тварин за механічного подразнення (за допомогою очного шпателя) депільованих ділянок шкіри. Результати фіксували через 1 добу, через 3 доби та через 7 діб від нанесення ОНМ.

Статистична обробка даних. Статистична обробка отриманих даних на даному етапі дослідження проведена з визначенням рівномірності розподілу вибіркової сукупності за критерієм Колмогорова. Дані наведені як середнє значення $\pm$ похибка середнього ($M \pm m$). Статистична обробка даних була виконана

з використанням *t*-критерію Стюдента з визначенням стандартного відхилення з рівнем значущості 95 %. Зміни вважались статистично значимими при $p < 0,05$.

2.6 Вивчення окремих показників безпеки досліджуваних тест-зразків на моделі псоріазу *in vitro*

Моделі *in vitro* для дослідження ефективності та безпеки нових лікарських засобів для лікування псоріазу, що базуються на клітинних технологіях (зокрема, 2D і 3D культурах та методах із використанням системи Skin-on-a-Chip), нині набувають широкої популярності [28, 126, 144, 145, 156, 169]. У межах цієї роботи застосовано низку методів для аналізу нової субстанції з потенційною антипсоріатичною дією у 2D-тестовій системі. Як модель використовували людські кератиноцити, що попередньо зазнали тривалого впливу прозапальних цитокінів (IL-6, IL-8, TNF- α).

Клітини. В роботі використовували іморталізовані кератиноцити людини вихідної лінії HaCaT та кератиноцити HaCaT, індуковані IL-6/IL-8/TNF- α . Клітини вихідної лінії культивували у поживному середовищі RPMI 1640 (Biowest, Франція) з 10 % фетальної сироватки теляти (ФСТ) (Biowest, Франція) та 1х пеніцилін-стрептоміцину (Biowest, Франція). Досліджувані клітини культивували у зволоженій атмосфері з 5 % CO₂ при 37°C. Зміну середовища і пересів клітин проводили за стандартною методикою. Клітини пересівали після досягнення ними 80%–90% моношару за допомогою розчину Версену (Biowest, Франція) та трипсину (Biowest, Франція). Для досліджень використовували клітини, що знаходились в експоненційній фазі росту.

Модифіковані клітини культивували у поживному середовищі DMEM (Biowest, Франція) з 10 % ФСТ та 1х пеніцилін-стрептоміцину з додаванням IL-6 – 0,8 нг/мл (Sigma, США), IL-8 – 0,07 нг/мл (Sigma, США) та TNF- α – 1 нг/мл (Sigma, США) протягом 105 діб. Досліджувані клітини культивували у зволоженій атмосфері з 5 % CO₂ при 37°C. Зміну середовища і пересів клітин проводили за стандартною методикою. Клітини пересівали після досягнення ними 80%–90%

моношару за допомогою розчину Версену (Biowest, Франція) та трипсину. Для досліджень використовували клітини, що знаходились в експоненційній фазі росту.

Досліджувані сполуки.

1) Очищене нафталанове масло – отримано від «Дослідно-промислового заводу Національної академії наук Азербайджану»;

2) Гідрокортизоновий крем – виробник ТОВ «Фармацевтична компанія «Здоров'я», Україна.

Визначення життєздатності клітин вихідної HaCaT та модифікованої сублінії HaCaT/P колориметричними методами. Через 24 години після пересіву досліджувані клітини знімали з субстрату за допомогою розчину Версена і оцінювали кількість клітин в суспензії за допомогою трипанового синього (A0668, Applichem, Німеччина) в камері Горяєва (Волес, Україна). Клітини, що досліджувалися, були висаджені на 96-лунковий планшет (SPL, Корея) у концентрації $0,8 \times 10^4$ клітин/лунку. Клітини культивували у зволоженій атмосфері при 5 % CO₂ і 37°C протягом 24 годин. Через 24 години до клітин вносили досліджувані сполуки, розчинники і допоміжні речовини. Клітини інкубували при 5 % CO₂ і температурі 37°C протягом ще 24 годин. Після завершення інкубації результати (кількість живих клітин) враховували візуально (метод прямої мікроскопії) і за допомогою колориметричного методу, фарбуючи живі клітини кристалічним фіолетовим (405831000, ThermoScientific, США) або методом МТТ-тесту (A2231, Applichem, Німеччина).

Після закінчення інкубації клітин з досліджуваними препаратами з усіх лунок планшета видаляли поживне середовище разом із загиблими клітинами. Далі фарбували живі клітини – в усі лунки планшета вносили по 50 мкл розчину кристалічного фіолетового (барвник розводили у 70 % метанолі до кінцевої концентрації 5 мг/мл). Кристалічний фіолетовий зв'язується з білками і ДНК в клітинах. Планшет інкубували за кімнатної температури 10 хвилин, після чого барвник видаляли з усіх лунок, а залишки вимивали холодною проточною водою. Планшет просушували на повітрі та проводили елюцію барвника, додаючи по 100

мкл 96° етилового спирту в усі лунки планшета. Після чого планшет поміщали на платформу міні-шейкера на 10 хвилин при швидкості 300 об/хв.

В МТТ-тесті після закінчення інкубації клітин з досліджуваними препаратами в усі лунки планшета вносили по 10 мкл розчину МТТ (5 мг/мл 3-(4,5-диметилтіазол-2)-2,5-дифенілтетразоліум броміду у фосфатно-сольовому буфері). Планшет поміщали в CO₂-інкубатор на 3 години, після чого спостерігали зміну кольору середовища в лунках за кількістю темно-синіх кристалів формазану в клітинах. Після інкубації видаляли поживне середовище та в кожную лунку вносили по 100 мкл розчинника ДМСО і поміщали планшет на платформу міні-шейкера на 10 хвилин при швидкості 300 об/хв. Протягом 10 хвилин кристали формазану розчинялися в ДМСО.

При обох способах фарбування клітин результати фіксували за допомогою спектрофотометра з вертикальним ходом променів при довжині хвилі збудження 540 нм. Кількість живих клітин (X) в кожній лунці планшета виражали у відсотках, розраховуючи за формулою:

$$X = \frac{A_1 \cdot 100\%}{A_0},$$

де A₀ - середнє значення оптичної густини в лунках негативного контролю,
A₁ - середнє значення оптичної густини в лунці експериментальної групи.

Оцінку ступеня життєздатності клітин після 24 год інкубації для тестованого зразка, позитивних та негативних контролів проводили порівняно з інтактними клітинами. IC₅₀ (концентрацію, яка викликає цитотоксичну дію у 50 % клітин) визначали методом нелінійного регресійного аналізу.

2.7 Оцінка рівня апоптозу в клітинах методом проточної цитометрії

Визначали кількість (%) клітин на ранній, середній і пізній стадіях апоптозу шляхом їх подвійного фарбування Annexin V та propidium iodide методом проточної цитометрії. Клітини висаджували на лунки 6-лункового планшету (SPL, Корея) в поживному середовищі DMEM з 10 % ФСТ в концентрації 1,5x10⁵ в об'ємі 5

мл/лунку. Через добу до клітин додавали досліджувані препарати. Інкубували клітини в CO₂-інкубаторі при 37°C та вмісту CO₂ – 5 % у вологій атмосфері ще протягом 18 годин. Після закінчення інкубації кератиноцити збирали із поживного середовища і знімали з субстрату розчином Версену, рахували кількість клітин і відмивали фосфатно-сольовим буфером (ФСБ). Клітини фарбували згідно з протоколом виробника набору Annexin V FITC Apoptosis Detection Kit (Dojindo, Японія). Виготовлені проби аналізували за допомогою проточного цитометра DxFLEX (Beckman Coulter, США), оснащеного синім лазером 488 нм. Забарвлення Аннексином V-FITC аналізували за каналом FITC (світлофільтр 525/40 нм BP), а забарвлення PI аналізували за каналом ECD (світлофільтр 610/20 нм BP). Показник посилення для каналу FITC становив 2 та для каналу ECD – 10. Стратегія гейтування під час цитофлуориметричного дослідження полягала в максимально широкому гейтуванні клітин з відсіканням тільки клітинного дебрису на дот плоті FSC-A/SSC-A та в виключенні з аналізу дуплетів за допомогою дот плоту FSC-A/FSC-H. Оцінка параметрів апоптозу/некрозу проводилась з використанням гейту типу чотирьох квадрантів на дот плоті FITC-A/ECD-A. В дослідженні було проаналізовано в середньому 25 000 подій. Отримані результати аналізували за допомогою комп'ютерної програми CytExpert для DxFLEX.

2.8 Визначення рівня продукції активних форм кисню, інтерлейкінів кератиноцитами

Визначення рівня продукції активних форм кисню кератиноцитами людини, індукованими IL-6/IL-8/TNF- α (HaCaT/P). *Мікроскопічний аналіз.* Клітини висаджували на чашки Петрі d=35 мм, в які поміщали стерильні покривні скельця. Клітини висаджували у поживному середовищі DMEM з 10 % ФСТ і 1х антибіотиком-антимікотиком в концентрації 5×10^4 клітин/чашку і культивували у зволоженій атмосфері при 5 % CO₂ і 37°C протягом 24 годин. Далі у відповідні чашки додавали досліджувані сполуки. Клітини інкубували за стандартних умов ще 24 години. Через 24 години з усіх чашок видаляли поживне середовище і двічі

промивали клітини ФСБ. В чашки додавали по 1 мл ФСБ і фарбник DCFH до кінцевої концентрації 50 мМоль. Клітини інкубували 20 хвилин при 37°C та 5 % CO₂. Флуоресцентний зонд 2',7'-дихлордигідрофлуоресцеїн (DCFH) легко проникає в клітини, де окислюється до флуоресцентного продукту 2',7'-дихлорофлуоресцеїну (DCF) кількома АФК. Далі клітини двічі промивали ФСФ і поміщали покривні скельця з клітинами на предметне скло. Одразу аналізували за допомогою мікроскопу з УФ лампою (довжина хвилі 490 нм) рівень флуоресценції у досліджуваних клітинах. Методом напівкількісного аналізу (у балах) оцінювали в клітинах рівень продукції АФК.

Продукція прозапальних цитокінів IL-8 та IL-1 β клітинами модифікованої сублінії HaCaT/P. Клітини висаджували в концентрації $1,5 \times 10^5$ клітин/лунку в лунки 6-лункового планшету в повному поживному середовищі DMEM в присутності 10 % ФСТ та 1х пеніцилін-стрептоміцину. Через 24 години в усіх лунках планшету змінювали поживне середовище і у відповідні лунки планшету вносили досліджувані сполуки. Після внесення дослідних речовин клітини поміщали у CO₂-інкубатор і культивували ще 24 години за стандартних умов. По закінченню інкубації з усіх лунок планшету збирали культуральне середовище і центрифугували протягом 5 хвилин при 1000 об/хв, надосадову рідину відбирали і зберігали при -20°C для подальшого визначення рівня цитокінів.

Перед аналізом концентрації цитокінів досліджувані зразки розморожували за кімнатної температури. Рівень IL-8 (Human Interleukin 8 ELISA Kit, Fine Test, Wuhan Fine Biotech Co., Ltd., Китай) та IL-1 β (Human Interleukin 1 β ELISA Kit, Fine Test, Wuhan Fine Biotech Co., Ltd., Китай) в культуральному середовищі з клітин HaCaT/P визначали методом ІФА, який проводили згідно інструкції виробника.

2.9 Статистичні методи обробки даних морфометричних досліджень

Статистичну обробку результатів морфометричних досліджень проводили за допомогою програмних продуктів «Statistica 13» (TIBCO Software Inc.; SN AXA905I924220FAACD-N) та «Excel». Згідно до основних принципів проведення статистичного аналізу [83, 84, 95]. Попередньо всі варіаційні ряди даних перевіряли

на відповідність закону їх нормального розподілу, шляхом аналізу частот, а також за визначенням критеріїв Лілліфорса і Шапіро-Уїлка. Статистичні показники: середнє значення (M), стандартна похибка (SE), середнє квадратичне відхилення (σ), мінімальне та максимальне значення (min–max), медіана (Me) і 95 % довірчі інтервали (95 % ДІ) розраховували за допомогою вбудованого в програму Statistica модулю «Basic Statistics and Tables» і її підмодулів «Descriptive statistics» та «Nonparametric Statistic». Статистичні гіпотези для порівняння даних, отриманих для двох незалежних вибірок перевіряли за критеріями Стюдента (t) і Фішера (F), а також Вальда-Волфовіца, Манна-Уїтні (U-тест) і Колмогорова-Смирнова (двобічний тест) за умови прийняття рівня значимості $\alpha=0,05$.

Для оцінки реагування шкіри на дію різних фармакологічних засобів у динаміці розвитку експериментального псоріазу використовували метод одно- і двохфакторного дисперсійного аналізу (ДДА; аналіз 2-Way ANOVA), суть якого полягає в статистичному вивченні та проведенні оцінки вірогідності впливу факторів «Час» і «Засіб» у різних їх градаціях, а також у взаємодії цих факторів на ефект, що характеризується змінами значення показника товщини епідермісу шкіри. Для цього будували фіксовану (I), змішану (II) та випадкову (III) математичні моделі, в яких один із експериментальних факторів розглядався як фіксований, а інший – як випадковий, або обидва експериментальні фактори були випадковими.

В моделі I оцінювали всі ефекти відносно групової дисперсії. В моделі II ефект випадкового фактору оцінювали відносно його взаємодії з фіксованим, а ефект фіксованого фактора і взаємодію незалежної перемінної оцінювали відносно внутрішньогрупової дисперсії. В моделі III основні ефекти оцінювали відносно їх взаємодії, а саму взаємодію незалежних перемінних оцінювали відносно внутрішньогрупової дисперсії.

Для оцінки ефектів впливу фактору «Час» у градаціях: А – 14 діб; Б – 28 діб, а також фактору «Засіб» у градаціях: а – «Патологія» (Pathol.); б – «Препарат порівняння» (Ref.); с – «Засіб ОНМ» (ОНМ); d – «Засіб ОНМ+Д» (ОНМ+Д) використовували метод ДДА, який при дослідженні варіацій результативної ознаки

під впливом одного або кількох факторів дозволяє одержати, окрім загальних оцінок істотності залежностей, оцінку відмінностей у величині середніх, що формуються при різних рівнях факторів, а також істотності за умови взаємодії цих факторів. Для цього в ході проведення аналізу дотримувалися послідовності етапів його виконання: 1) визначали та розкладали варіації; 2) визначали число ступенів свободи варіацій; 3) обчислювали дисперсії та їх співвідношення; 4) аналізували дисперсії та їх співвідношення; 5) оцінювали вірогідність різниці між середніми та формулювали висновки щодо перевірки нульової гіпотези.

У відповідності до поставлених завдань проводили оцінку істотності відмінностей морфометричних показників між груповими середніми в градаціях факторів «Час» (А, Б) та в градаціях фактору «Засіб» (а, b, c, d); оцінку вірогідності взаємодії двох факторів «Час» (А, Б) і «Засіб» (а, b, c, d); оцінку істотності відмінностей між парами середніх значень морфометричного показника у градаціях факторів «Час» (А, Б) та «Засіб» (а, b, c, d).

Результати оцінки змін показників, отримані в ході проведених досліджень за результатами ДДА представляли даними: суми квадратів – SS; числом ступенів свободи – df; середнім квадратом ефекту – MS; значенням відношення дисперсій – F; статистичної значимості відмінностей – p; значенням внеску експериментального фактора в реалізацію ефекту – P (%), який визначали на підставі оцінки значення частковий ета-квадрат (Partial eta-squared). Результати аналізу даних ДДА на графіку представляли значенням групової середньої – M і довірчим інтервалом – ДІ 95 %.

Статистична обробка даних. Статистичну обробку результатів досліджень було виконано за допомогою програмного забезпечення Excel 2016 шляхом розрахунку середнього значення показників, що досліджувались (M) та стандартного відхилення (SD). t-критерій Стьюдента використовувався для оцінки рівнів значимості відмінностей середніх значень між групами. Розрахунки виконувались за допомогою програмного забезпечення STATISTICA 6.0. За достовірні вважались відмінності з вірогідністю мінімум 95 % ($p < 0,05$).

РОЗДІЛ 3

СКРИНІНГОВЕ ФАРМАКОЛОГІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ТЕСТ-ЗРАЗКІВ КРЕМУ З ОЧИЩЕНИМ НАФТАЛАНОВИМ МАСЛОМ ТА ВИЗНАЧЕННЯ ОПТИМАЛЬНОГО СКЛАДУ ЛІКАРСЬКОЇ ФОРМИ ЗА ДІЮЧОЮ ТА ДОПОМІЖНИМИ РЕЧОВИНАМИ

Завданням даного етапу дисертаційного дослідження було проведення скринінгового дослідження за аналгетичною та протизапальною видами активностей нових м'яких лікарських форм з різним складом активних і допоміжних фармацевтичних інгредієнтів (нафталанської нафти, очищеного нафталанового масла, вазелінового масла) на гідрофільній кремовій основі. Методологія дослідження базувалася на принципах сліпого фармакологічного скринінгу *in vivo*, що забезпечило максимальну об'єктивізацію отриманих даних. З метою забезпечення принципу «сліпого» дослідження ТЗ були марковані номерами від №1 до №5, без розкриття їхнього якісного складу до завершення експериментальної фази. Після завершення експерименту та статистичної обробки отриманих даних було розкрито кодування якісного складу ТЗ (табл. 3.1), що дозволило провести повний аналіз результатів між складом ТЗ та їхньою фармакологічною активністю. Аналгетичну та протизапальну активність ТЗ проводили на стандартизованій моделі експериментального запального процесу – карагінан-індукованого набряку в лабораторних щурів. Усі дослідження сплановані та проведені відповідно до рекомендацій міжнародних наукових організацій з вивчення больового синдрому та запальних процесів при гострому та хронічному перебігу [16, 72, 99].

Таблиця 3.1 – Склад досліджуваних ТЗ кремів, що піддавалися скринінговому дослідженню

Тест-зразок, шифр	Вміст речовин, % кількість в тест-зразках				Основа ТЗ
	Очищене нафталанове масло	Нафталанська нафта	Вазелінове масло	Гідрокортизону ацетат	
ТЗ №1	-	-	10,0	-	Гідрофільна
ТЗ №2	-	10,0	-	-	Гідрофільна
ТЗ №3	10,0	-	-	-	Гідрофільна
ТЗ №4	15,0	-	-	-	Гідрофільна
ТЗ №5 (ІІІ)	-	-	-	1,0	Гідрофільна

Примітка:

ТЗ- тест-зразок

3.1 Вивчення аналгетичної дії

Упродовж усього терміну спостереження у тварин інтактної групи, спостерігалася нормальна фізіологічна поведінкова активність, вони адекватно реагували на зовнішні подразники й мали охайний зовнішній вигляд, активно споживали корм та воду. Порушень вегетативних функцій організму у тварин інтактної та контрольної груп не зафіксовано.

За даними статистичної обробки показника ПБЧ було визначено, що середнє значення складало у популяції, взятій для дослідження $5,66 \pm 0,27$ с. В інтактних тварин не спостерігалось суттєвого коливання показника ПБЧ (табл. 3.2). Вплив патогенного агента (карагінану) характеризувався зниженням ПБЧ у тварин групи контрольної патології, починаючи з першої години від його введення, на 11,5 % та на 14,6 % через 2 та 4 години від індукції запалення.

Результати досліджень, отримані в експериментальній групі тварин №3 (n=9), є свідченням появи знеболювальної активності ТЗ крему №1, що містить у своєму складі 10 % вазелінове масло, на рівні 28,0 % через 2 години після введення карагінану. Зважаючи на те, що за детального аналізу значення ПБЧ у кожній окремої тварини цієї групи було зафіксоване зниження цього показника у трьох з дев'яти тварин, було прийняте рішення щодо збільшення кількості тварин у групі ще на п'ять щурів (на три самці та дві самки) з паралельним проведенням досліду

з групою контрольної патології та групою ПП (крем з 1 % гідрокортизону ацетату), що також призвело до збільшення кількості тварин у двох останніх групах.

Було встановлено, що ПБЧ у всіх тварин додаткової групи за застосування ТЗ №1 все ж таки зростав (майже на 19,0 % порівняно до вихідних значень) через 2 години від уведення карагінану. Тому в табл. 3.2 надаються узагальнені значення ПБЧ та АА, що отримані за дослідження цих показників у 14 особин (по 7 щурів кожної статі). До речі, отриманий результат є свідченням відсутності залежності знеболювальної активності ТЗ №1 від статі тварин. Якщо через 2 години від індукції запалення відмічалася антиноцицептивна активність ТЗ №1 на рівні 19,3 %, то через 4 години від застосування флогогену відзначався дуже низький ступінь знеболення при застосуванні ТЗ №1 – 3,6 %.

Дані, отримані через 2 години від уведення карагінану за застосування ТЗ №2, свідчили про незначне зростання ПБЧ у чотирьох (по дві тварини кожної статі) з дев'яти тварин. У решти щурів реєструвалося зниження ПБЧ. Тому для дослідження долучено ще п'ять щурів (три самці та дві самки). У всіх тварин додаткової групи виявлено зниження ПБЧ від вихідного значення через 2 год від уведення флогогену. Таким чином, загальна кількість тварин у дослідженні становила $n=14$, з рівним розподілом за статтю (по 7 особин кожної статі). Сукупні результати надані в табл. 3.2.

Методологія оцінки ефективності досліджуваних ТЗ базувалася на вимірюванні ПБЧ у двох часових точках: через 2 та 4 години після індукції запального процесу. Результати продемонстрували значну варіабельність АА досліджуваних ТЗ. Зокрема, ТЗ №2 продемонстрував слабку АА (4,9 %) лише на ранній стадії запалення, через 2 години після введення карагінану. Цікаво, що цей ефект виявився короткотривалим, і вже через 4 години спостерігалось зниження ПБЧ на 9,0 % порівняно з контрольною групою, що свідчить про відсутність пролонгованого аналгетичного ефекту. Тест-зразкам №3 та №4 була не притаманна знеболювальна дія в жодну із досліджуваних фаз запального процесу. При їх застосуванні посилювалися больові відчуття у тварин і через 2 години, і через 4

години після індукції запалення. Це спостереження вказує на проноцицептивний ефект даних ТЗ.

Таблиця 3.2 – Динаміка порогу больової чутливості ($M \pm m$, с) у щурів та аналгетична активність (АА) ТЗ кремів на фоні запалення, індукованого карагінаном

Експериментальні групи тварин		Термін спостереження, год		
		0 (вихідні значення)	2	4
Інтактний контроль (n=6)		$5,61 \pm 0,14$	$5,58 \pm 0,27$	$5,65 \pm 0,24$
Контрольна патологія (n=20)		$5,56 \pm 0,24$	$4,92 \pm 0,19^*$	$4,75 \pm 0,21^*$
% (до значення - 0)		-	-11,5	-14,6
ТЗ №1 – 10 % вазелінове масло, гідрофільна основа, крем (n=14)	КН	$5,89 \pm 0,28$	$5,87 \pm 0,29^{\#}$	$4,92 \pm 0,4^*$
	АА	-	19,3	3,6
ТЗ №2 – 10 % нафталанська нафта, гідрофільна основа, крем (n=14)	КН	$5,63 \pm 0,40$	$5,16 \pm 0,37$	$4,31 \pm 0,29^*$
	АА	-	4,9	-9,2
ТЗ №3 – 10 % очищене нафталанове масло, гідрофільна основа, крем (n=7)	КН	$6,13 \pm 0,28$	$4,73 \pm 0,36^*$	$4,17 \pm 0,25^*$
	АА	-	-3,9	-12,2
ТЗ №4 – 15% очищене нафталанове масло, гідрофільна основа, крем (n=7)	КН	$5,19 \pm 0,28$	$4,50 \pm 0,40$	$4,63 \pm 0,39$
	АА	-	- 8,5	-2,5
ПП – 1 % крем з гідрокортизоном ацетатом (n=11)	КН	$5,62 \pm 0,30$	$6,07 \pm 0,27^{\#}$	$5,79 \pm 0,22^{\#}$
	АА	-	23,4	21,9

Примітка:

1. $\#$ - $p < 0,05$ відносно вихідного значення у даній групі.
2. $*$ - $p < 0,05$ відносно значення у тварин контрольної групи на відповідний термін спостереження.

Препарат порівняння, що містив 1 % гідрокортизону ацетату на гідрофільній кремовій основі, виявив найвищу АА на рівні 23,4–21,9 % протягом усього періоду спостереження.

Тест-зразок №1 (10 % вазелінового масла на гідрофільній кремовій основі) продемонстрував помірну АА на рівні 19,3 % через 2 години після індукції запалення, що було співставно з ефективністю ПП. Однак, його ефективність знижувалася у пізній фазі запалення.

Суттєвої різниці між значенням ПБЧ у тварин обох статей під час застосування ТЗ №1–№4 та ПП не виявлено.

3.2 Вивчення протизапальної дії

За умов розвитку експериментального запального процесу, індукованого підшкірним уведенням карагінану, відразу після введення патогенного агента спостерігалася реактивна фаза запалення, що характеризувалася почервонінням стопи, а впродовж перших 10–15 хвилин – відмічалася поява та наростання набряку. Клінічні ознаки місцевого запального процесу посилювалися впродовж 2,5 години. У тварин із індукованим запальним процесом спостерігалася уповільнення рухової активності в межах клітки, з мінімальним навантаженням вони опиралися на уражену кінцівку. Інших відхилень у поведінці тварин не спостерігалася, змін вегетативних функцій, стану видимих слизових оболонок та шерстного покриву не виявлено.

Застосування досліджуваних ТЗ кремів у деяких тварин із зазначених груп відзначалася нетривала до 3 секунд вокалізація під час нанесення крему на ушкоджену кінцівку. За умов м'якої фіксації тварини були спокійними, активно рухали головою, кінцівками, хвостом. Після посадки їх у клітки, без підстилки, епізодів злизування крему з кінцівки не зафіксовано, як і не відзначено змін у поведінкових та рухових реакціях.

При проведенні дослідження було здійснено моніторинг змін об'єму стопи у щурів. Аналіз отриманих результатів виявив, що у групі інтактних щурів об'єм стопи залишався стабільним протягом усього періоду спостереження, що відображено у табл. 3.3. Суттєвої різниці між значенням досліджуваного показника у здорових тварин різних статей не виявлено.

У щурів групи контрольної патології, що піддавалися впливу флогогенного агента, реєструвався суттєвий приріст об'єму стопи. Кількісна оцінка цього процесу показала, що через 2 години після індукції запалення об'єм ураженої стопи збільшився на +38,1 % порівняно з базовим рівнем. Ця тенденція зберігалася і на більш пізньому етапі – через 4 години після ін'єкції карагінану спостерігалася збільшення об'єму на +37,2 % порівняно з вихідними значеннями.

Таблиця 3.3 – Об'єм стопи ($M \pm m$, у. о.) у щурів та протизапальна активність (ПЗА) за застосування ТЗ кремів №1, №2, №3, №4 і ПП на фоні запалення, індукованого карагінаном

Експериментальні групи тварин		Термін спостереження, год		
		0	2	4
Інтактний контроль (n=6)		$1,14 \pm 0,02$	$1,13 \pm 0,02$	$1,14 \pm 0,02$
Контрольна патологія (n=20) % (до вихідного значення - 0)		$1,13 \pm 0,02$ -	$1,56 \pm 0,03^*$ +38,1 %	$1,55 \pm 0,06^*$ +37,2 %
ТЗ №1 – 10 % вазелінове масло, гідрофільна основа, крем (n=14)	КН	$1,12 \pm 0,04$	$1,36 \pm 0,05^{* \#}$	$1,43 \pm 0,04^*$
	ПЗА	-	12,8 %	7,7 %
ТЗ №2 – 10 % нафталанська нафта, гідрофільна основа, крем (n=14)	КН	$1,09 \pm 0,04$	$1,43 \pm 0,04^{* \#}$	$1,54 \pm 0,03^*$
	ПЗА	-	8,3 %	0,6 %
ТЗ №3 – 10 % очищене нафталанове масло, гідрофільна основа, крем (n=7)	КН	$1,12 \pm 0,02$	$1,20 \pm 0,04^{* \#}$	$1,30 \pm 0,07^{* \#}$
	ПЗА	-	23 %	16 %
ТЗ №4 – 15% очищене нафталанове масло, гідрофільна основа, крем (n=7)	КН	$1,15 \pm 0,07$	$1,42 \pm 0,04^{* \#}$	$1,43 \pm 0,07^*$
	ПЗА	-	8,9 %	7,7 %
ПП №5 – крем 1 % гідрокортизону ацетат (препарат порівняння на гідрофільній основі) (n=11)	КН	$1,24 \pm 0,06$	$1,39 \pm 0,07^{\#}$	$1,27 \pm 0,08^{\#}$
	ПЗА	-	10,9 %	18,1 %

Примітка:

1. $\#$ - $p < 0,05$ відносно вихідного значення у даній групі.
2. $*$ - $p < 0,05$ відносно значення у тварин контрольної групи на відповідний термін спостереження.

Результати дослідження продемонстрували варіабельну протизапальну активність (ПЗА) досліджуваних ТЗ кремів. Найвищу ефективність виявив ТЗ №3, що містив 10 % ОНМ на гідрофільній кремовій основі. Даний зразок продемонстрував ПЗА на рівні 23,0 % через 2 години після індукції запалення, що перевищувало показники ПП (крем з 1 % гідрокортизоном ацетатом). Важливо відзначити, що ефективність ТЗ №3 зберігалася на високому рівні і через 4 години після введення флогогенного агента, залишаючись співставною з ПП. Тест-зразок №1 (10 % вазелінове масло на гідрофільній кремовій основі) продемонстрував помірну ПЗА на рівні 12,8 % через 2 години після індукції запалення, що було співставно з ефективністю ПП. Однак, його ефективність знизилася до 7,7 % через 4 години, що свідчить про короткотривалий протизапальний ефект даної композиції.

Тест-зразки №2 та №4 продемонстрували помірну ПЗА на рівні 8,3 % та 8,9 % відповідно через 2 години після введення карагінану. Ці показники були дещо

нижчими за ефективність ПП. Через 4 години спостереження ТЗ №2 втрачав свою протизапальну активність, тоді як зразок №4 зберігав ПЗА на рівні 7,7 %, що, втім, було значно нижче за показники ПП.

Препарат порівняння (крем з 1 % гідрокортизону ацетатом) продемонстрував ПЗА на рівні 10,9 % через 2 години після індукції запалення, з подальшим підвищенням ефективності до 18,1 % через 4 години.

Таким чином, результати дослідження ТЗ кремів №1–№4 та ПП свідчать про високу ПЗА ТЗ крему №3 в обидві фази запального процесу. Тест-зразок крему №1 продемонстрував короткотривалу ПЗА через 2 години від уведення карагінану, співставну з ПП ТЗ №5 у ранній фазі запалення. Тест-зразки №2 та №4 виявили помірну ПЗА, яка була нижчою за ефективність ПП.

Висновки до розділу 3

1. У досліджуваних тест-зразків з нафтопродуктів на гідрофільній кремовій основі №1 (10 % вазелінове масло), №2 (10 % нафталанська нафта), №3 (10 % очищене нафталанове масло), №4 (15% очищене нафталанове масло), препарату порівняння (1 % гідрокортизону ацетат), була відсутня місцево-подразнювальна дія при однократному нашкірному нанесенні.

2. За результатами скринінгового дослідження аналгетичної активності тест-зразків виявлено, що тест-зразок крему №1 (10 % вазелінове масло) продемонстрував помірну короткотривалу аналгетичну активність (19,3 %) лише через 2 години після індукції запалення, фактично, на рівні препарату порівняння (тест-зразок №5 (1 % гідрокортизону ацетат)). Препарат порівняння (тест-зразок №5) проявив стабільну аналгетичну активність на рівні 23,4–21,9 % у різні фази запального процесу. Тест-зразки №2, №3 та №4 не продемонстрували значущої аналгетичної дії, а у випадку зразків з очищеним нафталановим маслом спостерігалось навіть зниження порогу больової чутливості.

3. Дослідження протизапальної активності (за протинабряковою дією) виявило, що найвищу протизапальну активність продемонстрував тест-зразок №3 (10 % очищене нафталанове масло), через 2 години після індукції запалення

досягла 23,0 % (вдвічі вища за активність препарату порівняння) та через 4 години зберіглася активність на рівні 16,0 % (на рівні препарату порівняння). Тест-зразок №1 (10 % вазелінове масло) виявив помірну протизапальну активність (12,8 %) лише в ранній фазі запалення. Тест-зразкам №2 (10 % нафталанська нафта) та №4 (15 % очищене нафталанове масло) властива помірна протизапальна (протинабрякова, антиексудативна) активність.

4. За результатами проведених експериментальних скринінгових фармакологічних досліджень протизапальної та аналгетичної активності *in vivo* на моделі карагінанового набряку тест-зразків кремів різного складу виявлено, що тест-зразок крему №3, що містив в своєму складі 10 % очищене нафталанове масло, продемонстрував хоча слабку протизапальну активність (16,0 – 23,0 %), але вона була найбільшою серед кремів з нафтопродуктами, що досліджувалися.

5. В низьку протизапальну та аналгетичну активність очищеного нафталанового масла, його не доцільно використовувати як активний фармацевтичний інгредієнт (АФІ), а як допоміжну речовину для розробки дерматологічних лікарських форм, при цьому оптимальним вважається його 10 % вміст. Але для цього доцільно комбінувати очищене нафталанове масло з речовинами з більш вираженими фармакологічними (зокрема протизапальними, аналгетичними або ін.) властивостями.

Даний розділ висвітлено в матеріалах наступної публікації:

Zaychenko G, Gorchakova N, Horbach A, Stan I, Simonov P. Teoretychne y eksperymentalne obgruntuvannia rozrobky dermatolohichnykh likarskykh zasobiv na osnovi pryrodnykh spoluk naftalanskoi nafty [Theoretical and experimental justification of development of dermatological medicinal products based on natural compounds of Naftalan oil]. *Fitoterapiia. Chasopys – Phytotherapy. Journal.* 2024;3:52–61. doi:10.32782/2522-9680-2024-3-52.

РОЗДІЛ 4

ПОГЛИБЛЕНЕ ФАРМАКОЛОГІЧНЕ ВИВЧЕННЯ НОВИХ КРЕМІВ З ОЧИЩЕНИМ НАФТАЛАНОВИМ МАСЛОМ

Метою даного етапу дослідження було вивчення специфічної антипсоріатичної активності найбільш перспективного ТЗ крему із 10 % ОНМ, що був відібраний нами на попередньому етапі скринінгового фармакологічного дослідження. Також були досліджені ТЗ кремів комбінованого складу, що містили 10 % ОНМ з 2 % дротаверином.

Вибір експериментальної моделі псоріазу, яку відтворювали за допомогою ІМQ, є найбільш релевантною експериментальною моделлю за даними сучасних наукових публікацій.

Поглиблене дослідження антипсоріатичної активності ТЗ кремів проводилося на основі комплексної оцінки. Зокрема, включалися дані макроскопічного та мікроскопічного аналізу стану шкіри, а також вивчення наявності у кремів аналгетичної та протизапальної видів дії.

4.1 Порівняльний аналіз дозових режимів іміквімоду для моделювання псоріазоподібного ураження шкіри мишей лінії BALB/c

На етапі моделювання псоріазоподібного ураження шкіри виникла необхідність визначення оптимального дозового режиму, оскільки в літературних джерелах описано два варіанти дозування іміквімоду (ІМQ), які найчастіше використовуються для цієї моделі. Згідно з літературними даними, індукція псоріазоподібного ураження шкіри у мишей лінії BALB/c може бути досягнута шляхом топічного нанесення ІМQ в дозах 42,0 мг та/або 62,5 мг на поголену ділянку шкіри тварини площею 6 см² [3, 8]. Для дослідження ступеня тяжкості ураження поголеної ділянки шкіри та інтегральних показників життєдіяльності тварин, включаючи летальність, були сформовані дві окремі групи для нанесення ІМQ у вище зазначених дозах.

Порівняльний аналіз двох дозових режимів моделювання псоріазоподібного ураження за динамікою маси тіла, та оцінкою зміни з боку шкіри за допомогою індексу mPASI.

За результатами проведених досліджень встановлено, що маса тіла у тварин, яким наносили на шкіру IMQ у дозі 42,0 мг на 6 см², суттєво не змінювалася упродовж 10-денного періоду спостереження (було здійснено дев'ятиразове нанесення патогенного агента). Хоча, її несуттєве зниження (на 3,4 %) відзначалося у перші три доби від початку індукції патологічного стану (табл. 4.1).

Таблиця 4.1 – Маса тіла ($M \pm m$, г) мишей лінії BALB/c при нанесенні IMQ в різних дозах

Термін, доба	Доза іміквімоду, мг/тварину	
	42,0 (n=6)	62,5 (n=6)
Вихідне значення	20,3 $\pm$ 1,5	23,6 $\pm$ 0,5
1	19,6 $\pm$ 1,5	23,6 $\pm$ 0,5
2	19,6 $\pm$ 0,5	24,0 $\pm$ 1,0
3	23,0 $\pm$ 5,2	24,6 $\pm$ 1,1
4	20,3 $\pm$ 1,1	26,3 $\pm$ 1,1
5	21,0 $\pm$ 1,0	25,3 $\pm$ 0,5
6	20,6 $\pm$ 1,5	25,3 $\pm$ 0,5
7	20,3 $\pm$ 1,1	26,3 $\pm$ 1,1
8	20,0 $\pm$ 1,0	25,0 $\pm$ 1,7
9	19,3 $\pm$ 1,5	26,3 $\pm$ 1,1
10	20,0 $\pm$ 1,0	26,3 $\pm$ 1,1

Найбільше зменшення маси тіла в експериментальних тварин на 8,3 % спостерігалось після третього нанесення IMQ в дозі 62,5 мг на тварину. В подальшому реєструвався приріст маси тіла, і до кінця експерименту цей показник наближався до вихідного значення. Тварини обох експериментальних груп мали нормальну рухову активність, адекватно реагували на зовнішні подразники, демонстрували збережений апетит. Візуальна оцінка загального стану – тварини мали охайний шерстний покрив, видимі слизові оболонки були світло-рожевого кольору. Протягом всього періоду спостереження не зареєстровано летальних випадків.

Для визначення оптимальної дози патогенного агента для подальшого її використання проведено порівняльну оцінку змін з боку органу-мішені шкіри, за індексом mPASI при застосуванні IMQ. В експериментальній групі мишей, яким щоденно протягом 9 днів наносили IMQ у дозі 42,0 мг на тварину 1 раз на добу, візуальні прояви псоріазоподібного ураження шкіри були менш помітними при візуальному обстеженні в різні терміни спостереження, ніж у мишей, яким наносили патогенний агент у дозі 62,5 мг на тварину (рис. 4.1).

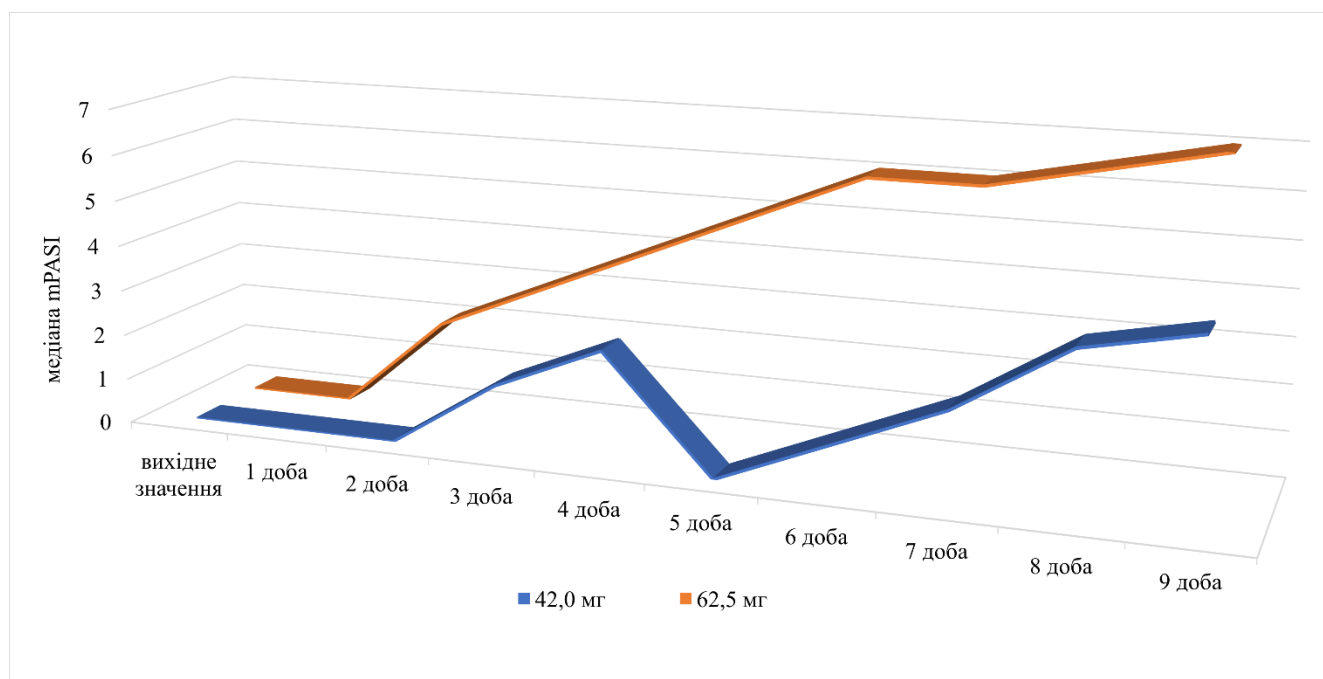


Рисунок 4.1 – Динаміка змін індексу mPASI у мишей лінії BALB/c при застосуванні різних доз IMQ (42,0 мг і 62,6 мг) для моделювання псоріазоподібного ураження шкіри (Me (Q25%; Q75%))

При дерматоскопічному дослідженні встановлено, що застосування IMQ в дозі 42,0 мг на тварину, через 3 доби від початку розвитку патологічного процесу, виявлялася слабка гіперемія, злущення епітелію відзначалися лише в 16,7 % (1 з 6) тварин в даній експериментальній групі. Потовщення шкірної складки не було зареєстровано в жодної тварини цієї групи. При застосуванні IMQ в дозі 62,5 мг ступінь ураження шкіри у цей же термін було більш вираженим (рис. 4.1). У групі тварин, яким наносили IMQ дозою 62,5 мг, зафіксовано поява патологічних ознак з другої доби, клінічно суттєвіші ознаки псоріазоподібного ураження шкіри у всіх

тварин даної групи (100 %). Ці зміни були більш інтенсивними порівняно з групою тварин, яким наносили патогенний агент у дозі 42,0 мг, що підтверджувалося як при візуальному, так і, при дерматоскопічному дослідженнях. При цьому, у тварин, яким наносили ІМҚ у дозі 42,0 мг на 3-ю добу індекс mPASI становив Me (Q25%; Q75%) = 1,0 (0,0; 2,0) бал, тоді як у тварин, які отримували дозу 62,5 мг, вже на 2-у добу індекс mPASI досягав Me (Q25%; Q75%) = 3,0 (2,0; 3,0) балів.

У групі тварин, яким наносили ІМҚ у дозі 42,0 мг, розвиток патологічного процесу мав нелінійний приріст. На 5-у добу відзначалося зменшення вираженості патологічних змін, і значення індексу mPASI знижувалося до Me (Q25%; Q75%) = 0,0 (0,0; 1,0) балів. Максимальне значення індексу mPASI при нанесенні ІМҚ 42,0 мг Me (Q25%; Q75%) = 4,0 (3,0; 4,0) бали на 9-у добу. Натомість, у тварин, що отримували більшу дозу, 62,5 мг, розвиток патологічного процесу характеризувався стабільним та лінійним збільшенням показника індексу mPASI, що досягав максимальних значень на 8–9-у добу експерименту.

Проведені порівняльні дослідження з оцінки індексу mPASI, що передбачає врахування таких ознак псоріазоподібного ушкодження шкіри, як гіперемія (еритема), потовщення шкірної складки (інфільтрація), лущення (десквамація) епітелію, засвідчили, що при топічному нанесенні ІМҚ у дозі 62,5 мг зазначений індекс суттєво перевищував такий, що відзначався при застосуванні режиму дозування 42,0 мг на тварину (рис. 4.1).

Отримані результати дослідження допомогли дійти висновку, що для подальших експериментальних досліджень, для відтворення патологічної моделі псоріазоподібного ураження шкіри доцільно обрати дозу індуктора патологічного процесу – ІМҚ – 62,5 мг на тварину, що наноситься на депільовану ділянку спини площею 6 см² протягом 9 діб щоденно.

Отже, вибір дози 62,5 мг ІМҚ для індукції псоріазоподібного ураження шкіри забезпечив оптимальний баланс між ефективністю моделювання патологічного стану та етичними міркуваннями щодо мінімізації дискомфорту експериментальних тварин. Це дозволило відтворити експериментальну модель для подальшої оцінки ефективності досліджуваних ТЗ кремів.

4.2 Вплив тест-зразків кремів на загальний стан і показники життєдіяльності мишей лінії BALB/с на моделі псоріазоподібного ураження шкіри

У межах даного етапу дослідження було проведено комплексну оцінку показників життєдіяльності експериментальних тварин в умовах моделювання патологічного процесу (без лікування) та їх змін під впливом досліджуваних ТЗ кремів. Основними параметрами оцінки були виживаність, динаміка маси тіла, поведінкові та вегетативні реакції.

Інтактна група тварин (ІК, позитивний контроль) демонструвала фізіологічно нормальну поведінкову активність протягом всього періоду спостереження. Ці тварини адекватно реагували на зовнішні подразники, мали охайний зовнішній вигляд, виявляли нормальну харчову поведінку з активним споживанням корму та води. порушень вегетативних функцій у тварин цієї групи не було зафіксовано.

В умовах індукції експериментального псоріазоподібного процесу, викликаного нашкірним нанесенням ІМQ дозою 62,5 мг/тварину, що зазначено вище, у мишей обох статей спостерігалися певні поведінкові зміни. Зокрема, відзначалося зниження рухової активності, упродовж світлового дня тварини «групувалися» у клітці, сидячи скупчено. Така поведінка була характерна для групи мишей позитивного контролю, але тварини адекватно реагували на зовнішні подразники, мали нормальну харчову поведінку. У тварин обох груп негативного контролю (з псоріазоподібним ураженням, індукованим ІМQ у різних дозах, без терапевтичного втручання) не було виявлено порушень вегетативних функцій.

Після моделювання патології ІМQ у дозі 62,5 мг, тварини були рандомізовані на групи для подальшого визначення ефективності досліджуваних ТЗ кремів.

Протягом 21-денного курсу нашкірного нанесення досліджуваних ТЗ кремів: з 10 % ОНМ; з 10 % ОНМ у комбінації з 2 % дротаверином; з 10 % вазеліновим маслом у комбінації з 2 % дротаверином та ПП – крем з 1 % гідрокортизоном бутиратом, на фоні псоріазоподібного ураження депільованої ділянки спини у мишей не спостерігалося суттєвих змін поведінкових реакцій, рефлексорної діяльності чи харчової поведінки. Тварини зберігали адекватну реактивність на

зовнішні подразники, активно рухалися у межах кліток. Протягом періоду спостереження не зафіксовано жодного випадку «облизування», «зчісування» поголеної ділянки шкіри спини, на яку наносився або патогенний агент або ТЗ кремів. Ці спостереження проводилися щоденно упродовж перших трьох годин після кожної аплікації.

Вимірювання маси тіла мишей, яким наносили ІМQ протягом дев'яти діб, проводили щоденно під час формування патологічного стану, а потім ще упродовж 21 доби після припинення нанесення патогенного агента у групі КП. Моніторинг маси тіла тварин усіх експериментальних груп здійснювався щоденно перед нанесенням досліджуваних ТЗ кремів або ПП.

Аналіз отриманих даних показав, що на момент формування псоріазоподібного ураження маса тіла мишей групи КП суттєво не відрізнялася з масою інтактних тварин. Через 7 діб після припинення нанесення ІМQ маса мишей групи КП знизилася на 10,7 % відносно даних, зареєстрованих на 10-ту добу дослідження від початку щоденного застосування ІМQ (період формування патологічного процесу – 9 діб). В подальші терміни спостереження, після припинення нанесення ІМQ на поголену шкіру спини мишей, не відзначалося зниження маси тіла тварин, а реєструвалося її зростання, тобто, відновлювався приріст маси тіла (табл. 4.2). Ця динаміка може свідчити про поступову нормалізацію метаболічних процесів після припинення дії патогенного фактору.

Таблиця 4.2 – Маса тіла ($M \pm m$, г) мишей лінії BALB/c після нанесення ТЗ кремів та ПП на фоні псоріазоподібного ушкодження шкіри, індукованого ІМQ

Експериментальні групи тварин (тест-зразки кремів)	Термін, доба лікування			
	0 (10-а доба від першого нанесення іміквімоду – початок лікування)	7	14	21
ІК	$21,5 \pm 1,00$	$20,9 \pm 0,45$	$21,0 \pm 1,00$	$21,07 \pm 0,88$
КП	$21,03 \pm 0,45$	$19,0 \pm 1,41$	$20,40 \pm 1,63$	$22,00 \pm 2,08$
ОНМ	$21,37 \pm 0,43$	$22,29 \pm 1,60$	$24,0 \pm 1,76$	$24,20 \pm 1,52$
ОНМ+Д	$22,14 \pm 1,12$	$23,86 \pm 1,99$	$26,57 \pm 1,19$	$27,20 \pm 1,88$
ВМ+Д	$20,14 \pm 0,33$	$20,43 \pm 1,81$	$22,57 \pm 1,89$	$20,8 \pm 1,89$
ПП	$22,33 \pm 0,23$	$21,33 \pm 0,56$	$22,17 \pm 0,60$	$20,50 \pm 0,24$

Приріст маси тіла у мишей упродовж усього терміну спостереження було зафіксовано при застосуванні досліджуваних ТЗ кремів 10 % ОНМ в комбінації з 2 % дротаверином та з 10 % ОНМ.

При аналізі впливу ПП на фоні патологічного процесу було виявлено несуттєве зниження маси тіла у мишей на 4,5 % через 7 діб після припинення його застосування відносно значення, що було зареєстроване на 10 добу (табл. 4.2). На 14-у та 21-у добу спостереження відзначалося зростання маси тіла тварин, яким наносили ПП, в інтактних та нелікованих тварин з псоріазоподібним ураженням шкіри.

При комплексній оцінці інтегральних показників життєдіяльності мишей визначено, що тварини обох статей як за наявності патологічного процесу, так і при застосуванні експериментальних ТЗ кремів з: 10 % ОНМ; 10 % ОНМ в комбінації з 2 % дротаверином; 10 % вазеліновим маслом в комбінації з 2 % дротаверином і ПП, не демонстрували порушень поведінкових і рефлексорних реакцій, активно рухалися та адекватно реагували на зовнішні подразники. При цьому не виявлено дерматотоксичної і місцевоподразнювальної дії, системного токсичного впливу досліджуваних кремів.

4.3 Макроскопічна оцінка ефективності досліджуваних тест-зразків кремів на моделі псоріазоподібного ураження шкіри у мишей лінії BALB/c

Моніторинг ступеня ураження шкіри здійснювався щоденно протягом усього експерименту, з 1-ї по 30-у добу спостереження. Оцінка проводилася макроскопічно за допомогою дерматоскопа із використанням індексу mPASI.

На 9-у добу формування патологічного процесу індекс mPASI у групі контрольної патології (КП) досягав $Me (Q25\%; Q75\%) = 7,0 (6,0; 8,0)$ балів, що вказувало на значне ураження шкіри (рис. 4.2).

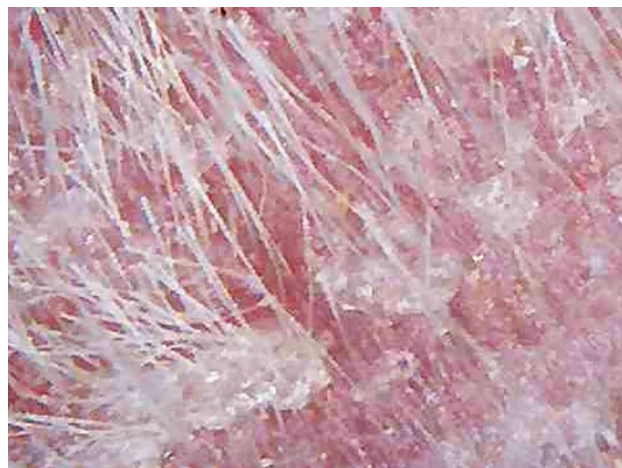


Рисунок 4.2 – Макроскопічні зміни шкіри мишей на 9- у добу відтворення моделі псоріазоподібного ураження шкіри (mPASI = 8,0)

Нанесення ІМҚ від 10-ї доби не здійснювалося. Це зумовлено тим, що через 9 діб від першого нанесення ІМҚ у всіх тварин був сформований патологічний процес, що дозволило провести рандомізацію тварин за групами для подальшого дослідження ефективності кожного з ТЗ кремів.

Аналіз динаміки індексу mPASI у нелікованих тварин (експериментальна група КП) свідчить про значне ушкодження поголеної ділянки шкіри мишей лінії BALB/c, індуковане ІМҚ, протягом дев'яти днів формування патологічного процесу. У подальші терміни спостереження відзначалася тенденція до поступового зниження індексу mPASI (рис. 4.3), але ознаки ураження шкіри тварин все ж зберігалися протягом усього експериментального періоду (до 30-ї доби).

Після завершення періоду індукції псоріазоподібного ураження шкіри мишей, протягом якого здійснювався моніторинг уражень шкіри за допомогою індексу mPASI, починаючи з 10-ї доби, на ушкоджену ділянку шкіри тварин наносили досліджувані ТЗ кремів з: 10 % ОНМ; з 10 % ОНМ в комбінації з 2 % дротаверином; з 10 % вазеліновим маслом в комбінації з 2 % дротаверином та ПП.

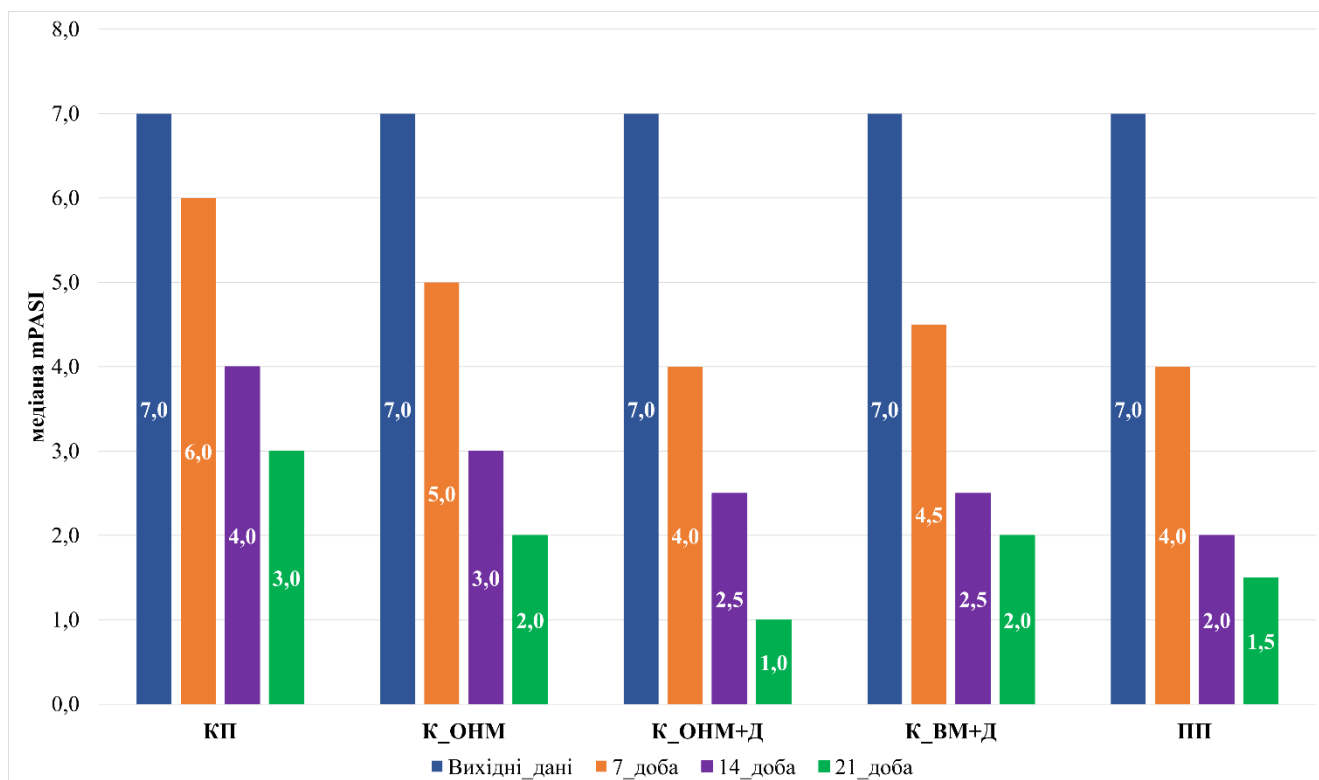


Рисунок 4.3 – Ефективність досліджуваних тест-зразків кремів і ПП на фоні псоріазоподібного ураження шкіри мишей лінії BALB/c, індукованого IMQ у дозі 62,5 мг на тварину

Аналіз динаміки індексу mPASI дозволив виявити диференційовану ефективність досліджуваних ТЗ кремів щодо зменшення тяжкості псоріазоподібного ураження шкіри у мишей лінії BALB/c.

Тест-зразок однокомпонентного крему з 10 % ОНМ продемонстрував найслабшу ефективність серед досліджуваних варіантів за ознаками зменшення індексу mPASI упродовж усього періоду лікування (21 доба) лише до значень Me (Q25%; Q75%) = 2,0 (1,0; 3,0) бали.

Тест-зразок крему з 10 % вазеліновим маслом в комбінації з 2 % дротаверином показав помірну ефективність, яка поступалася крему з 10 % ОНМ на 7-ї добу лікування. На цей момент індекс mPASI під впливом крему з вазеліновим маслом зменшився лише до 4,5 (1,0; 6,0) балів, на 14-у обидва креми виявляли однакову ефективність, що дорівнювала 2,5 балів, а на 21-у добу лікування менше значення

індексу – 2,0 (1,0; 3,0), ніж у крему з ОНМ, що свідчило про його слабшу антипсоріатичну дію.

Значні антипсоріатичні властивості продемонстрував ТЗ крему з 10 % ОНМ в комбінації з 2 % дротаверином. Уже через 7 діб від початку лікування відзначалося зниження індексу mPASI до Me (Q25%; Q75%) = 4,0 (2,0; 6,0) балів, що свідчить про швидкий початок дії препарату. Надалі ефективність цього ТЗ залишалася найвищою серед усіх досліджуваних зразків, що підтверджувалося найнижчими значеннями індексу mPASI наприкінці лікування – дорівнювало 1,0 (0,0; 1,0) бал.

Додатково варто зазначити, що тест-зразок крему з 10 % ОНМ в комбінації з 2 % дротаверином продемонстрував ефективність, співставну з показниками препарату порівняння уже через 7 і 14 діб лікування, коли індекс mPASI досяг Me (Q25%; Q75%) = 2,0 (2,0; 3,0), та навіть перевищив його за ефективністю через 21 добу, зі значеннями Me (Q25%; Q75%) = 1,5 (0,0; 3,0). Це свідчить про високу антипсоріатичну активність даного тест-зразка, яка забезпечила більш ефективне усунення ушкоджень шкіри, спричинених індукцією ІМQ, у порівнянні з іншими зразками, в т.ч. кортикостероїдом гідрокортизону бутиратом.

4.4 Дослідження аналгетичної активності тест-зразків кремів на моделі посиленого карагінаном псоріазоподібного ураження шкіри у мишей лінії BALB/c

Оцінка больової реакції у мишей лінії BALB/c за умов іміквімодового (ІМQ) псоріазоподібного ураження шкіри.

При аналізі показника ПБЧ у популяції тварин, узятій до експерименту було визначено, що його середнє значення становило $(8,11 \pm 0,89)$ с. В інтактних тварин (група ІК) ПБЧ не змінювався упродовж 14 діб спостереження, а через 21 добу реєструвалося зростання на 13,8 % цього показника відносно до вихідного значення (табл. 4.3). Встановити причину зменшення больової чутливості у мишей інтактної групи наразі неможливо. Вірогідно, за проведення додаткових досліджень її можна буде визначити. Водночас, виникло припущення, що така реакція може бути пов'язана з особливостями функціонування відділів ЦНС у мишей лінії BALB/c,

що «відповідальні» за ноцицепцію, особливостями їхніх поведінкових реакцій, адаптивних, що зумовлені звиканням до дослідника, до експериментальних процедур тощо.

У групі КП на фоні псоріазоподібного ушкодження шкіри у мишей (в період формування патології через 9 діб від початку нанесення ІМQ) реєструвалося значення ПБЧ, що було лише на 1,2 % нижчим ($8,01 \pm 0,62$, $n = 6$) с за вихідне значення в популяції – ($8,11 \pm 0,89$) с. Тобто, упродовж формування патологічного процесу не реєструвалося суттєвого зниження ПБЧ, що можна розцінювати як факт відсутності посилення больового відчуття у мишей на фоні розвитку псоріазоподібного ураження шкіри ІМQ. Отриманий результат може бути свідченням того, що ІМQ не притаманна алгогенна дія. У групі КП через 14 діб після припинення нанесення ІМQ не було зареєстровано значних змін ПБЧ. Однак, через 21 добу ПБЧ у нелікованих мишей зріс на 20,8 % порівняно з вихідним значенням у досліджуваній популяції $8,11 \pm 0,89$ с та на 6,2 % відносно цих показників у групі інтактних тварин.

Таблиця 4.3 – Динаміка порогу больової чутливості ($M \pm m$, с) у мишей за дії ТЗ кремів на фоні запалення, індукованого ІМQ

Експериментальні групи тварин	Поріг больової чутливості (ПБЧ), с	
	14 доба	21 доба
Інтактний контроль (ІК)	$8,13 \pm 0,67$	$9,23 \pm 0,33$
Контрольна патологія (КП)	$8,04 \pm 0,74$	$9,80 \pm 0,89$
Очищене нафталанове масло (ОНМ)	$8,09 \pm 0,54$	$9,22 \pm 0,69$
Очищене нафталанове масло в комбінації з дротаверином (ОНМ+Д)	$7,53 \pm 0,20$	$8,12 \pm 0,83$
Препарат порівняння (ПП)	$7,65 \pm 0,53$	$8,55 \pm 0,74$

Ефекти, що зареєстровані в інтактних мишей та у тварин з псоріазоподібним ураженням шкіри аналогічні за напрямком, але різняться за інтенсивністю. Більш виражене підвищення ПБЧ у мишей з псоріазоподібним ушкодженням поголеної ділянки шкіри (на 20,8 %) через 21 добу спостереження більш значиме, порівняно з інтактними тваринами (на 13,8 %). Наукове обґрунтування цього факту потребує подальших досліджень. Передбачення щодо причин підвищення ПБЧ у мишей з

псоріазоподібним ураженням шкіри аналогічні до вищевикладених, що стосуються інтактних тварин зазначеної лінії.

При застосуванні ПП спостерігалось зниження ПБЧ на 5,9 % відносно показників інтактних мишей та на 4,9 % відносно даних у нелікованих тварин через 14 діб від початку нанесення ПП. Через 21 добу при щоденному застосуванні ПП на фоні патологічного процесу ПБЧ був знижений на 12,8 % відносно даних у нелікованих мишей. Таким чином, ПП проявляв незначну аллогенну дію на фоні псоріазоподібного ушкодження шкіри мишей. Таким чином, ПП проявляв незначну аллогенну дію на фоні псоріазоподібного ушкодження шкіри мишей.

Всі тест-зразки кремів, за винятком ТЗ крему з 10 % ОНМ, проявили аллогенну дію на 14 добу від початку лікування, за аналогічним ступенем до дії ПП.

Тест-зразок крему з 10 % ОНМ не впливав на больову чутливість мишей з псоріазоподібним ураженням шкіри протягом усього періоду спостереження. Больова чутливість у лікованих мишей за застосування усіх дослідних ТЗ через 21 добу від початку лікування, фактично, не змінювалася, про що свідчить показник ПБЧ, коливання якого не мало закономірного характеру та суттєвого значення порівняно до значень як у нелікованих тварин, так і у мишей, яких лікували ПП.

Оцінка больової реакції у мишей лінії BALB/c за умов додатково індукованого запального процесу.

При застосуванні досліджуваних ТЗ кремів не лише при псоріазоподібному ураженні шкіри, а й при посиленні больового відчуття за додатково індукованого запального процесу, відтворено одну з класичних моделей болю та запалення. Мишам групи КП (неліковані тварини), тваринам усіх груп, яким на поголену ділянку шкіри наносили ТЗ кремів та ПП, здійснено додаткове введення карагінану через 14 діб від початку лікування.

Результати дослідження демонструють, що у тварин інтактною групи спостерігалось зниження ПБЧ через 2 години після введення карагінану, що свідчить про загострення больового відчуття, а через 4 години реєструвалось значення ПБЧ, що на 5,8 % перевищувало вихідне (табл. 4.4).

Таблиця 4.4 – Динаміка порогу больової чутливості ($M \pm m$, с) у мишей лінії BALB/c при застосуванні ТЗ кремів на фоні псоріазоподібного ураження шкіри та запалення, індукованого карагінаном

Експериментальні групи тварин (тест-зразки кремів)	Вихідне значення	Через 2 год	Через 4 год
Інтактний контроль (ІК)	$8,13 \pm 0,67$	$7,77 \pm 0,30$	$8,60 \pm 0,93$
Контрольна патологія (КП)	$8,04 \pm 0,74$	$8,60 \pm 0,65$	$8,60 \pm 0,33$
Очищене нафталанове масло (ОНМ)	$8,09 \pm 0,54$	$9,60 \pm 0,81$	$8,94 \pm 0,50$
Очищене нафталанове масло в комбінації з дротаверином (ОНМ+Д)	$7,53 \pm 0,20$	$10,46 \pm 0,31^{\#}$	$9,74 \pm 0,32^{\#}$
Препарат порівняння (ПП)	$7,65 \pm 0,53$	$11,38 \pm 0,82^{\#}$	$10,55 \pm 0,38^{\#}$

Примітка. $\#$ - $p < 0,05$ відносно даних у тварин групи КП

Неочікуваний результат отримано при реєстрації ПБЧ у групі нелікованих тварин (група КП) – больова реакція на введення карагінану не посилювалася, а навпаки, дещо послаблювалася. Про це свідчило зростання ПБЧ майже на 7,0 % як через 2 години та через 4 години після індукції запалення.

При застосуванні досліджуваних ТЗ кремів та ПП спостерігалось зниження больових відчуттів у тварин усіх досліджуваних груп. Свідченням цього є зростання ПБЧ через 2 години та через 4 години після введення карагінану. Гендерних особливостей щодо знеболювальної / алгогенної дії ТЗ кремів та ПП не виявлено.

4.5 Дослідження протизапальної активності тест-зразків кремів на моделі псоріазоподібного ураження шкіри у мишей лінії BALB/c

Наявність псоріазу в анамнезі пацієнта асоціюється з підвищеним ризиком виникнення розвитку мультиморбідного стану, що характеризується коморбідністю з низкою серйозних патологічних станів, таких як: псоріатичний артрит, серцево-судинні ураження (інфаркт/інсульт), психічні розлади (низька самооцінка, тривога, депресія), певні види онкологічних захворювань, хвороба Крона, цукровий діабет, метаболічний синдром, ожиріння, остеопороз, увеїт, захворювання печінки та нирок [10, 11].

Оцінка протизапальної активності досліджуваних ТЗ кремів на моделі псоріазоподібного ураження шкіри та карагінан-індукованого запалення у мишей лінії BALB/с була наближена до коморбідного стану. Методологія даного етапу дослідження включала індукцію псоріазоподібного ураження шкіри спини у мишей лінії BALB/с шляхом аплікації ІМҚ та з подальшим введенням карагінану для посилення запального процесу. Протягом всього терміну експерименту не спостерігалось видимих змін об'єму стопи у всіх досліджуваних груп тварин, включаючи нелікованих, на фоні псоріазоподібного ураження шкіри. При індукції додаткового запального процесу шляхом введення флогогену (карагінану) відразу після його (субплантарного, у підшовний апоневроз задньої лівої кінцівки) уведення спостерігалася реактивна фаза запалення, що характеризувалася почервонінням стопи, а впродовж перших 10-15 хв – появою та наростанням набряку. Клінічні ознаки місцевого запального процесу посилювалися упродовж 2,5 год. Тварини з індукованим запаленням повільно рухалися у клітці, обережно опиралися на уражену кінцівку. Інших порушень у поведінці тварин, змін вегетативних функцій, стану видимих слизових оболонок та шерстного покриву не відмічалось.

Флогоген призводив до суттєвого, відносно вихідного значення, зростання об'єму стопи у нелікованих мишей (група КП) на фоні псоріазоподібного ураження шкіри ІМҚ на 56,0 % через 2 години та на 48,0 % через 4 години відповідно після введення карагінану (табл. 4.5).

Таблиця 4.5 – Об'єм стопи ($M \pm m$, у. о.) у мишей при застосуванні ТЗ кремів при псоріазоподібному ураженні шкіри на фоні запалення посиленого карагінаном

Експериментальні групи тварин (тест-зразки кремів)	Протизапальна активність (ПЗА), %		
	Вихідне значення	Через 2 год	Через 4 год
Інтактний контроль (ІК)	$0,24 \pm 0,01$	$0,37 \pm 0,01$	$0,32 \pm 0,02$
Контрольна патологія (КП)	$0,25 \pm 0,01$	$0,39 \pm 0,01$	$0,37 \pm 0,02$
Очищене нафталанове масло (ОНМ)	$0,22 \pm 0,01$	$0,31 \pm 0,02$ 21 %	$0,30 \pm 0,02$ 19 %
Очищене нафталанове масло в комбінації з дротаверином (ОНМ+Д)	$0,25 \pm 0,02$	$0,30 \pm 0,01$ 23 %	$0,26 \pm 0,01$ 29 %
Препарат порівняння (ПП)	$0,24 \pm 0,02$ -	$0,33 \pm 0,02$ 15 %	$0,25 \pm 0,02$ 32 %

Встановлено, що об'єм стопи у мишей у реактивну фазу запалення, індукованого карагінаном, зростав на понад 15,0 % при застосуванні ПП, але через 4 години набряк стопи суттєво зменшувався (фактично, до вихідного значення) і був значно нижчим за такий, що реєструвався у нелікованих тварин у цей же термін.

Через 4 години після індукції запалення флогогеном, ТЗ крему з 10 % ОНМ продемонстрував найнижчу протизапальну активність 19,0 %, тоді як ТЗ крему з 10 % ОНМ в комбінації з 2 % дротаверином і ПП проявили в зазначений термін здатність усувати набряк стопи у мишей, нормалізуючи її об'єм до вихідного (до введення карагінану) значення.

Тест-зразок крему з 10 % ОНМ в комбінації з 2 % дротаверином демонструє високу ПЗА через 2 години 23,0 %, що посилюється з часом, досягаючи 29,0 % через 4 години. Менш виражену ПЗА демонструє ТЗ крему з 10 % ОНМ порівняно з ТЗ крему з 10 % ОНМ в комбінації з 2 % дротаверином на рівні 21,0 %-19,0 %. Найвищу ПЗА показує ПП через 4 години – 32,0 %.

4.6 Гістологічні зміни шкіри мишей лінії BALB/c на моделі псоріазоподібного ураження шкіри IMQ

4.6.1 Стан шкіри тварин групи інтактного контролю

Гістологічні зміни шкіри мишей після моделювання псоріазоподібного ураження шкіри у мишей лінії BALB/c. Результати гістологічних досліджень показали, що шкіра мишей контрольної групи має характерну для неї будову і складається з трьох шарів: епідермісу, дерми (власне шкіри) та гіподерми (підшкірної основи). Епідерміс стратифікований на шари: базальний, шипуватий, зернистий, блискучий і роговий (рис. 4.4 а, б).

Базальний шар епідермісу був утворений одним рядом базальних кератиноцитів (епідермоцитів) зі світлою цитоплазмою та округлої форми ядром в якому розташовані 1–2 компактних ядерця і дрібні брилки хроматину. Нерідко в

базальному шарі зустрічалися фігури мітозу, що є свідченням високої проліферативної активності базальних кератиноцитів.

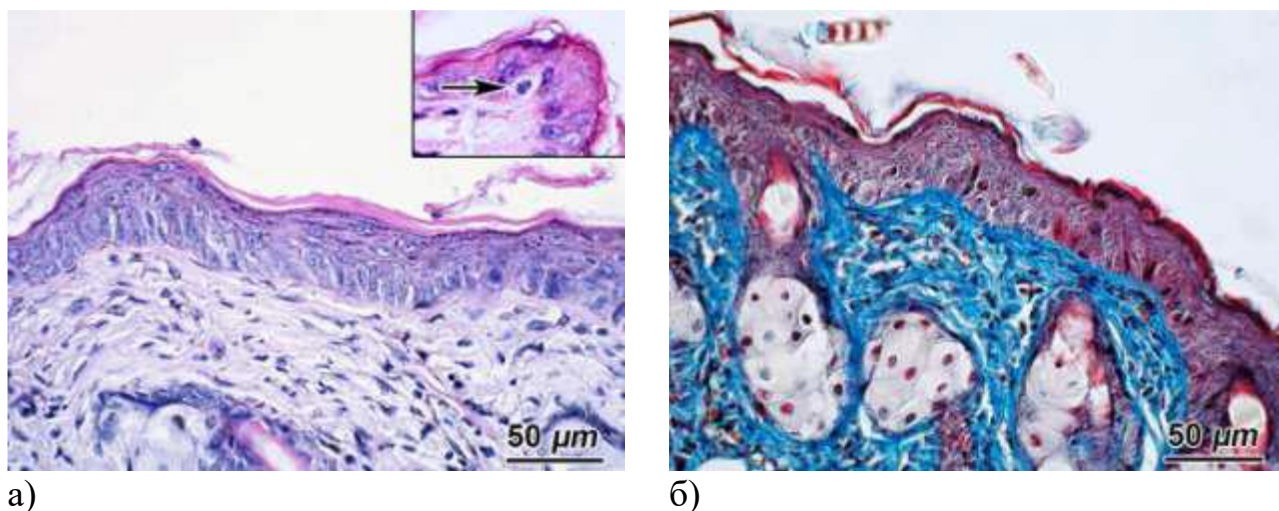


Рисунок 4.4 – Гістологічна характеристика шкіри групи ІК: а) – стратифікований на шари епідерміс і дерма, утворена з колагенових і еластичних волокон, поміж яких розташовані гістіоцити, фібробласти, лімфоцити і макрофагоцити. Мітоз (→) в базальному шарі епідермісу (вставка); б) – складно-петлястий тип в'язі колагенових волокон дерми. Голокринові залози в дермі. Гематоксилін і еозин (а); $\times 50$; метод MSB (б)

Шипуватий шар епідермісу утворений із 2–3-х рядів шипуватих епідермоцитів, з'єднаних між собою містками, які утворені цитоплазматичними відростками. При цьому зернистий шар епідермісу був представлений 1–2 рядами сплющеної форми епідермоцитів з поліморфними ядрами (одні округлої, або овальної форми, а інші витягнутої з нерівними контурами ядерної оболонки) і цитоплазмою багатою на гранули кератогіаліну (рис. 4.4 а).

Блискучий шар епідермісу надто тонкий, утворений 1-м рядом сплющеної форми клітин із надмірно ацидофільною цитоплазмою і невеликих розмірів базофільним ядром. До цих клітин щільно прилягають корнеоцити (ороговілі кератиноцити), які утворюють роговий шар епідермісу, що складається із 3-х і більше рядів сплющеної форми клітин зі щільною ацидофільною цитоплазмою в якій відсутнє ядро. Такі корнеоцити щільно з'єднані між собою, що забезпечує

бар'єрну функцію шкіри. Разом із цим, злуцнені корнеоцити утворюють на поверхні рогового шару тонкі рогові лусочки, якими вкрита вся поверхня епідермісу (рис. 4.4 а, б).

За даними морфометричних досліджень загальна товщина епідермісу шкіри мишей контрольної групи в межах мінімальних і максимальних значень коливалася від 12,0 мкм до 44,0 мкм, що дорівнювало значення Me (Q25%; Q75%) в групі – 24,0 мкм (21,0; 28,0).

Дерма шкіри мишей утворювалася колагеновими волокнами, які зібрані в пучки зі складно-петлястим типом в'язу (рис. 4.4 б), а також тонкими еластичними волокнами і невеликою кількістю клітин, представлених гістіоцитами, фібробластами, поодинокими лімфоцитами і макрофагоцитами, серед яких визначаються мастоцити – тканинні базофіли з дрібними секреторними гранулами в цитоплазмі. В дермі також розташовані чисельні кровоносні і лімфатичні капіляри, що формують густу капілярну сітку, а також термінальні нервові волокна і нервові закінчення, волосяні фолікули з волоссям та чисельні голокринові залози, утворені з клітин секреторного епітелію, які мають базофільне ядро і цитоплазму щільно заповнену світлими секреторними гранулами (рис. 4.4 б). Стан шкіри тварин групи ІК відповідав фізіологічній нормі.

4.6.2 Стан шкіри тварин групи КП

Гістологічні дослідження шкіри мишей показали, що при моделюванні псоріазу змін зазнавали не тільки епідерміс, але й дерма та гіподерма. Так, на 9-у добу від початку експерименту в шкірі мишей спостерігали нерівномірне потовщення епідермісу, яке відбувалося, як за рахунок збільшення числа рядів клітин шипуватого і зернистого шару, що характерно для акантозу, так і за рахунок збільшення числа рядів клітин базального та рогового шару епідермісу, що характерно для гіперкератозу (рис. 4.5 а, б). При цьому серед кератиноцитів базального шару епідермісу часто спостерігали фігури мітозу, серед яких зустрічалися патологічні мітози, зокрема, багатополосний мітоз і К-мітоз.

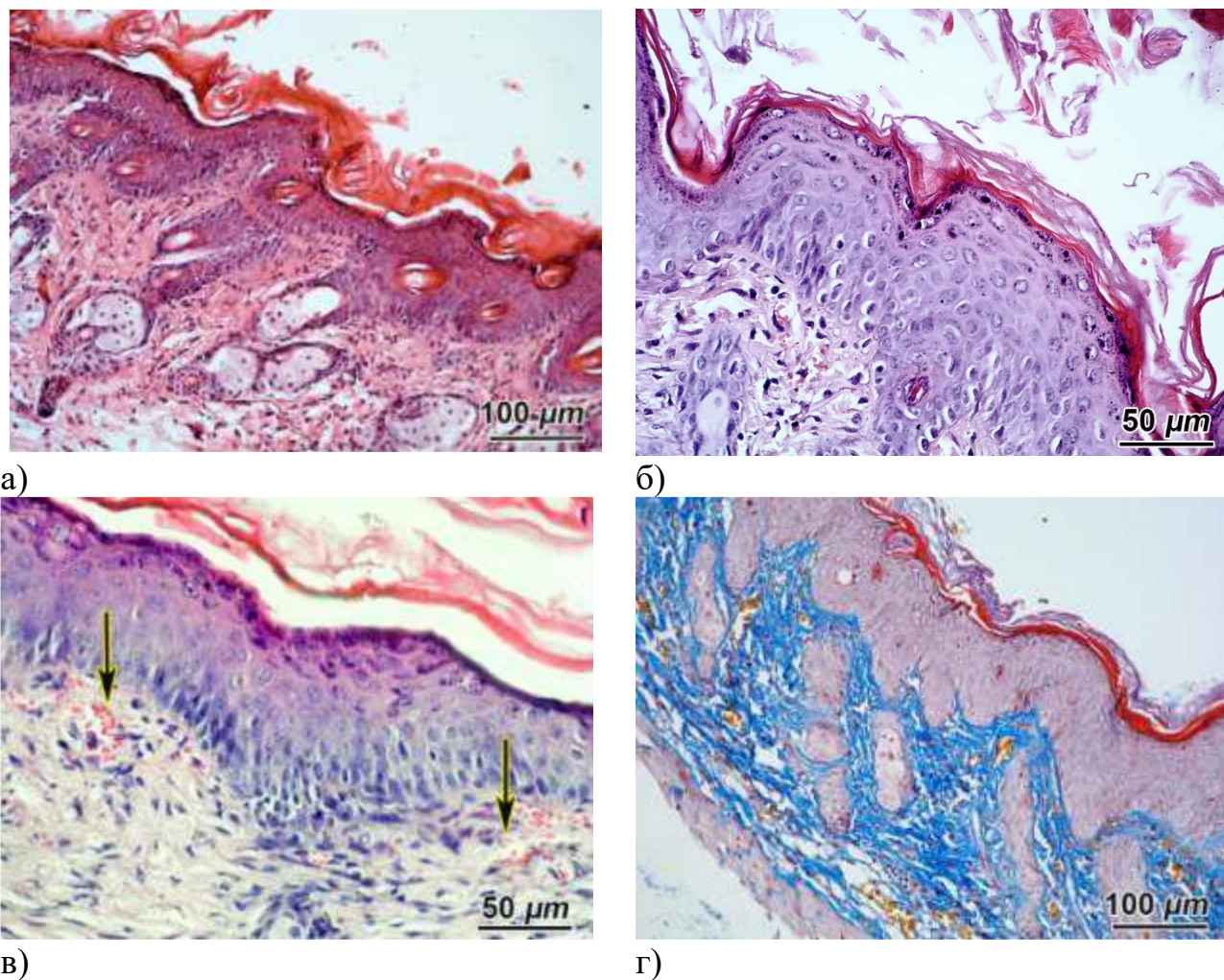


Рисунок 4.5 – Гістологічні зміни на 9-у добу розвитку псоріазоподібного ураження шкіри у мишей BALB/с: а) – виражений гіперкератоз; б) – збільшення числа рядів кератиноцитів базального та шипуватого шарів епідермісу. Перинуклеарний набряк і гіперхромія ядер базальних кератиноцитів; в) – дрібні вогнища крововиливів під епідермісом (↓); г) – повнокров'я капілярів дерми, набряк, набухання і дезорганізація пучків колагенових волокон. Гематоксилін і еозин (а, б, в); а, г – $\times 50$; б, в – $\times 100$; метод MSB (г)

Слід відмітити, що в базальних кератиноцитах часто спостерігали вакуольну дистрофію у вигляді перинуклеарного набряку, а також виражену гетерохроматизацію ядер цих клітин (рис. 4.5 б), що характеризує розвиток при псоріазу дистрофічно-деструктивних змін епідермісу. При цьому в дермі та гіподермі часто виявляли надмірне розширення просвітів і повнокров'я капілярів, а в окремих ділянках дерми утворення дрібних вогнищ крововиливів і діapedезу

еритроцитів (рис. 4.5 в, г). Нерідко дрібні вогнища крововиливу спостерігали під епідермісом, що може вказувати на розвиток пошкоджень в зоні дермо-епідермальних з'єднань, які здатні забезпечувати бар'єрну функцію шкіри. Такі зміни часто супроводжувались набряком, набуханням і дезорганізацією колагенових і еластичних волокон, а також інфільтрацією невеликих ділянок дерми лімфоцитами і макрофагоцитами. Нерідко в ділянках дерми де відмічали набряк, набухання і дезорганізацію колагенових волокон спостерігали гіперплазію та гіпертрофію фібробластів, часто з ознаками їх спредингу, що набував вираженого характеру в зонах дермо-епідермальних з'єднань. Такі зміни розцінювали, як структурні адаптаційно-пристосувальні перебудови в дермі у відповідь на її пошкодження для забезпечення нею частково втрачених функцій.

Слід також зазначити, що на структурно-функціональні порушення, які відбувалися в дермі при псоріазоподібному ураженні також вказували гіпоплазія та атрофія волосяних фолікулів і голокринових залоз, що є придатками шкіри і важливими структурно-функціональними елементами дерми (рис. 4.5 а).

В динаміці експерименту, на 14-у добу, в шкірі піддослідних мишей виявили дистрофічно-деструктивні зміни, що відбувалися в усіх шарах епідермісу та в дермі шкіри, і які порівняно з попереднім терміном експерименту набували більш вираженого характеру. Так, в епідермісі разом із ділянками акантозу та гіперкератозу часто спостерігали ділянки з вираженими ознаками його атрофії, що проявлялося зменшенням в епідермісі числа рядів кератиноцитів базального, шипуватого та зернистого шарів, що відповідно призводило до суттєвого зменшення загальної товщини епідермісу (рис. 4.6 б).

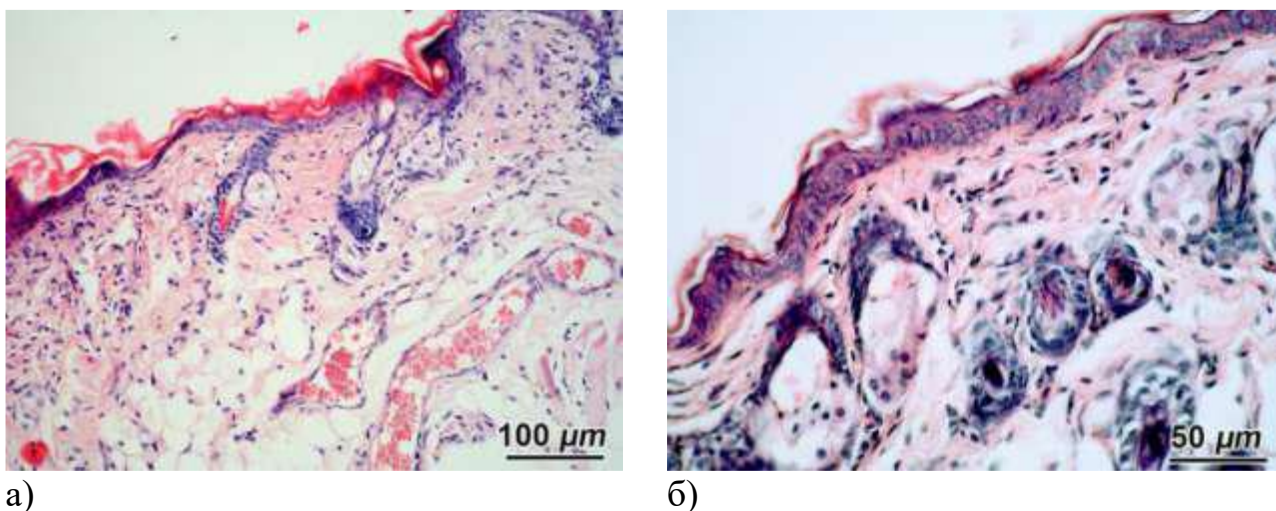


Рисунок 4.6 – Гістологічні зміни на 14-у добу розвитку псоріазоподібного ураження шкіри мишей BALB/с: а) – атрофія епідермісу, гіпоплазія волосяних фолікулів і голокринових залоз, розширення і повнокров'я просвітів капілярів; б) – зменшення числа рядів в різних шарах епідермісу. Гематоксилін і еозин; а – $\times 100$; б – $\times 50$

В епідермісі разом із ділянками проліфераційного гіперкератозу (потовщення зернистого та шипуватого шарів) спостерігали також ділянки ретенційного гіперкератозу, пов'язаного з порушенням процесів злущення корнеоцитів з поверхні рогового шару внаслідок чого зернистий, а інколи й шипуватий шар епідермісу потовщувалися. Про це свідчили наявні на поверхні епідермісу фрагменти рогового шару, які складалися із «незрілих» корнеоцитів (сплющеної форми клітин з ацидофільною цитоплазмою і фрагментами пікнотичних ядер), а також нерозщеплених між собою рогових лусочок (рис. 4.7 а). В таких фрагментах епідермісу часто при забарвленні гістологічних зрізів за методом MSB часто спостерігали яскраво-червоне забарвлення нерозщеплених між собою корнеоцитів, а також рогових лусочок, що було не характерно для мишей контрольної групи (рис. 4.7 б). Імовірно, що такі зміни епідермісу шкіри мишей на 14-у добу розвитку псоріазу ймовірно були обумовлені фізико-хімічними змінами міжклітинного матриксу рогового шару епідермісу, що призводили до порушень процесів

роз'єднання корнеоцитів з подальшим злуцненням рогових лусочок з поверхні рогового шару епідермісу.

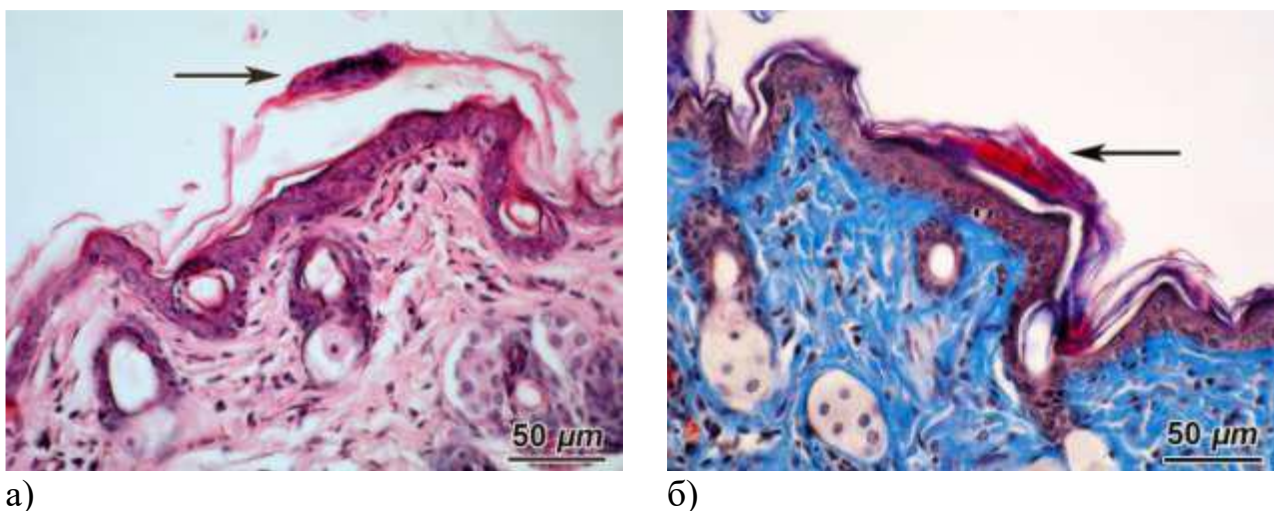


Рисунок 4.7 – Гістологічні зміни на 14-у добу розвитку псоріазоподібного ураження шкіри у тварин групи КП: а) – фрагменти рогового шару на поверхні епідермісу, які складаються з «незрілих» корнеоцитів із залишками пікнотичних ядер і нерозщеплених між собою рогових лусочок; б) – не характерне для корнеоцитів і рогових лусочок яскраво-червоне забарвлення. Гематоксилін і еозин (а); ×50; метод MSB (б)

На фоні таких змін епідермісу в дермі шкіри піддослідних мишей на 14-у експерименту часто спостерігали розширення та повнокров'я капілярів, а також набряк, набухання і дезорганізацію колагенових волокон (рис. 4.6 а), що в окремих випадках супроводжувалось дифузною інфільтрацією окремих ділянок дерми лімфоцитами та макрофагами. При цьому в таких ділянках дерми часто спостерігали гіперплазію і гіпертрофію фібробластів, розташованих поміж товстих пучків колагенових волокон, які формують горизонтальні пласти, пов'язані між собою тонкими волокнами і пучками новоутворених колагенових фібрил, що є морфологічною ознакою формування в дермі вогнищ склерозу (рис. 4.8 а, б). Разом із цим у дермі спостерігали повнокров'я капілярів, що часто супроводжувалося розвитком вогнищ периваскулярного набряку (рис. 4.8 б).

Слід відмітити, що новоутворені «молоді» колагенові волокна відрізнялися від зібраних в пучки грубих колагенових волокон, які формують складно петлястий тип в'язу дерми за їх здатністю до забарвлення ацидофільним барвником азофлаксином (метод MSB; рис. 4.8 б), імовірно, в наслідок високого вмісту в білках «молодих» колагенових волокон амінних груп. Такі гістоморфологічні зміни можуть бути свідченням розвитку склерозу дерми, як її реакції у відповідь на пошкодження.

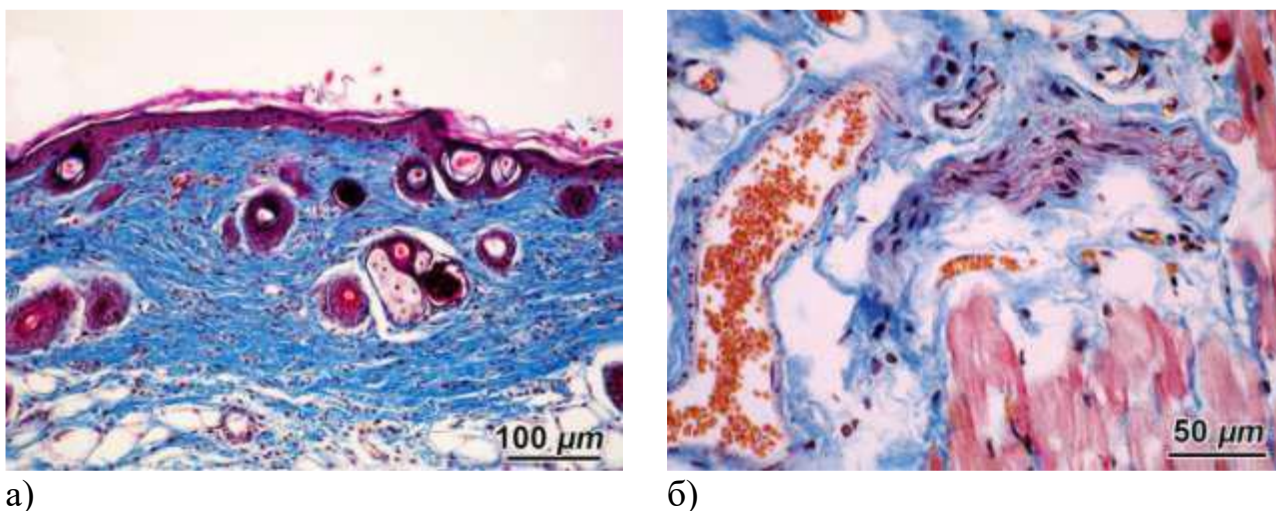
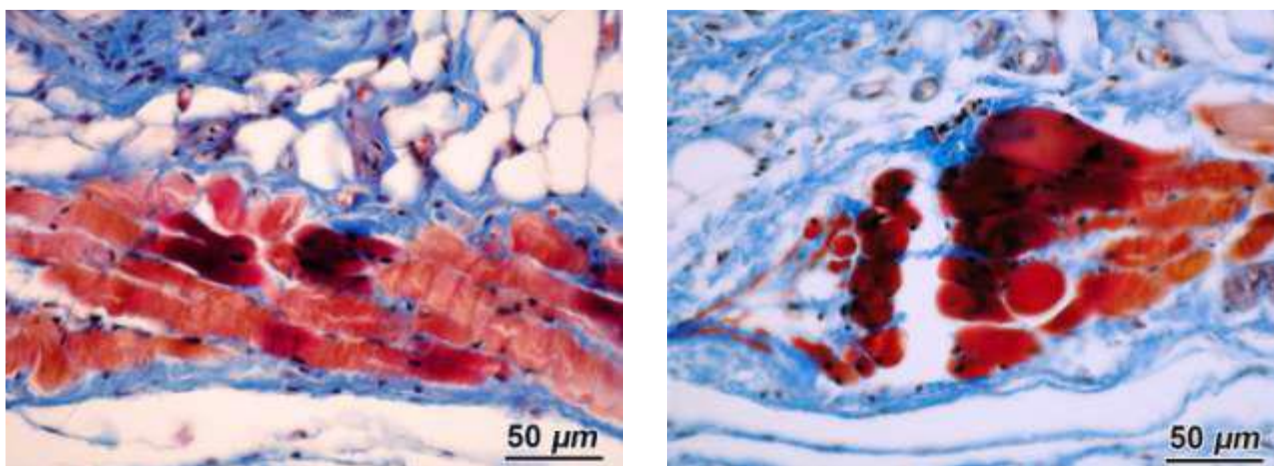


Рисунок 4.8 – Гістологічні зміни на 14-у добу розвитку псоріазоподібного ураження шкіри тварин групи КП: а) – гіперплазія та гіпертрофія фібробластів з формуванням вогнищового склерозу дерми; б) – розширення просвітів і повнокров'я капілярів, вогнищевий набряк дерми, гіперплазія та гіпертрофія фібробластів, утворення тонких пучків «молодих» колагенових волокон із вираженою ацидофілією; а – $\times 100$; б – $\times 50$. Метод MSB

На 14-у добу експерименту в шкірі піддослідних мишей групи КП разом із атрофією епідермісу в дермі та гіподермі відмічається гіпоплазія та атрофія придатків шкіри (волосяних фолікулів і голокринових залоз), в жировій тканині – набряк і вогнища лімфомакрофагальної інфільтрації, а в м'язовому шарі – вогнища дистрофії посмугованих м'язових волокон і/або окремих м'язових клітин у вигляді їх набряку та/або гіалінозу (рис. 4.9 а, б).



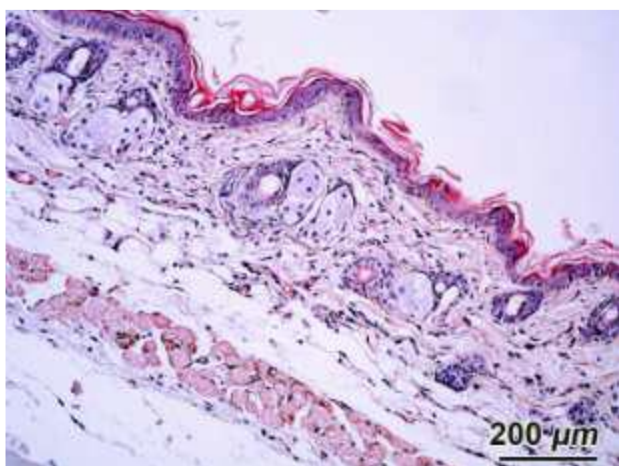
а)

б)

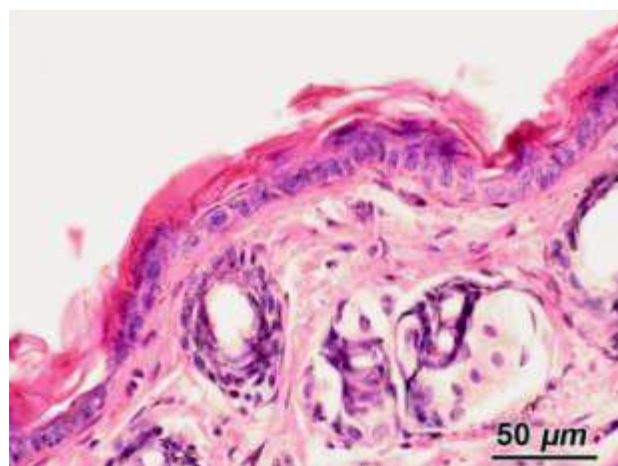
Рисунок 4.9 – Гістологічні зміни на 14-у добу розвитку псоріазоподібного ураження шкіри у тварин КП: а) – набряк жирової тканини та дистрофічні зміни посмугованих м'язових волокон і окремих м'язових клітин; б) – набряк дерми та гіаліноз посмугованих м'язових волокон і окремих м'язових клітин; $\times 50$. Метод MSB

Отже, результати проведених гістологічних досліджень показали, що у мишей на 14-у добу розвитку псоріазоподібного ураження шкіри, морфологічних змін зазнають не тільки всі шари епідермісу, але також дерма, гіподерма та придатки шкіри, зокрема волосяні фолікули та голокринові залози.

На 21-у добу експериментального псоріазоподібного ураження в шкірі мишей часто виявляли ділянки з вираженими ознаками атрофії епідермісу, де нерідко відмічали вогнища гіперкератозу (рис. 4.10 а, б). Атрофічні зміни епідермісу часто проявлялися зменшенням його загальної товщини внаслідок зменшення кількості рядів кератиноцитів шипуватого і зернистого шарів (рис. 4.10 а). При цьому роговий шар епідермісу був утворений із 3–4-х і більше рядів сплющеної форми корнеоцитів із надмірно ацидофільною цитоплазмою та відсутнім в ній ядром. Такі клітини, як правило, були щільно з'єднані між собою і прилягали до епідермоцитів блискучого та/або зернистого шарів епідермісу (рис. 4.10 б). На таких ділянках епідермісу не часто виявляли злуцені з його поверхні рогові лусочки, що імовірно було пов'язано з порушенням процесів їх «визрівання».



а)



б)

Рисунок 4.10 – Гістологічні зміни на 21-у добу розвитку псоріазоподібного ураження шкіри тварин групи КП: а) – атрофічні зміни епідермісу та дерми; б) – ділянка епідермісу, представлена 1-м рядом базальних кератиноцитів, а також шипуватих клітин і клітин зернистого шару. Помітно виражене потовщення рогового шару епідермісу, що складається з декількох рядів корнеоцитів, які щільно з'єднані між собою і, які прилягають до епідермоцитів блискучого та зернистого шарів епідермісу. Гематоксилін і еозин; а – $\times 200$; б – $\times 50$

В дермі шкіри мишей на фоні нерівномірного кровонаповнення капілярів часто спостерігали зменшення кількості волосяних фолікулів, а також голокринових залоз, які при цьому мали зменшені розміри, що розцінювали, як їх атрофії. Разом із цим, поміж горизонтальних пластів пучків колагенових волокон часто виявляли розташовані тут фібробласти, нерідко з ознаками їх вираженої гіпертрофії внаслідок збільшення функціональної активності клітин фібробластичного диферону.

Отже, за результатами гістологічних досліджень виявлено, що при моделюванні псоріазоподібного ураження шкіри мишей лінії BALB/c, морфологічних змін зазнають не тільки всі шари епідермісу шкіри, але й дерма і гіподерма шкіри, а також її м'язовий шар та придатки шкіри, зокрема, волосяні фолікули і голокринові залози, що особливо виражена на 21 добу патології.

Морфометрична характеристика та аналіз змін товщини епідермісу шкіри мишей лінії BALB/c в динаміці розвитку псоріазоподібного ураження шкіри.

Результати морфометричних досліджень, які були проведені з метою вивчення змін, що відбуваються в епідермісі шкіри лабораторних мишей в динаміці відтворення експериментальної моделі псоріазу показали, що у мишей групи інтактного контролю показник загальної товщини епідермісу коливався в межах мінімальних і максимальних значень від 0,012 мм до 0,044 мм, що визначало значення Me (25%; 75%) в групі – 0,024 (0,021; 0,028) (табл. 4.6). При цьому в системі епідермісу шкіри мишей групи інтактного контролю, що складається з елементів, представлених різними шарами епідермісу: базальним, шипуватим, зернистим, блискучим і роговим спостерігали відносно вільний характер функціональної узгодженості, який характеризувався відсутністю значимих між ними ($p < 0,05$) кореляційних зв'язків. Така структурно-функціональна узгодженість системи епідермісу шкіри мишей групи інтактного контролю визначає умови для формування реакцій відповіді при впливі будь-яких зовнішніх факторів для забезпечення підтримки порушеного за таких умов гомеостазу.

Таблиця 4.6 – Товщини епідермісу шкіри мишей при моделюванні псоріазу, 10^{-3} мм

Експериментальні групи тварин (доба експерименту)	Статистичні показники		
	<i>min-max</i>	<i>Me</i>	<i>Q25%; Q75%</i>
Інтактний контроль (ІК)	12,0-44,0	24,0	21,0; 28,0
Контрольна патологія (КП)			
9 доба	36,8-84,0	68,5 $p_{1-2} \leq 0,001$	55,5; 76,1
14 доба	15,5-45,0	25,4 $p_{1-3} > 0,05$ $p_{2-3} \leq 0,001$	21,1; 27,6
21 доба	15,0-56,1	26,5 $p_{1-4} > 0,05$ $p_{2-4} \leq 0,001$ $p_{3-4} > 0,05$	20,5; 32,5

Примітка: $p_{1-2} \leq 0,001$ → між ІК (інтактний контроль) і 9 добою є статистично значуща різниця в товщині епідермісу.

$p_{1-3} > 0,05$ → між ІК і 14 добою немає статистично значущих відмінностей.

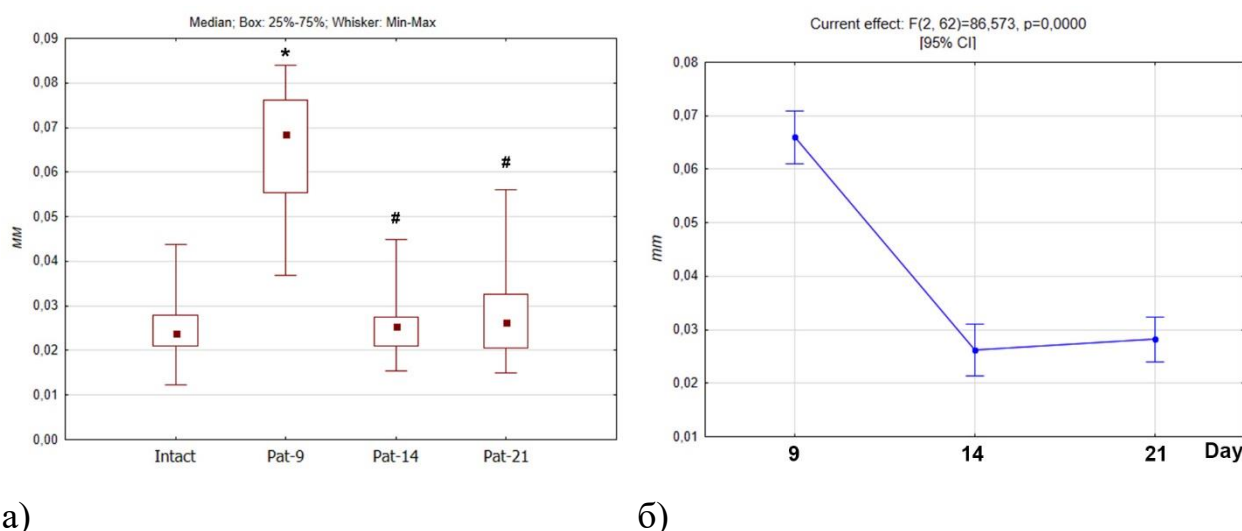
$p_{2-3} \leq 0,001$ → між 9 добою і 14 добою є статистично значуща різниця.

$p_{2-4} \leq 0,001$ → між 9 добою і 21 добою також є значуща різниця.

$p_{3-4} > 0,05$ → між 14 добою і 21 добою немає статистично значущих відмінностей.

При моделюванні псоріазу, на 9-у добу експерименту, показник загальної

товщини епідермісу шкіри мишей коливався в межах мінімальних і максимальних значень від 0,036 мм до 0,084 мм, що характеризувало значення Me (25%; 75%) в групі 0,068 (0,055; 0,076). Отримані результати вказують, що на 9-у добу відтворення експериментальної моделі псоріазу у мишей відбувається розвиток вираженої гіпертрофії епідермісу, що характеризується значимим у порівнянні з ІК ($p < 0,0001$) збільшенням товщини епідермісу (табл. 4.6; рис. 4.11 а) внаслідок виражених структурно-функціональних перебудов, які відбуваються в цілісній системі епідермісу. Про це свідчать встановлені прямі кореляційні зв'язки, які виникають між показником загальної товщини епідермісу, а також товщиною його окремих шарів, зокрема, шипуватого ($r=0,406$; $p < 0,05$) і рогового ($r=0,446$; $p < 0,05$) шару.



а)

б)

Рисунок 4.11 – Оцінка змін показника загальної товщини епідермісу шкіри мишей в динаміці відтворення експериментальної моделі псоріазу: а) – результати оцінки змін статистичних показників; б) – графічна модель однофакторного дисперсійного аналізу ANOVA

На 14-у добу експерименту було показано, що показник загальної товщини епідермісу в групі мишей коливався в межах його мінімальних і максимальних значень від 0,015 мм до 0,045 мм, що дорівнювало значення Me (25%; 75%) в групі 0,025 (0,021; 0,027). При цьому було встановлено, що ці значення показника товщини епідермісу не виявляли значимих відмінностей з аналогічним показником у мишей групи інтактного контролю ($p > 0,05$), але значимо відрізнялися ($p < 0,0001$)

від цього показника в групі експериментальних мишей на 9-у добу експерименту (табл. 4.6; рис. 4.11 а). Такі зміни товщини епідермісу шкіри мишей на 14-у добу відтворення експериментальної моделі псоріазу були обумовлені структурно-функціональними перебудовами, що розвивалися в цілісній системі епідермісу, які характеризувалися формуванням стійкого і статистично значимого кореляційного зв'язку між показником товщини базального та шипуватого шарів епідермісу ($r=0,508$; $p<0,05$).

В подальші терміни експерименту, на 21-у добу відтворення моделі псоріазу, загальна товщина епідермісу шкіри піддослідних мишей характеризувалася коливанням цього показника в межах мінімальних і максимальних значень від 0,015 мм до 0,056 мм, що визначало значення Me (25%; 75%) в групі – 0,026 (0,020; 0,032). Це вказувало на відсутність значимих відмінностей між показником загальної товщини епідермісу шкіри мишей на 21-у добу експерименту з аналогічним показником у мишей на 14-у добу експерименту, а також у мишей групи інтактного контролю ($p>0,05$; табл. 4.6; рис. 4.11 а). Натомість, показник загальної товщини епідермісу шкіри у мишей на 21-у добу відтворення експериментальної моделі псоріазу значимо ($p<0,0001$) відрізнявся від аналогічного показника у піддослідних мишей на 9-у добу експерименту (табл. 4.6; рис. 4.11 а).

Слід зазначити, що зміни товщини епідермісу шкіри мишей, які відбувалися на 21-у добу відтворення експериментальної моделі псоріазу були обумовлені розвитком структурно-функціональних перебудов адаптаційно-пристосувального характеру, які відбувалися в цілісній системі епідермісу шкіри і проявлялися формуванням зворотного кореляційного зв'язку між показником загальної товщини епідермісу та показником товщини його базального шару ($r= -0,517$; $p<0,05$), а також прямого кореляційного зв'язку між показником загальної товщини епідермісу та показником товщини його рогового шару ($r=0,446$; $p<0,05$).

При аналізі даних, що характеризують зміни товщини епідермісу шкіри піддослідних мишей в динаміці відтворення моделі псоріазу було встановлено, що на зміни показника загальної товщини епідермісу шкіри піддослідних мишей

значимо ($p < 0,0001$) впливає фактору часу, тобто фактор, який визначає тривалість проведення експерименту з відтворення моделі псоріазу. На це вказують результати оцінки моделі, яка була побудована на підставі даних, отриманих в ході проведення однофакторного дисперсійного аналізу ANOVA. За результатами цього аналізу було встановлено, що загальний внесок фактору часу (тривалості проведення експерименту) у зміни морфометричного показника, що характеризує товщину епідермісу шкіри експериментальних мишей дорівнює, майже 73,6%. (табл. 4.7; рис. 4.11 б).

Таблиця 4.7 – Статистичні показники однофакторної моделі ДДА для оцінки ефектів впливу експериментальних факторів на зміни товщини епідермісу мишей на моделі псоріазоподібного ураження шкіри

Фактори	SS	df	MS	F	p	P, %
Вільний член	0,10278	1	0,10278	884,2170	0,00	93,447
«Доба»	0,02012	2	0,01006	86,5726	0,00	73,633
Похибка	0,00720	62	0,00011			

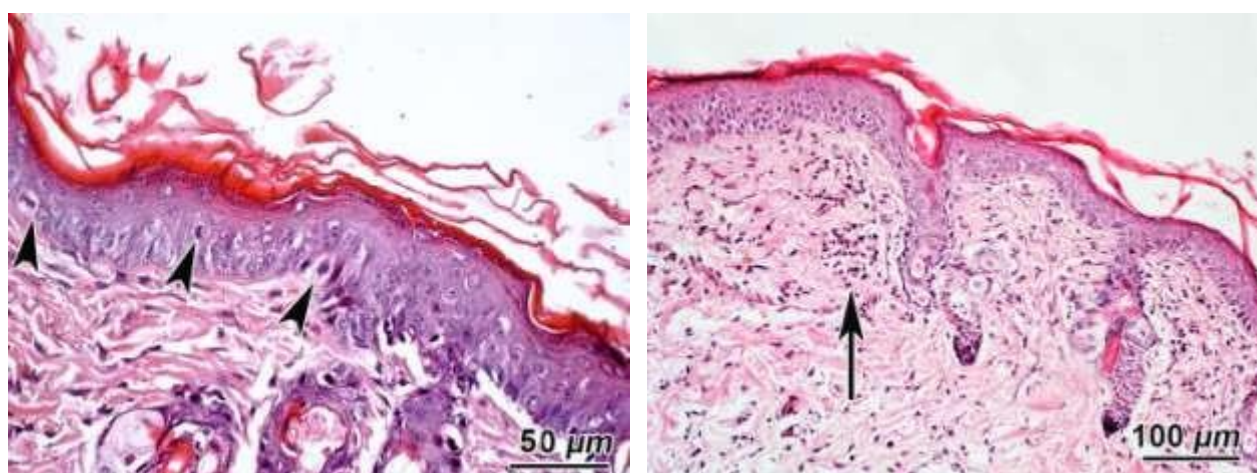
Примітки: 1) *SS* – сума квадратів; 2) *df* – ступінь свободи; 3) *MS* – середній квадрат ефекту; 4) *F* – внутрішньогрупова дисперсія; 5) *p* – статистична значимість при $\alpha=0,05$; 6) *P* – потужність впливу факторів при $\alpha=0,05$.

4.6.3 Гістологічна оцінка ефективності тест-зразків кремів з ОНМ при місцевому застосуванні на моделі псоріазоподібного ураження у мишей лінії BALB/c

Для оцінки ефектів лікувальної дії засобів для місцевого застосування вивчали гістологічні зміни шкіри мишей, які були використані в експерименті з відтворення моделі псоріазу та яким на початкових етапах розвитку патології з метою лікування наносили на уражені ділянки шкіри засоби для місцевого застосування, зокрема, ТЗ кремів з 10 % ОНМ, з 10 % ОНМ в комбінації з 2 % дротаверином та ПП.

Гістологічні зміни шкіри в динаміці лікування псоріазу ТЗ крему з 10 % ОНМ. Гістологічні дослідження, проведені з метою вивчення ефектів дії препарату для місцевого застосування ТЗ крему з 10 % ОНМ при експериментальному псоріазі

у мишей виявили в ділянках ушкодженої шкіри збереження гістоструктури епідермісу, який складався з базального, шипуватого, зернистого, тонких блискучого та рогового шарів. При цьому було встановлено, що базальний шар епідермісу складався з 1-го, а іноді 2-х рядів базальних кератиноцитів із світлою цитоплазмою і базофільним ядром, де часто виявляли фігури мітозу (рис. 4.12 а). Це свідчило про високу мітотичну активність базальних кератиноцитів, що спрямована на компенсаторне відновлення структурної цілісності епідермісу для забезпеченні підтримки порушеного гомеостазу при псоріазоподібному ураженні шкіри.



а)

б)

Рисунок 4.12 – Гістологічні зміни на 14-у добу лікування псоріазоподібного ураження шкіри мишей тест-зразком крему з монокомпонентним 10 % ОНМ: а) – клітинна гетеротопія епідермісу та велика кількість фігур мітозу в базальному шарі (▲). До поверхні рогового шару прилягає суцільний тонкий шар рогових лусочок, утворений зі злущених і нерозщеплених корнеоцитів; дрібні вогнища підепідермального набряку; б) – дрібні вогнища лімфоцитарної і макрофагальної інфільтрації дерми на фоні яких відмічається гіперплазія та гіпертрофія фібробластів. Гематоксилін і еозин; а – $\times 50$; б – $\times 100$

Шипуватий шар епідермісу, як правило, складався з 3-х, іноді 4-х шарів шипуватих клітин, щільно з'єднаних між собою. До шипуватого шару прилягав

зернистий шар, який складався з 2-х рядів сплющеної форми клітин, цитоплазма яких містила дрібні гранули кератогіаліну.

При гістологічному дослідженні шкіри мишей блискучий шар епідермісу, який зазвичай, складався з 1-го ряду сплющеної форми клітин було важко виокремити від рогового шару, який складався з 2–3-х рядів такої ж сплющеної форми корнеоцитів зі щільною ацидофільною цитоплазмою в якому відсутнє ядро. Роговий шар епідермісу вкривали рогові лусочки. Нерідко до поверхні рогового шару прилягав суцільний тонкий шар рогових лусочок, утворений зі злущених і не розщеплених між собою корнеоцитів (рис. 4.12 а). Не розщеплення злущених з поверхні рогового шару корнеоцитів може бути свідченням порушень процесів, які забезпечують ороговіння епідермісу.

Слід зазначити, що на окремих ділянках епідермісу часто відмічали клітинну гетеротопію у вигляді присутності в різних шарах епідермісу не характерних для кожного з них клітин. Так, у шипуватому та зернистому шарах епідермісу виявляли епідермоцити, які за розмірами та забарвленням цитоплазми і ядра нагадували базальні кератиноцити (рис. 4.12 а). Часто в цитоплазмі таких клітин виявляли вакуолі, що спричинювали ектопію ядра до одного із полюсів клітин. Разом із цим в епідермоцитах зернистого шару часто відмічали зменшення кількості в їх цитоплазмі кератогіалінових гранул, що може вказувати на порушення в процесах ороговіння епідермісу.

В дермі шкіри на 14-у добу експерименту часто в її ділянках, що прилягають до епідермісу спостерігали утворення дрібних вогнищ підепідермального набряку, що може свідчити про структурні порушення дермо-епідермальних з'єднань (рис. 4.12 а). В більш глибоких шарах дерми разом із її дифузним набряком часто виявляли невеликі вогнища лімфо-макрофагальної інфільтрації, на фоні яких відмічали гіперплазію та гіпертрофію фібробластів, нерідко з ознаками спредингу цих клітин (рис. 4.12 б).

Слід відмітити, що запальні зміни в дермі на 14-у добу експерименту відбувалися на фоні значного розширення просвітів і повнокров'я капілярів, які в дермі формують густу капілярну сітку (рис. 4.13 а, б). Також в окремих ділянках

дерми спостерігали зміни, що характеризують ремоделювання колагенових волокон, які проявлялися тим, що в структурі товстих пучків колагенових волокон виявляли тонкі «молоді» колагенові волокна, які відрізнялися за фізико-хімічними властивостями відрізнялися від «старих», грубих колагенових волокон, внаслідок чого при застосуванні методу MSB вони набували яскравого пурпурного забарвлення (рис. 4.13 в).

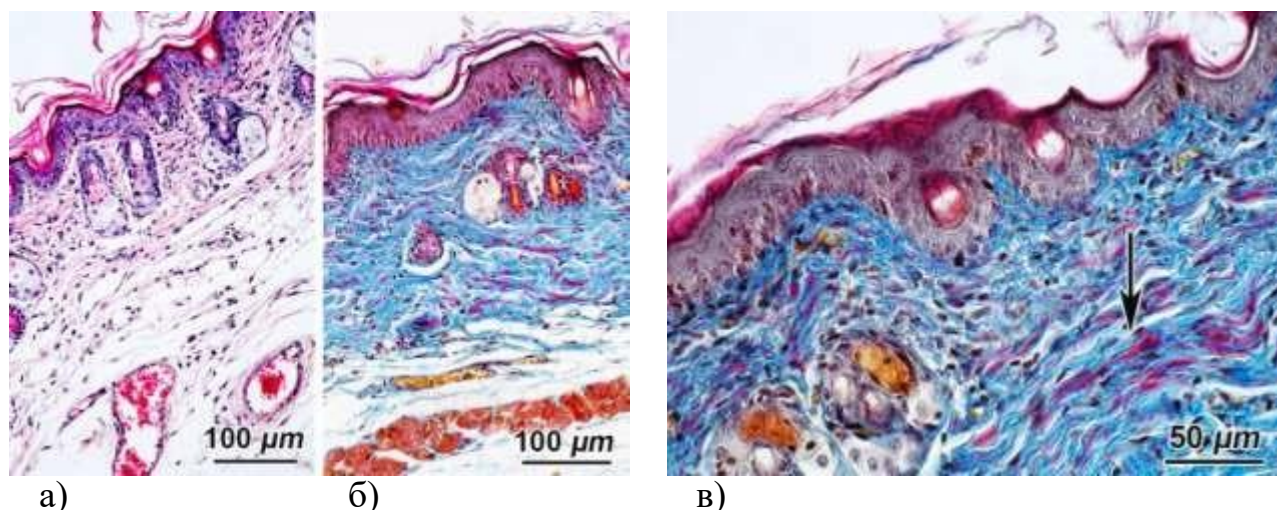


Рисунок 4.13 – Гістологічні зміни на 14-у добу лікування псоріазоподібного ураження шкіри мишей тест-зразком крему з монокомпонентним 10 % ОНМ: а, б) – розширення просвітів і повнокров'я капілярів в глибоких шарах дерми; в) – на фоні гіперплазії та гіпертрофії фібробластів спостерігається процес ремоделювання колагенових волокон, який супроводжується утворенням в товстих пучках колагенових волокон тонких, «молодих» волокон колагену, які за методом MSB забарвлюються в пурпурний колір (↓). Гематоксилін і еозин (а); а, б – $\times 100$; в – $\times 50$; метод MSB (б, в)

При цьому в дермі шкіри відмічали помірну кількість волосяних фолікулів і голокринових залоз, що є свідченням відновлення гістологічної структури дерми шкіри на даному терміні експерименту. На 21-у добу експерименту гістологічні зміни епідермісу та дерми шкіри піддослідних мишей були такими самими, як на 14-у добу експерименту. Епідерміс був стратифікований на шари, де часто

відмічали клітинну гетеротопію, а в базальному шарі – фігури мітозу (рис. 4.14 а).

Роговий шар на окремих ділянках епідермісу був тонким, його вкривав суцільний шар тонких рогових лусочок.

Під епідермісом часто виявляли невеликі ділянки з дрібними вогнищами підепідермального набряку. Тут часто відмічали вогнища дифузної лімфомакрофагальної інфільтрації, а також гіперплазії та гіпертрофії фібробластів, які нерідко виявляли ознаки спредингу. Кровоносні капіляри, розташовані в дермі були повнокровними. Часто вони у вигляді густої капілярної сітки оточували розташовані тут волосяні фолікули та голокринові залози, які були оточені поодинокими і зібраними у невеликі групи макрофагами і фібробластами, що нерідко виявляли ознаки спредингу цих клітин (рис. 4.14 б, в, г, д).

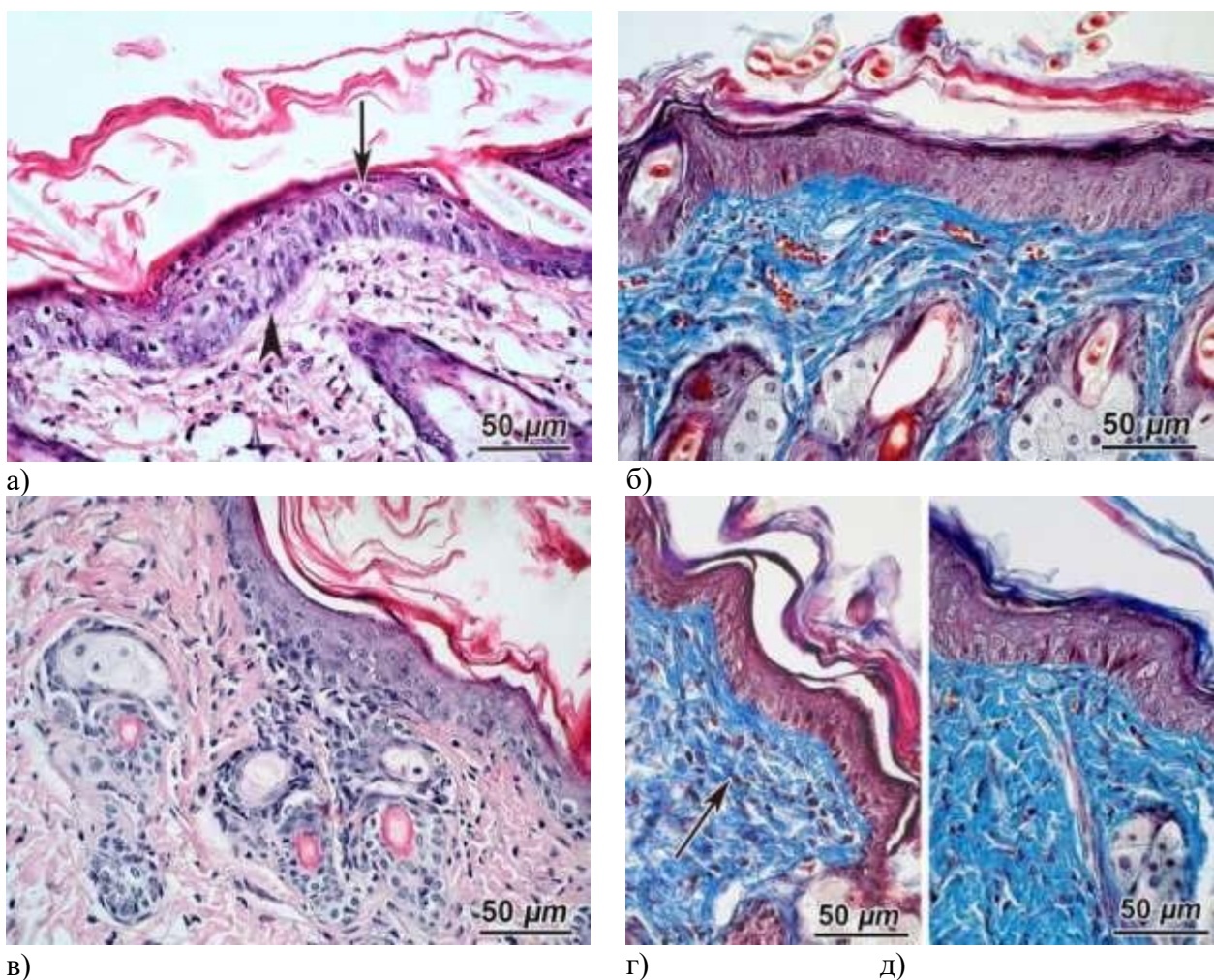


Рисунок 4.14 – Гістологічні зміни на 21-у добу лікування псоріазоподібного ураження шкіри мишей кремом з монокомпонентним 10 % ОНМ: а) – фігури мітозу

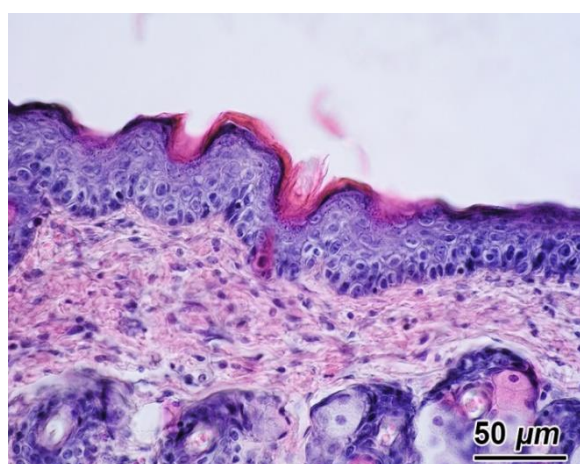
в базальному шарі епідермісу (▲) та клітинна гетеротопія (↓). Дрібні вогнища набряку дерми під епідермісом; б) – повнокров'я капілярів дерми; в) – волосяні фолікули та голокринові залози оточені макрофагами і фібробластами; г, д) – гіперплазія і гіпертрофія фібробласти з ознаками спредингу клітин. Гематоксилін і еозин (а, в); ×50; метод MSB (б, г, д)

Враховуючи, що патологічні зміни в шкірі тварин розвивалися протягом 3-х тижнів, максимальні прояви патології фіксувалися на 21-у добу спостереження. Оцінку ефективності досліджуваного ТЗ крему, що містив 10 % ОНМ у комбінації з 2 % дротаверином, здійснювали саме на 21-у добу. За результатами фармакологічного та морфологічного аналізу суттєвих відмінностей між цими періодами дослідження не були виразними. За підсумками встановлено, що крем з монокомпонентним 10 % ОНМ за морфологічними ознаками як на 14-у та 21-у добу спостереження не виявлено суттєвих змін з боку ультраструктур шкіри, що могло свідчити про ефективність ТЗ в той же час не виявляли гістологічних ознак, що свідчили про негативний вплив ОНМ на стан шкіри і погіршення перебігу модельної патології.

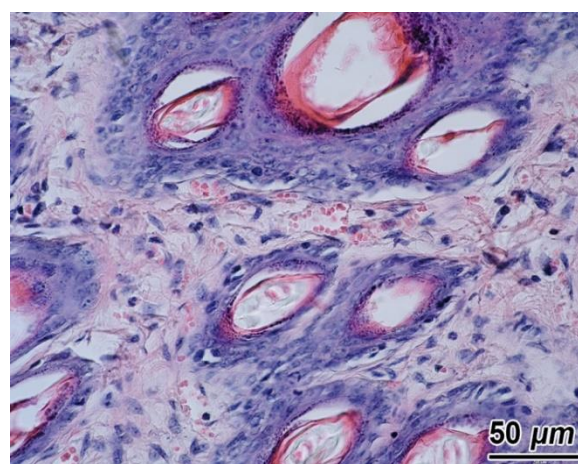
Це ще раз свідчить про те, що ці дані повторюють тенденцію при отриманні результатів при макроскопічному дослідженні стану шкіри і дозволяє припустити, що ОНМ можна розцінювати як речовину зі слабкими властивостями лікувального потенціалу, але без проявів дерматотоксичної дії, що може бути обґрунтовано як використання допоміжної речовини при розробці дерматологічних лікарських форм.

Гістологічні зміни шкіри при місцевому застосуванні ТЗ крему з 10 % ОНМ у комбінації з 2 % дротаверином. На 21-у добу лікування псоріазоподібного ураження шкіри мишей кремом із 10 % ОНМ у комбінації з 2 % дротаверином гістологічний аналіз показав відновлення структури епідермісу, що наближалася до нормальної. Він мав стратифіковану будову з чітко вираженими шарами: 1–2 ряди базальних кератиноцитів, 3–4 ряди клітин шипуватого шару, 1–2 ряди клітин зернистого шару, який був вкритий тонким роговим шаром, сформованим із

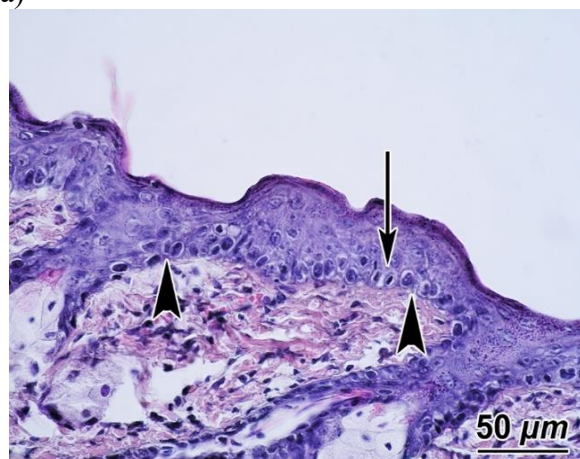
рогових лусочок. У дермі між набряклими та розпушеними колагеновими волокнами спостерігалися дифузно розташовані фібробласти і лімфоцити (рис. 4.15 а). Розширені просвіти кровоносних капілярів у дермі, що знаходилися безпосередньо під епідермісом, були заповнені помірною кількістю еритроцитів та рідкою частиною крові (рис. 4.15 б). У базальному шарі епідермісу виявлялися клітини з гіперхромними ядрами та світлим ободком цитоплазми, а також поодинокі клітини з фігурами мітозу (рис. 4.15 в). Водночас роговий шар епідермісу був відсутній унаслідок злушення рогових клітин, а в глибоких шарах дерми спостерігалася гіпертрофія голокринових залоз (рис. 4.15 г).



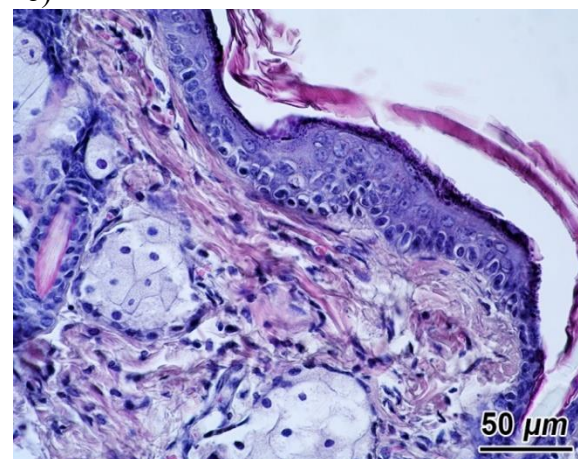
а)



б)



в)



г)

Рисунок 4.15 – Гістологічні зміни шкіри мишей на 21-у добу лікування псоріазу ТЗ з 10 % ОНМ у комбінації з 2 % дротаверином: а) – епідерміс звичайної будови, стратифікований на шари. Помірна інфільтрація дерми; б) – помітно розширені просвіти кровоносних капілярів під шаром епідермісу заповнені помірною кількістю еритроцитів і рідкою частиною крові; в) –

Базальний шар кератиноцитів із поодинокими клітинами з гіперхромними ядрами (▲), і фігурами мітозу (↓); г) – злушення рогових клітин (лусочок) з поверхні епідермісу та гіпертрофія голокринових залоз, розташованих у глибоких шарах дерми. Гематоксилін і еозин; ×50

Отримані дані свідчать про активні процеси регенерації епідермісу під впливом ТЗ крему з 10 % ОНМ у комбінації з 2 % дротаверином. Відновлення стратифікованої структури епідермісу, активність клітин базального шару, зменшення набряку дерми та покращення стану капілярного кровотоку вказують на ефективність застосування цього ТЗ для лікування псоріазоподібного ураження шкіри.

Гістологічні зміни шкіри при місцевому застосуванні ПП – крему 1 % гідрокортизону бутирату. Результати гістологічних досліджень показали, що на 14-у добу експерименту в окремих ділянках шкіри виявлялися зміни, що характеризують розвиток її атрофії. Це проявлялось помітним стоншенням епідермісу внаслідок зменшення числа рядів клітин в його шарах, зокрема, роговому, зернистому та шипуватому (рис. 4.16 а. б), а також за стоншенням дерми і гіподерми. Разом із цим, в базальному шарі епідермісу, утвореного 1-м рядом базальних кератиноцитів зі світлою цитоплазмою і округлої форми базофільним ядром з 1–2-а компактними ядерцями та дрібними брилками гетерохроматину часто виявляли фігури мітозу (рис. 4.16 а.). Це свідчило про розвиток в епідермісі компенсаторно-пристосувальних реакцій, здатних забезпечити підтримку та відновлення порушеного при псоріазі тканинного гомеостазу.

На 14-у добу експерименту в окремих ділянках дерми шкіри мишей на фоні її атрофії часто спостерігали розширення та повнокров'я розташованих у дермі капілярів по периферії яких відмічали дрібні вогнища периваскулярного набряку та крововиливу, а в окремих випадках – діapedезу еритроцитів (рис. 4.16 б), що вказує на розвиток порушень в структурі стінки кровоносних капілярів. На фоні таких змін в дермі виявляли вогнища набряку і набухання колагенових волокон, а

також її інфільтрації мононуклеарними клітинами (лімфоцитами і макрофагами).

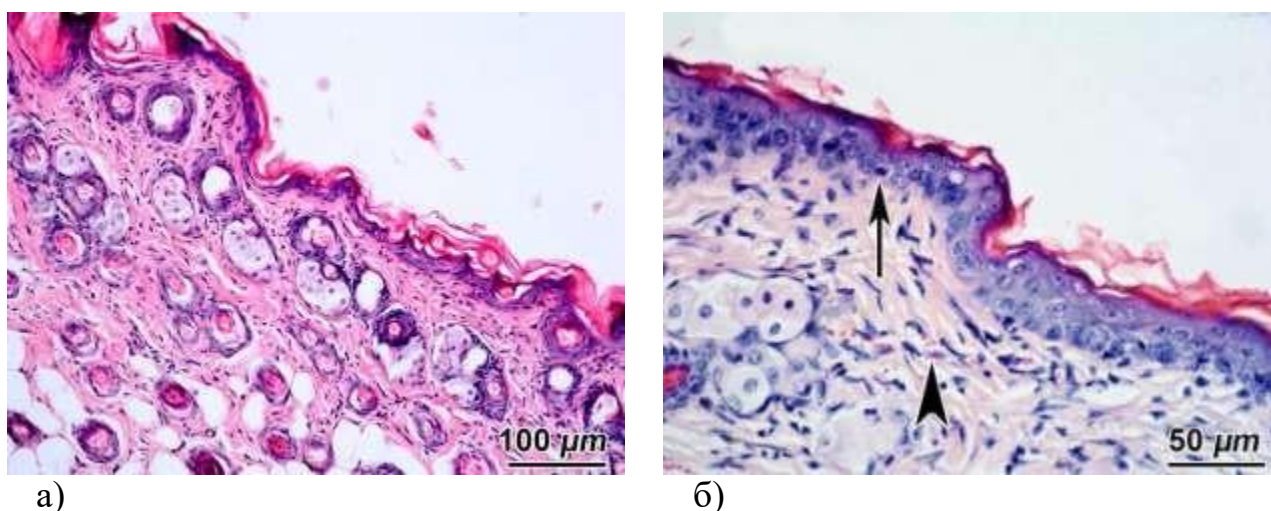


Рисунок 4.16 – Гістологічні зміни на 14-у добу лікування псоріазоподібного ураження шкіри мишей ПП: а) – атрофічні зміни епідермісу, дифузна лімфомакрофагальна інфільтрація дерми, гіперплазія та гіпертрофія фібробластів, вогнищевий набряк гіподерми; б) – фігури мітозу (↑) в базальному шарі епідермісу, утвореного з 1-го ряду базальних кератиноцитів. Набряк дерми та дрібні вогнища крововиливу (▲). Гіперплазія і гіпертрофія фібробластів з ознаками їх спредингу. Гематоксилін і еозин; а – $\times 100$; б – $\times 50$

За таких умов в дермі відмічали виражену гіперплазію та гіпертрофію фібробластів, що нерідко супроводжувалося їх спредингом, який визначає високу функціональну активність клітин (рис. 4.16 а, б). Внаслідок цього в ділянках дерми, прилеглих до епідермісу часто виявляли фібробласти, які були розпластані на поверхні колагенових волокон, що забезпечує утворення щільних контактів між фібробластами і тонкими фібрилами колагену.

Слід зазначити, що разом із атрофічними змінами в дермі відмічали гіпотрофію придатків шкіри, зокрема, волосяних фолікулів і голокринових залоз, що проявлялося помітним у порівнянні з контролем зменшенням питомої щільності розташування цих структур у дермі шкіри, а також зменшенням їх лінійних розмірів.

Проведені на 21-у добу експерименту гістологічні дослідження показали, що

в уражених ділянках шкіри часто спостерігалось нерівномірне чергування ділянок епідермісу з його атрофічними та гіпертрофічними змінами (рис. 4.17 а, в). Часто в ділянках епідермісу з вираженими ознаками його атрофії базальний шар був утворений 1-м рядом клітин, представлених базальними кератиноцитами, шипуватий шар – 1-м рядом шипуватих клітин, а зернистий – 1-м рядом зернистих епідермоцитів, цитоплазма яких була багата на гранули кератогіаліну. Натомість роговий шар епідермісу часто був утворений з 3–4-х рядів сплющеної форми корнеоцитів щільно з'єднаних між собою, поверхню якого вкривали тонкі рогові лусочки, що утворювалися при злуценні з поверхні рогового шару змертвілих корнеоцитів (рис. 4.17 а).

Слід зазначити, що на відміну від ділянок шкіри де відмічали атрофічні зміни епідермісу в ділянках шкіри з ознаками гіпертрофії епідермісу базальний шар так само складався з 1-го ряду клітин базальних кератиноцитів серед яких часто зустрічали фігури мітозу. Натомість шипуватий і зернистий шар епідермісу були утворені з 3–4-х і більше рядів шипуватих і відповідно зернистих епідермоцитів. Цитоплазма останніх, як правило, була щільно заповнена гранулами кератогіаліну (рис. 4.17 б, в). Нерідко в шипуватому шарі епідермісу спостерігали окремі ділянки, де відмічали значне розширення міжклітинних просторів. Це дозволяло виявляти міжклітинні містки, утворені цитоплазматичними відростками клітин, за допомогою яких шипуваті клітини з'єднані поміж собою (рис. 4.17 б). За таких умов в епідермісі відмічали невеликі ділянки епідермісу, де помітно потовщений роговий шар відшаровувався від зернистого шару епідермісу, що часто нагадувало утворення невеликих пухирців. При цьому в місцях відшарування рогового шару останній набував гомогенного вигляду внаслідок дистрофії щільного з'єднаних між собою корнеоцитів (рис. 4.17 б, г).

В окремих ділянках дерми, що прилягають до епідермісу часто виявляли дрібні вогнища набряку дерми, а в окремих випадках – дрібні вогнища крововиливу та діapedезу еритроцитів в базальний шар епідермісу, що обумовлювало порушення структури дермо-епідермальних з'єднань. В наслідок діapedезу еритроцитів останні потрапляли в базальний шар епідермісу, де їх невеликі групи

часто виявлялися в розширених міжклітинних просторах базальних кератиноцитів (рис. 4.17 в, г).

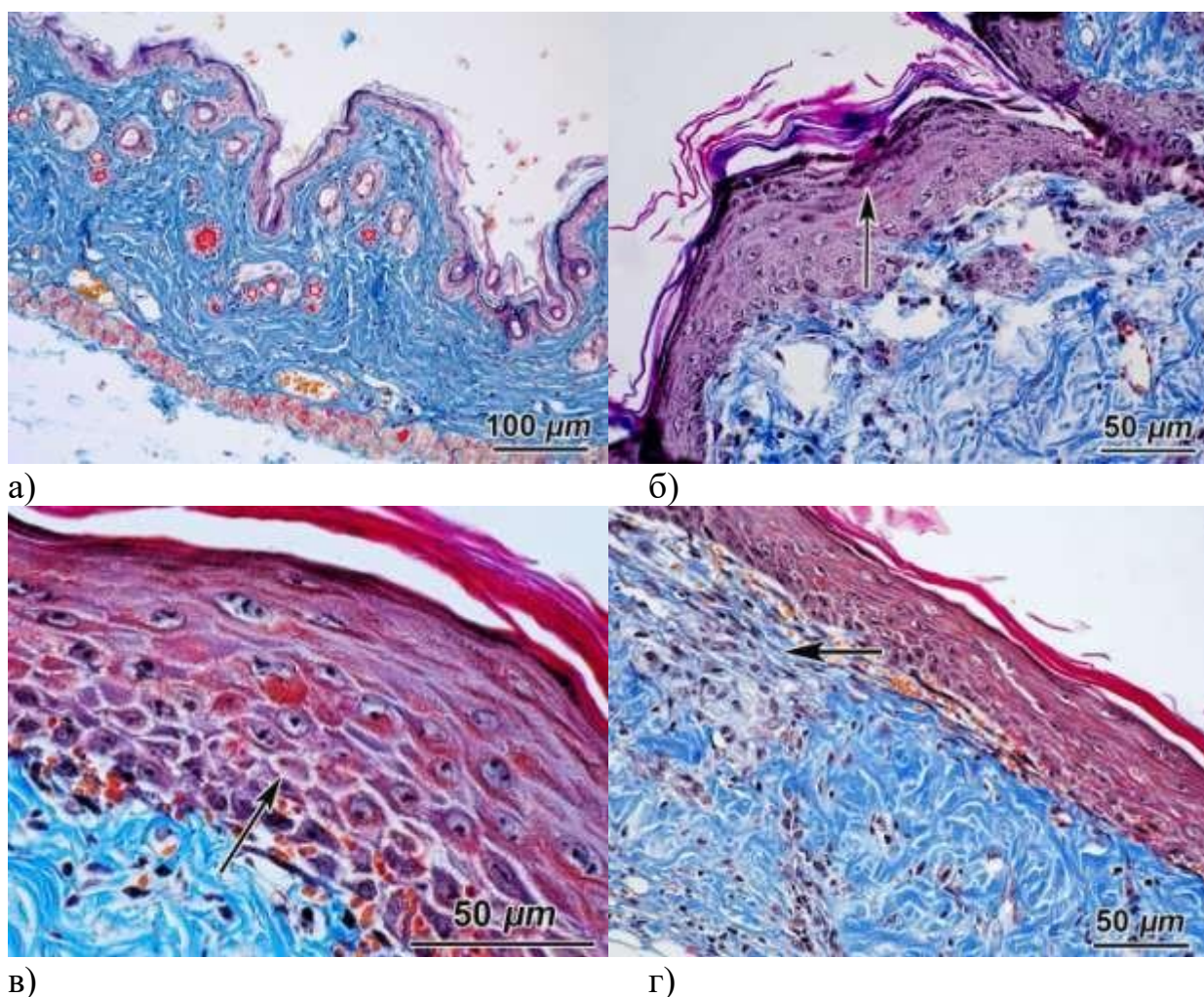


Рисунок 4.17 – Гістологічні зміни на 21 добу лікування псоріазоподібного ураження шкіри мишей ПП: а) – атрофічні зміни епідермісу, розширення просвітів і повнокров'я капілярів, помірна лімфомacroфагальна інфільтрація дерми, атрофія та гіпотрофія волосяних фолікулів і голокринових залоз; б) – гіпертрофічні зміни епідермісу, де шипуватий і зернистий шар утворений з 3–4-х і більше рядів епідермоцитів. Цитоплазма зернистих епідермоцитів багата на включення гранул кератогіаліну(↑). Вогнищевий набряк дерми в ділянках прилеглих до епідермісу; в) – крововилив під епідермісом і діapedез еритроцитів в базальний шар епідермісу. Розширені міжклітинні простори в шарі шипуватих клітин (↑), відшарування рогового шару від зернистого шару епідермісу; г) – крововилив під епідермісом, лімфомacroфагальна інфільтрація дерми, гіперплазії та гіпертрофії фібробластів з

формуванням вогнищового склерозу дерми (←). а - $\times 100$; б, в, г – $\times 50$. Метод MSB

Часто в прилеглих до епідермісу ділянках дерми спостерігали вогнища набряку, що часто супроводжувалося утворенням вогнищ лімфомакрофагальної інфільтрації, а також гіперплазією та гіпертрофією фібробластів, нерідко з утворенням вогнищ склерозу дерми (рис. 4.17 г). В таких ділянках дерми рідко виявляли придатки шкіри, зокрема, волосяні фолікули і голокринові залози, що є морфологічною ознакою атрофічних змін дерми в уражених патологічним процесом ділянках шкіри.

Результати проведених досліджень показали, що в динаміці лікування експериментального псоріазоподібного ураження гормональним лікарським засобом для місцевого застосування гідрокортизоном бутиратом в шкірі піддослідних мишей відмічали широкий спектр морфологічних змін, яких зазнавали не тільки епідерміс, але й дерма, гіподерма та придатки шкіри. При цьому, в епідермісі шкіри на 14-у добу експерименту в ушкоджених патологічним процесом ділянках шкіри переважно спостерігали атрофічні зміни епідермісу, які розвивалися на фоні дистрофічно-деструктивних змін базальних кератиноцитів та епідермоцитів шипуватого, зернистого та рогового шару, а також дистрофічно-деструктивних і запальних змін дерми, які розвивалися на фоні порушень в системі мікроциркуляторного русла шкіри. Такі зміни характерні для препаратів стероїдної структури, поряд з протизапальною дією вони викликають атрофічні зміни, що прогресують з часом.

Натомість, на 21-у добу експерименту в епідермісі шкіри піддослідних мишей разом з його атрофічними змінами спостерігали ділянки його гіпертрофії внаслідок розвитку компенсаторно-приспосувальних реакцій, спрямованих на підтримку в шкірі порушеного при патології клітинного гомеостазу. При цьому в пошкодженій патологічним процесом дермі шкіри на фоні її запальних змін і порушень кровообігу відмічали розвиток склеротичної реакції, обумовлений високою функціональною активністю клітин фібробластичного диферону.

Морфометрична оцінка товщини епідермісу шкіри мишей в динаміці лікування псоріазоподібного ураження ТЗ кремів з ОНМ.

Результати морфометричних досліджень, проведені для оцінки змін, яких зазнавав епідерміс шкіри мишей при лікуванні псоріазу засобами для місцевого застосування ТЗ кремів з 10 % ОНМ; з 10 % ОНМ в комбінації з 2 % дротаверином і ПП показали, що ефект їх лікувальної дії може бути визначений за змінами товщини епідермісу шкіри, який дозволяє провести інтегральну оцінку морфофункціонального стану шкіри в динаміці експерименту. Так, було встановлено, що при дії засобу для місцевого застосування ПП товщина епідермісу мишей на 14-у добу експерименту коливалася в межах мінімальних і максимальних значень від $16,5 \cdot 10^{-3}$ мм до $58,9 \cdot 10^{-3}$ мм (табл. 4.8) і дорівнювала значення Me (25%; 75%) в групі 31,0 (28,0; 36,0). При цьому, на 21-у добу експерименту вплив засобу для місцевого застосування ПП значимо не впливав на зміни товщини епідермісу шкіри мишей, що проявлялося коливанням у них значень показника товщини епідермісу в межах його мінімальних і максимальних значень від $16,7 \cdot 10^{-3}$ мм до $59,0 \cdot 10^{-3}$ мм (табл. 4.8; $p > 0,05$) і значеннями Me (25%; 75%) в групі 31,1 (22,7; 38,0).

Аналіз структурно-функціонального стану системи епідермісу шкіри мишей, яка складається з її окремих елементів, представлених базальним, шипуватим, зернистим, блискучим і роговим шарами епідермісу показав, що на 14-у добу експерименту ця система характеризувалася відносно вільною структурно-функціональною впорядкованістю окремих її структурних елементів, яка визначалася за відсутністю статистично значимих кореляційних зв'язків між змінами показників загальної товщини епідермісу та окремих його шарів ($p < 0,05$). Це вказує на те, що на даному терміні експерименту структурно-функціональна система епідермісу характеризувалася високою здатністю до компенсаторно-пристосувальних перебудов, які здатні забезпечити підтримку порушеного при патології гомеостазу. Натомість, на 21-у добу експерименту в структурно-функціональній системі епідермісу відмічали структурно-функціональну узгодженість між її елементами, яка характеризувалася статистично значимим кореляційним зв'язком між змінами показника загальної товщини епідермісу та його рогового шару ($r = 0,420$; $p < 0,05$). Це може бути свідченням розвитку в організмі реакцій компенсаторно-пристосувального характеру, спрямованих на

підтримку порушеного гомеостазу, зокрема, впливати на механізми, що забезпечують процес ороговіння епідермісу.

Слід наголосити, що попередньо проведені гістологічні дослідження шкіри мишей, які при моделюванні псоріазу впродовж 21-ї доби зазнавали дії засобу ПП виявили у них морфологічні зміни, що асоціюються з порушеннями процесів ороговіння епідермісу з одночасним розвитком атрофічних явищ.

Таблиця 4.8 - Вплив ТЗ кремів з ОНМ та ПП на товщину епідермісу шкіри на моделі псоріазоподібного ураження у мишей, 10^{-3} мм

Експериментальна група	14-а доба		21-а доба		p
	min-max	$\frac{Me}{(Q1; Q3)}$	min-max	$\frac{Me}{(Q1; Q3)}$	
1. Очищене нафталанове масло (ОНМ)	33,0-80,0	$\frac{55,0}{(42,5; 60,5)}$ $p_{1-3} < 0,0001$ $p_{2-3} < 0,0001$	25,2-79,6	$\frac{46,4}{(41,1; 62,6)}$ $p_{1-3} < 0,0001$ $p_{2-3} < 0,0001$	$> 0,005$ (=0,887)
2. Очищене нафталанове масло в комбінації з дртоаверинном (ОНМ+Д)	-	-	17,2-59,7	$\frac{36,7}{(31,4; 43,4)}$	
3. Препарат порівняння (ПП)	16,5-58,9	$\frac{30,9}{(28,0; 36,0)}$	16,7-59,0	$\frac{31,1}{(22,7; 38,0)}$	$> 0,005$ (=0,887)

При застосуванні ТЗ крему з 10 % ОНМ встановлено, що товщина епідермісу шкіри мишей на 14-у добу експерименту коливалася в межах мінімальних і максимальних значень від $33,0 \cdot 10^{-3}$ мм до $80,0 \cdot 10^{-3}$ мм при значенні Me (25%; 75%) в групі 55,0 (42,5; 60,5), що значимо відрізняло цю групу тварин від групи ПП ($p < 0,001$; табл. 4.8). Аналогічні відмінності за показником товщини епідермісу між цими піддослідними групами також спостерігали і на 21-у добу експерименту ($p < 0,001$; табл. 4.8). Це було обумовлено тим, що на 21-у добу експерименту, у мишей групи ОНМ товщина епідермісу шкіри коливалася в межах мінімальних і максимальних значень від $25,2 \cdot 10^{-3}$ мм до $79,6 \cdot 10^{-3}$ мм і дорівнювала значення Me (25%; 75%) в групі 46,4 (41,1; 62,6).

При аналізі структурно-функціонального стану системи епідермісу шкіри мишей групи ОНМ було встановлено, що на різних термінах експерименту (14-у і 21-у добу) будь-яких значимих змін, що характеризують структурно-

функціональні перебудови, що відбуваються поміж окремих елементів цієї системи не відбувалось. Це вказує на те, що єдина структурно-функціональна система епідермісу мишей групи ОНМ впродовж всього терміну експерименту знаходилася у відносно вільному стані її функціонування, що дозволяла системі залучати широкий спектр резервних механізмів для підтримки в організмі порушеного при патології гомеостазу.

Порівняльна оцінка ефективності кремів з ОНМ і гідрокортизону при експериментальному псоріазоподібному ураженні шкіри у мишей.

Для оцінки ефектів ТЗ крему з 10 % ОНМ та ПП (гідрокортизону бутирату) за даними змін показника товщини епідермісу шкіри мишей в динаміці лікування експериментального псоріазу було використано метод ДДА. Результати аналізу лінійних моделей ДДА показали, що ефект лікувальної дії різних засобів для місцевого застосування в динаміці експерименту при їх порівнянні між собою характеризуються рядом особливостей і відмінностей. Зокрема, було встановлено, що ТЗ крему з 10 % ОНМ та ПП (фактор «Засіб») характеризуються значимим ($p < 0,0001$) ефектом їх впливу на зміни показника товщини епідермісу шкіри мишей (табл. 4.9), що в умовах проведеного експерименту напряду не залежав від фактору тривалості його проведення (фактор «Доба»; табл. 4.9). Натомість аналіз ефектів дії досліджених в експерименті ТЗ крему з 10 % ОНМ проказав, що кожний із визначених умовами експерименту факторів («Засіб» і «Доба») сам по собі та/або за умови їх поєднання характеризуються різною величиною загального внеску у формування кінцевого ефекту.

Аналіз даних лінійної моделі ДДА для оцінки змін ефекту дії ТЗ крему з 10 % ОНМ і ПП при лікуванні експериментального псоріазу (табл. 4.9).

Було встановлено, що серед усіх врахованих в експерименті факторів значимий вплив на ефект їх дії проявляють фактор «Засіб». При цьому значимого впливу на ефект фактору тривалості їх дії («Доба») не спостерігали. Так, для ТЗ крему з 10 % ОНМ і ПП значимість впливу фактору «Засіб» на формування ефекту лікувальної дії визначалась показниками $F=60,12$; $p < 0,0001$ і P , що характеризує його питомий внесок у розвитку ефекту на рівні 37,5 % (табл. 4.9).

Таблиця 4.9 – Показники лінійної моделі ДДА ефекту впливу експериментальних факторів при лікуванні експериментального псоріазу у мишей

Ефект	<i>SS</i>	<i>df</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>eta</i>	<i>P</i> , %
Оцінка ефекту при дії ТЗ кремів з 10 % ОНМ та ПП							
Вільний член	161896,1	1	161896,1	1078,3	<0,0001	0,9151	91,51
«Доба»	25,1	1	25,1	0,1	0,6832	0,0016	0,16
«Засіб»	9026,8	1	9026,8	60,1	<0,0001	0,3754	37,54
«Доба+Засіб»	51,5	1	51,5	0,3	0,5593	0,0034	0,34
Похибка	15012,9	100	150,1				

Примітки: 1) *SS* – сума квадратів; 2) *df* – ступінь свободи; 3) *MS* – середній квадрат ефекту; 4) *F* – внутрішньогрупова дисперсія; 5) *p* – статистична значимість при $\alpha=0,05$; 6) *P* – потужність впливу факторів при $\alpha=0,05$.

Разом із цим відсутність значимого впливу фактору, що характеризує тривалість застосування засобів ОНМ і ПП (фактор «Доба») визначалась показниками $F=0,16$; $p=0,6832$ і *P*, що дорівнював 0,16 % (табл. 4.9). Це також визначалось за характерним трендом змін відповідних ефектів, що представлені на графічній моделі ДДА (рис. 4.18). При цьому, поєднання факторів «Засіб» і «Доба» значимо не впливали на ефект дії ТЗ крему з 10 % ОНМ і ПП (табл. 4.9; рис. 4.18).

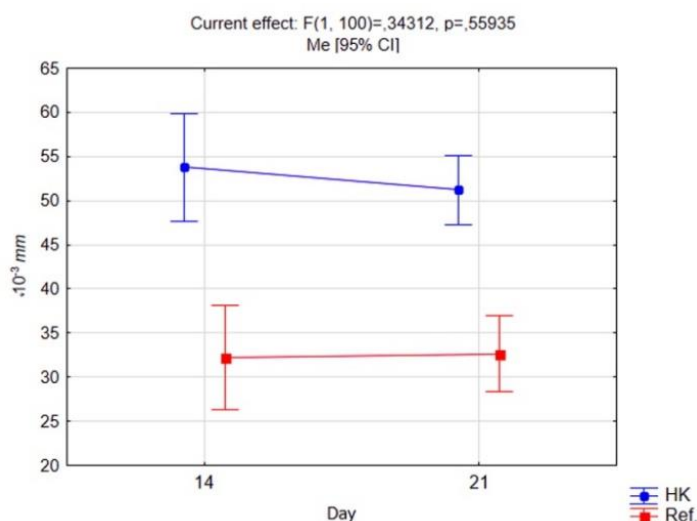


Рисунок 4.18 – Лінійна модель ДДА (графічне відображення) для порівняльної оцінки ефекту дії ТЗ крему з 10 % ОНМ та ПП (гідрокортизону) у мишей з експериментальним псоріазоподібним ураженням шкіри у мишей.

Висновки до розділу 4

2. Іміквімод-індукована модель експериментального псоріазоподібного ураження шкіри у мишей лінії BALB/c є оптимальною для відтворення та дослідження нових антипсоріатичних сполук. При топічному нанесенні іміквімоду у дозі 62,5 мг на депільовану ділянку шкіри площею 6 см² щоденно протягом 9 діб відбувається формування характерних макро- та мікроскопічних ознак псоріазоподібного ураження шкіри (еритема, десквамація, інфільтрація, нерівномірне потовщення епідермісу, акантоз, гіперкератоз та ін). Це підтверджувалося швидким зростанням індексу mPASI, який на 9 добу становив 7,0 (6,0; 8,0) балів.

3. Суттєвих та закономірних змін інтегральних показників життєдіяльності тварин (мишей лінії BALB/c) при моделюванні патологічного процесу (псоріазоподібне ураження поголеної ділянки шкіри спини), так і при застосуванні досліджуваних тест-зразків кремів з 10 % очищеним нафталановим маслом; з 10 % очищеним нафталановим маслом в комбінації з 2 % дротаверином; і препаратом порівняння (гідрокортизону бутирату) не мали. Виявлено, що дані тест-зразки кремів не чинять системної та місцевої подразнювальної дії.

4. Тест-зразок крему з 10 % очищеним нафталановим маслом у комбінації з 2 % дротаверином виявив виражену антипсоріатичну дію протягом усього періоду лікування, на відміну від інших тест-зразків кремів та препарату порівняння, спостерігалася стабільна тенденція до зниження індексу mPASI. На 21-у добу лікування у даного тест-зразка була ефективність зіставна з препаратом порівняння. При топічному використанні тест-зразка крему з 10 % очищеним маслом в комбінації з 2 % дротаверином індекс mPASI дорівнював 1,0 (0,0; 1,0) балу, що є найкращим показником серед усіх досліджуваних тест-зразків. Його ефективність перевищила дію препарату порівняння гідрокортизону, для якого індекс mPASI на 21-у добу становив 1,5 (0,0; 3,0) бали.

5. У лабораторних тварин із індукованим псоріазоподібним ураженням шкіри на фоні посиленого карагінаном запалення тест-зразок крему з 10 % очищеним нафталановим маслом знижував больову чутливість (поріг больової

чутливості зростав) та виявляв більш високу протизапальну активність порівняно з іншими тест-зразками кремів і препаратом порівняння. Через 4 години після введення карагінану протинабрякова активність тест-зразка крему з 10 % очищеним нафталановим маслом в комбінації з 2 % дротаверином дорівнювала 29,0 %, що була зіставна з препаратом порівняння (32,0 %). Тест-зразок крему з монокомпонентним 10 % очищеним нафталановим маслом виявляв низьку протизапальну активність (19,0 %). Комбінація очищеного нафталанового масла з дротаверином виявляє синергістичну протизапальну дію.

6. Результати гістологічного та морфометричного аналізу шкіри тварин свідчать, що при застосуванні тест-зразків кремів на основі очищеного нафталанового масла відновлюється нормальна стратифікована будова епідермісу, зменшується запалення (усуваються набряки та лімфомакрофагальні інфільтрати), нормалізується судинний тонус та структури колагенових волокон у дермі. Висока репаративна активність відмічалася при використанні тест-зразка крему з 10 % очищеним нафталановим маслом у комбінації з 2 % дротаверином. На 21-у добу лікування в більшості уражених ділянок шкіри відбувалося відновлення шарів епідермісу, зменшення запальних вогнищ у дермі, покращення мікроциркуляції та часткове відновлення придатків шкіри (стимулювався ріст волосяного покриву).

7. За ефективністю антипсоріатичної дії тест-зразок крему комбінованого складу з 10 % очищеним нафталаном маслом і 2 % дротаверином на моделі імквімодового ураження шкіри і на моделі посиленого карагінаном псоріазоподібного ураження шкіри за 21-денного курсу лікування не поступався дії препарату порівняння гідрокортизону бутирату, а відсутність негативних морфологічних змін шкіри, що виникали під впливом кортикостероїдного препарату, свідчать про більш сприятливий профіль безпеки, що надають йому додаткових переваг при тривалому застосуванні.

Даний розділ висвітлено в матеріалах наступних публікацій:

1. Горбач, А. О., & Зайченко, Г. В. Порівняльна оцінка ефективності нових тест-зразків кремів з очищеним нафталановим маслом на експериментальній

моделі псоріазу. *Фармацевтичний журнал*. 2024;(6):61-72. doi:10.32352/0367-3057.6.24.05.

2. Горбач А.О., Стан І.Ю., Луговський С.П., Зайченко Г.В. Вплив очищеного нафталанового масла у складі топічних препаратів на морфологічні зміни шкіри при експериментальному псоріазі. *Медична наука України* 2025;1 doi:10.32345/2664-4738.1.2025.01

РОЗДІЛ 5

ДОСЛІДЖЕННЯ ГОСТРОЇ, СУБХРОНІЧНОЇ ТОКСИЧНОСТІ, МІСЦЕВОЇ ПЕРЕНОСИМОСТІ КРЕМУ З ОЧИЩЕНИМ НАФТАЛАНОВИМ МАСЛОМ *IN VIVO* ТА БЕЗПЕКИ В УМОВАХ *IN VITRO* НА КЕРАТИНОЦИТАХ ЛЮДИНИ

У межах цього етапу дисертаційної роботи було досліджено окремі показники безпеки крему з 10 % ОНМ в дослідях *in vivo* (гостру токсичність при однократному та 21-денному нашкірному нанесенні білим нелінійним щурам обох статей, місцеву переносимість у мурчаків) та безпеку ОНМ в експериментальних модельних системах *in vitro*. Для реалізації такого експериментального підходу застосовували культивування кератиноцитів людини HaCaT і HaCaT/P, потоchnу цитометрію, МТТ-тест.

5.1 Результати дослідження гострої токсичності крему з 10 % ОНМ

Гостра токсичність препарату є одним з найбільш показових інтегральних показників активності лікарських засобів, що значною мірою характеризує його безпеку. Вона визначається величиною дози, одноразове введення якої призводить до загибелі 50 % дослідних тварин (середня смертельна доза, ЛД₅₀).

Критеріальною точкою токсичної дії ОНМ в лікарській формі крем була загибель тварин, відповідно до загальноприйнятого в токсикології ліків методу (В.Б. Прозоровського та співавт.) щодо визначення середньої смеральної дози (ЛД₅₀). Дослідження гострої токсичності крему з ОНМ проводилося за одноразового нашкірного застосування препарату ненаркотизованим щурам обох статей для виключення можливої статевої чутливості до препарату. Факт наявності загибелі щурів відзначався щоденно упродовж 14 діб [139].

Рекомендовані зазначеним методом та обрані до дослідження дози препарату наносили на депільовану частину спини білого щура. Депіляцію проведено

методом вистриження шерстного покриву ножицями із заокругленими браншами. Площа депіляції складала 4 см² (2 см х 2 см) [75].

За дослідження гострої токсичності щоденно відстежувалися зовнішні ознаки ураження, порушення вегетативних функцій, реакції на зовнішні подразники, здатність споживати корм та воду, рухові функції.

За 3 год до нанесення препарату припиняли годування тварин і залишали для них воду за вільного доступу до неї.

Для визначення середньолетальної дози крему з 10 % ОНМ випробувано 4 дози – 2500, 3160, 3980, 5000 мг/кг маси тіла тварини у перерахунку на лікарську форму, кожна з яких один раз наносилася двом тваринам на бокову депільовану частину спини очним шпателем за м'якої ручної фіксації щура. Наважку ОНМ готували окремо для кожної тварини з урахуванням її маси тіла на момент нанесення препарату. Упродовж 5 хв тварину утримували у фіксованому стані. Потім на шию кожної тварини одягали «коміречь» для запобігання злизування крему зі спини та поміщали кожну тварину з комірцем в окрему клітку на 25 хв. Фактично, експозиція крему на депільованій поверхні спини зберігалася упродовж 30 хв. Після закінчення експозиції комірці у щурів знімали та відновлювали доступ тварин до корму та води.

Згідно наведених у табл. 5.1 даних, одноразове нашкірне нанесення ОНМ у дозах до 5000,0 мг/кг маси тіла тварини (включно) не призводило до загибелі щурів як серед самиць, так і серед самців, що унеможлиблює розрахунок середньої смертельної дози препарату. Отримані результати свідчать про відсутність статевої чутливості до ОНМ.

Нанесення більш високих доз препарату для визначення саме конкретної величини середньої летальної дози не є фізіологічно обґрунтованим та доцільним [75].

Таблиця 5.1 – Вивчення гострої токсичності ОНМ для білих щурів за нашкірного нанесення

Стать тварин	Доза, мг/кг	Результат* (через 14 діб)	ЛД ₅₀ , мг/кг
Самці	2500,0	0/2	Не визначено
	3160,0	0/2	
	3980,0	0/2	
	5000,0	0/2	
Самиці	2500,0	0/2	Не визначено
	3160,0	0/2	
	3980,0	0/2	
	5000,0	0/2	

Примітка: * - відношення кількості тварин, які загинули, до загальної кількості щурів у групі на кожну з доз.

Через 1 год, 3 год та 24 год після нанесення ОНМ, а також упродовж усіх інших термінів спостереження тварини адекватно реагували на зовнішні подразники, активно споживали їжу та воду, видимих уражень слизових оболонок не відзначалося, рухова активність – без змін, безумовні рефлексії збережені. Тобто, зоосоціальні взаємовідносини та поведінкові реакції не мали будь-яких видимих відхилень від фізіологічної норми.

У тварин усіх груп зареєстровано фізіологічний приріст маси тіла (табл. 5.2).

Отримані дані свідчать про те, що одноразове нашкірне нанесення досліджуваного тест-зразка ОНМ щурам обох статей у різних дозах не вплинуло на динаміку маси тіла порівняно до тварин контрольної групи. Дослідні та контрольні тварини набирали вагу у відповідності до фізіологічної норми.

Таблиця 5.2 – Динаміка маси тіла ($M \pm m$; г) у білих щурів обох статей за дослідження гострої токсичності препарату ОНМ у лікарській формі крем

Доза препарату, мг/кг	Вихідні значення	7 доба	14 доба	% приросту маси
Група тварин позитивного контролю (інтактні щури)				
-	225,73 $\pm$ 3,49	242,39 $\pm$ 4,31*	254,42 $\pm$ 5,46*	13
Крем з 10 % ОНМ				
2500,0	226,2 $\pm$ 3,1	246,5 $\pm$ 7,1*	250,0 $\pm$ 7,1*	11
3160,0	221,0 $\pm$ 2,6	238,5 $\pm$ 9,1	248,5 $\pm$ 7,1*	12
3980,0	231,5 $\pm$ 2,9	252,5 $\pm$ 4,6*	261,5 $\pm$ 5,7*	13
5000,0	209,0 $\pm$ 4,1	223,5 $\pm$ 10,6	237,0 $\pm$ 9,0*	13

Примітка: * - $p < 0,05$ відносно вихідних значень у щурів відповідної групи.

Дермальний крем з 10 % ОНМ у дозах від 2500,0 мг/кг до 5000,0 мг/кг маси тіла тварини (включно) не призводив до загибелі щурів як серед самиць, так і серед самців, що унеможливило розрахунок середньої смертельної дози препарату за одноразового нашкірного застосування. Крем з ОНМ не виявив токсичної дії на організм білих нелінійних статевозрілих щурів обох статей за даними клінічних спостережень та динаміки маси тіла, що дозволяє віднести його до малотоксичних засобів. Гендерних особливостей токсичного впливу ОНМ у різних дозах не виявлено за одноразового нашкірного нанесення білим щурам.

5.2 Результати дослідження субхронічної токсичності крему з 10 % ОНМ за умов його тривалого 21-денного застосування

Упродовж 21 доби за щоденного нанесення ОНМ на шкіру тварин жодного випадку загибелі серед щурів різних статей не виявлено.

Після щоденного нанесення ОНМ упродовж 21 доби за зовнішнього огляду тварин ознак патологічних змін їх стану не виявлено, шерсть гладенька та чиста, підшкірний шар жирової тканини виражений помірно, на слизових оболонках та на шкірі уражень не спостерігалось. Реакція на зовнішні подразники у самців та у самиць збережена, рухова активність тварин дослідних груп не відрізнялася від такої у тварин контрольної групи. Не відзначено порушень вегетативних функцій та безумовних рефлексів у щурів.

За результатами зважування тварин встановлено, що у них спостерігався фізіологічний приріст маси тіла, аналогічний до приросту маси тіла у тварин контрольної групи (табл. 5.3).

Таблиця 5.3 – Динаміка маси тіла ($M \pm m$; г; $n=10$) у білих щурів обох статей за дослідження токсичності ОНМ у лікарській формі крем за його тривалого уведення

Стать	Вихідні значення	7 доба	14 доба	21 доба
Група тварин позитивного контролю (інтактні щури)				
Самці	223,5 $\pm$ 4,5	234,0 $\pm$ 4,4	248,8 $\pm$ 3,6*	257,8 $\pm$ 3,6*
Самиці	233,4 $\pm$ 1,4	246,5 $\pm$ 5,1	254,5 $\pm$ 3,2*	262,8 $\pm$ 6,6*
Крем з 10 % ОНМ				
Самці	236,2 $\pm$ 2,1	246,5 $\pm$ 8,3	259,0 $\pm$ 4,4*	264,8 $\pm$ 6,3*
Самиці	221,0 $\pm$ 3,6	234,5 $\pm$ 4,7	248,5 $\pm$ 7,1*	259,8 $\pm$ 3,6*

Примітка: * - $p < 0,05$ відносно вихідних значень у тварин відповідної групи.

Визначено абсолютну масу внутрішніх органів щурів після застосування ОНМ (табл. 5.4).

Таблиця 5.4 – Маса ($M \pm m$; г; $n=10$) внутрішніх органів після щоденного нашкірного нанесення ОНМ білим щурам обох статей

Стать щурів	Печінка	Нирки	Серце	Наднирники	Легені	Яєчка
Група тварин позитивного контролю (інтактні щури)						
Самці	9,8 $\pm$ 0,34	2,1 $\pm$ 0,1	0,96 $\pm$ 0,07	0,02 $\pm$ 0,002	1,31 $\pm$ 0,4	1,20 $\pm$ 0,12
Самиці	9,95 $\pm$ 0,69	2,2 $\pm$ 0,08	0,95 $\pm$ 0,10	0,020 $\pm$ 0,002	1,31 $\pm$ 0,2	-
Крем з 10 % ОНМ						
Самці	10,1 $\pm$ 0,17	2,3 $\pm$ 0,10	0,95 $\pm$ 0,04	0,023 $\pm$ 0,001	1,36 $\pm$ 0,2	1,50 $\pm$ 0,67
Самиці	9,9 $\pm$ 0,12	2,3 $\pm$ 0,10	0,99 $\pm$ 0,07	0,020 $\pm$ 0,002	1,34 $\pm$ 0,2	-

Примітка: достовірних відмінностей не виявлено.

Згідно отриманих результатів, тривале нанесення ОНМ на депільовану шкіру тварин не призводило до видимих змін у внутрішніх органах, вони мали звичайне розташування та колір. Легені зберігали свою специфічну структуру, кишечник не наповнений повітрям, розмір та маса внутрішніх органів – без суттєвих змін і відхилень від фізіологічної норми.

Маса внутрішніх органів у статевозрілих білих щурів, які отримували ОНМ, достовірно не відрізнялася від маси органів щурів контрольної групи. Отримані результати можуть свідчити про відсутність органотоксичності для ОНМ.

За реєстрації ЧСС та ЧД не відмічалось достовірних змін у щурів у різні терміни від початку нашкірного нанесення ОНМ, зазначені показники знаходилися у межах фізіологічної норми (табл. 5.5).

Таблиця 5.5 – Вплив ОНМ на функціонування серцево-судинної та дихальної систем у щурів за тривалого застосування

Показник	Вихідні значення	7 доба	14 доба	21 доба
Група тварин позитивного контролю (інтактні щури), n=10 (самці і самиці)				
ЧД, 1/хв	89,0± 2,8	89,0± 2,9	84,0± 4,3	85,0± 1,7
ЧСС, удар/хв	352,7± 13,3	349,7± 11,2	359,7± 16,2	355,9± 10,4
Крем з 10 % ОНМ, n=10 (самці і самиці)				
ЧД, 1/хв	87,0±1,9	84,0± 4,2	87,0± 4,7	82,0± 5,7
ЧСС, удар/хв	338,7± 14,2	344,3± 14,7	352,3± 11,7	348,3± 9,5

Примітка: достовірних відмінностей не виявлено.

За результатами проведених досліджень встановлено, що за нашкірного тривалого застосування ОНМ не відзначено токсичної дії препарату ні на внутрішні органи, ні на функціонування життєво-важливих органів та систем.

5.3 Дослідження місцево-подразнювальної дії крему з 10 % ОНМ за умов тривалого застосування

Зовнішній вигляд (колір, цілісність) депільованих частин лівого та правого боків у кожної з тварин був однаковий. Фактично, на депільованій шкірі лівого (дослідного) боку мурчаків не спостерігалось мацерації, потовщення шкірної складки, порушення цілісності шкіри, як і на правому боці (табл. 5.6).

Слабка еритема відзначалася у двох тварин дослідної групи через 1 добу і в однієї тварини через 3 доби від початку нанесення крему з ОНМ. Тобто, закономірних, стійких, суттєвих змін, що підтверджували б подразнювальну дію ОНМ на шкіру, не виявлено.

За механічного подразнення скляним очним шпателем депільованих ділянок шкіри правого та лівого боків у жодного мурчака не зафіксовано больової реакції, про що свідчить відсутність дратівливості, підвищення рухової активності, вокалізації тощо.

Таблиця 5.6 – Оцінка місцево-подразнювальної дії крему з 10 % ОНМ за умов його нашкірного нанесення у дослідях на мурчаках (n=10)

Показник*	Термін спостереження, доба					
	1		3		7	
Група тварин позитивного контролю (інтактні самиці і самці)						
	частота	бали	частота	бали	частота	бали
Гіперемія	0/10*	0	1/10	1	0/10	0
Набряк	0/10	0	0/10	0	0/10	0
Потовщення шкірної складки	0/10	0	0/10	0	0/10	0
Мацерація	0/10	0	0/10	0	0/10	0
Порушення цілісності шкірного покриву	0/10	0	0/10	0	0/10	0
Крем з 10 % ОНМ (самиці і самці)						
	частота	бали	частота	бали	частота	бали
Гіперемія	2/10	1	1/10	1	0/10	
Набряк	1/10	1	0/10	0	0/10	0
Потовщення шкірної складки	0/10	0	0/10	0	0/10	0
Мацерація	0/10	0	0/10	0	0/10	0
Порушення цілісності шкірного покриву	0/10	0	0/10	0	0/10	0

Примітка. * - відношення кількості тварин, у яких відзначалися відповідні симптоми, до загальної кількості щурів у групі.

Отже, за результатами проведеного дослідження, можна стверджувати, що крем з 10 % ОНМ не виявляє місцево-подразнювальної дії за умов тривалого нанесення на шкіру мурчаків.

5.4 Оцінка безпеки ОНМ в експериментальних клітинних модельних системах *in vitro*

Для оцінки ефективності та безпеки ОНМ було залучено клітинні технології з використанням клітинної лінії кератиноцитів людини HaCaT, як у вихідному стані, так і модифікованих цитокінами HaCaT/P. Такий підхід дозволив не лише з'ясувати окремі механізми дії ОНМ, а й порівняти його вплив на «умовно нормальні» та «патологічні» клітини шкіри. Водночас це відкриває два напрями для

подальших доклінічних досліджень: оцінювання ефективності та вивчення безпеки *in vitro*.

Дослідження життєздатності кератиноцитів людини вихідної HaCaT та модифікованої сублінії HaCaT/P після їх експозиції з ОНМ та ПП (гідрокортизоном).

На даному етапі ми досліджували життєздатність вихідних клітин HaCaT і модифікованих шляхом тривалого впливу цитокінів для експериментального моделювання псоріазоподібних змін у клітинній системі – HaCaT/P. При порівняльній оцінці ми проаналізували широкий діапазон концентрацій ОНМ. При цьому для порівняння паралельно оцінювали життєздатність клітин кератиноцитів до стандартного антипсоріатичного засобу – гідрокортизонового крему та розчинників, що були використані в роботі (табл. 5.7, 5.8).

Більш безпечну дію на кератиноцити ОНМ має в діапазоні концентрацій 0,16–2,5 %, особливо при впливі на клітини HaCaT без псоріазоподібних змін. Підвищена чутливість модифікованих кератиноцитів до дії ОНМ може відображати специфічну активацію механізмів, що залучені до патогенезу псоріазу.

Таблиця 5.7 – Життєздатність (число живих клітин, %) кератиноцитів людини лінії HaCaT після їх обробки ОНМ та ПП (фарбування – кристалічним фіолетовим)

Концентрація ОНМ, %	Кількість живих клітин, %	Концентрація Гідрокортизонавого крему, %	Кількість живих клітин, %	Концентрація ДМСО, %	Кількість живих клітин, %	Концентрація етилового спирту, %	Кількість живих клітин, %
10,0	5,6±1,9	10,0	0,3±0,3	10,0	74,2±2,8	10,0	64,0±3,1
5,0	82,6±2,0	5,0	0,9±0,8	5,0	91,6±1,6	5,0	82,1±3,0
2,5	100,0±0,4	2,5	2,0±0,4	2,5	100,1±0,3	2,5	92,5±1,6
1,25	100,2±0,5	1,25	2,1±0,5	1,25	101,0±0,9	1,25	101,7±2,4
0,62	100,4±0,7	0,62	6,5±1,4	0,62	101,3±0,8	0,62	99,1±0,9
0,31	101,2±0,8	0,31	45,8±8,8	0,31	101,3±1,2	0,31	100,8±2,1
0,16	100,3±0,7	0,16	71,1±1,1	0,16	100,5±0,7	0,16	100,6±0,3

Таблиця 5.8 – Життєздатність (число живих клітин, %) кератиноцитів людини модифікованої сублінії HaCaT/P після їх обробки Нафталановим маслом та ПП (фарбування – кристалічним фіолетовим)

Концентрація ОНМ, %	Кількість живих клітин, %	Концентрація Гідрокортизонавого крему, %	Кількість живих клітин, %	Концентрація ДМСО, %	Кількість живих клітин, %	Концентрація етилового спирту, %	Кількість живих клітин, %
2,0	4,2±1,6	2,0	0,6±0,5	2,0	86,4±1,0	2,0	93,1±2,4
1,0	21,9±6,3	1,0	1,0±0,4	1,0	99,8±1,6	1,0	96,7±3,0
0,5	80,7±10,6	0,5	1,3±0,3	0,5	100,0±0,5	0,5	97,6±2,1
0,2	92,2±0,3	0,2	4,1±0,9	0,2	98,5±1,2	0,25	100,0±0,6
0,13	97,0±3,1	0,13	13,4±1,1	0,13	99,4±1,2	0,13	100,7±1,3
0,06	100,6±1,2	0,06	42,8±4,1	0,06	100,6±0,8	-	-
0,03	101,2±1,0	0,03	80,6±2,5	0,03	100,5±0,7	-	-

На основі отриманих даних було розраховано IC_{50} для нового продукту ОНМ (табл. 5.9). Показано, що модифіковані клітини НаСаТ/Р характеризуються достовірним і статистично значущим зниженням IC_{50} порівняно з контрольними клітинами, що свідчить про суттєве підвищення їх чутливості (у 8,8 раз) до ОНМ.

Таблиця 5.9 – IC_{50} дослідних зразків за кількістю живих клітин (білок, ДНК)

Досліджуваний препарат	ОНМ	ПП
Клітини НаСаТ, значення IC_{50} , %	$6,36 \pm 0,12$	$0,34 \pm 0,05$
Клітини НаСаТ/Р, значення IC_{50} , %	$0,72 \pm 0,06^*$	$0,05 \pm 0,01^*$

Примітки: * зміни показників статистично достовірні один відносно одного, $p \leq 0,05$

Така ж тенденція – суттєве підвищення чутливості модифікованих цитокінами кератиноцитів до дії ОНМ порівняно з контрольними клітинами НаСаТ – спостерігалася і за умов оцінки їх метаболічної та дихальної активності – що реєструється за результати тесту МТТ (табл. 5.10, 5.11). IC_{50} до тестових речовин при модифікації клітин (НаСаТ/Р) знижується в 5 разів (табл. 5.12).

Таблиця 5.10 – Дихальна активність кератиноцитів людини лінії HaCaT після експозиції їх з ОНМ та ПП (МТТ-тест)

Концентрація ОНМ, %	Дихальна активність клітин, %	Концентрація Гідрокортизонавого крему, %	Дихальна активність клітин, %	Концентрація ДМСО, %	Дихальна активність клітин, %	Концентрація етилового спирту, %	Дихальна активність клітин, %
10,0	2,3±0,7	10,0	0,5±0,5	10,0	72,0±3,6	10,0	44,5±4,3
5,0	73,7±6,6	5,0	0,4±0,5	5,0	86,8±1,4	5,0	74,5±2,9
2,5	98,2±5,0	2,5	0,7±0,3	2,5	95,8±1,5	2,5	86,6±3,6
1,25	100,5±0,8	1,25	0,7±0,3	1,25	101,7±2,8	1,25	99,8±1,8
0,62	100,5±3,1	0,62	2,0±0,8	0,62	98,2±0,7	0,62	99,4±0,9
0,31	100,4±1,6	0,31	39,8±5,3	0,31	98,1±3,0	0,31	100,1±0,7
0,16	101,8±1,3	0,16	67,9±3,8	0,16	98,8±3,7	0,16	100,9±1,2

Таблиця 5.11 – Дихальна активність кератиноцитів людини модифікованої субліній HaCaT/P після експозиції їх з ОНМ та ПП (МТТ-тест)

Концентрація ОНМ, %	Дихальна активність клітин, %	Концентрація Гідрокортизонавого крему, %	Дихальна активність клітин, %	Концентрація ДМСО, %	Дихальна активність клітин, %	Концентрація етилового спирту, %	Дихальна активність клітин, %
2,0	4,4 ± 1,3	2,0	0,3±0,1	2,0	78,2±4,5	2,0	77,3±3,5
1,0	65,4±5,6	1,0	0,5±0,2	1,0	89,6±1,9	1,0	93,0±0,9
0,5	92,6±0,9	0,5	0,9±0,7	0,5	95,4±1,2	0,5	95,1±1,8
0,2	98,8±2,4	0,25	4,5±2,6	0,25	97,4±1,4	0,25	96,8±0,7
0,13	99,1±1,5	0,13	20,3±6,0	0,13	98,3±1,7	0,13	99,7±1,1
0,06	100,2±1,8	0,06	52,7±4,8	0,06	99,1±0,8	-	-
0,03	100,9±1,0	0,03	89,0±4,0	0,03	101,2±1,8	-	-

У лінії HaCaT (табл. 5.11) дихальна активність при експозиції з ОНМ залишалася на високому рівні в концентраційному діапазоні 0,16–2,5 %, що збігається з даними щодо життєздатності клітин. У модифікованій сублінії HaCaT/P (табл. 5.11) IC_{50} за показником МТТ становила $1,13 \pm 0,12$ %, що в 5 разів менше, ніж у «нормальних» клітин ($5,8 \pm 0,3$ %) (табл. 5.12). Така виражена відмінність підкреслює, що псоріазоподібна сублінія реагує більш чутливо на вплив ОНМ, і це може бути пов'язано з активацією запальних та окисно-відновних процесів, характерних для псоріазу.

Препарат порівняння продемонстрував високий рівень цитотоксичності (особливо за вищих концентрацій), що корелює з відомими побічними ефектами кортикостероїдів, і таким чином, підкреслює потенційні переваги менш токсичного ОНМ.

Таблиця 5.12 – IC_{50} дослідних зразків за показником дихальної активності клітин

Досліджуваний препарат	ОНМ	ПП
Клітини HaCaT, значення IC_{50} , %	$5,8 \pm 0,3$	$0,33 \pm 0,01$
Клітини HaCaT/P, значення IC_{50} , %	$1,13 \pm 0,12^*$	$0,06 \pm 0,01^*$

Примітки: * зміни показників статистично достовірні один відносно одного, $p \leq 0,05$

Висновки до розділу 5

1. За результатами вивчення гострої (за одноразового нашкірного нанесення у діапазоні доз від 2500,0 до 5000,0 мг/кг) і субхронічної токсичності *in vivo* за умов тривалого 21-денного нашкірного застосування очищеного нафталанового масла не виявлено токсичної дії препарату ні на внутрішні органи, ні на функціонування життєво-важливих органів та систем у білих нелінейних щурів обох статей, що дозволяє віднести його до малотоксичних засобів. Крем з 10 % ОНМ не чинить місцево-подразнювальної дії за умов тривалого нанесення на шкіру мурчаків.

2. Оцінка параметрів безпеки в дослідях *in vitro* свідчить, що псоріазомодифікована сублінія кератиноцитів людини HaCaT/P продемонструвала

статистично значуще зниження IC_{50} для ОНМ, порівняно з немодифікованими клітинами, що свідчить про більшу чутливість патологічних клітин до ОНМ. На основі показника життєздатності (метод кристалічного фіолетового) встановлено, що IC_{50} для ОНМ у модифікованих клітин HaCaT/P ($0,72 \pm 0,06$ %) у 8,8 разу нижча, ніж у вихідних клітин HaCaT ($6,36 \pm 0,12$ %). За результатами МТТ-тесту (оцінка дихальної активності), IC_{50} для HaCaT/P ($1,13 \pm 0,12$ %) теж істотно (у 5 разів) менша, ніж у нормальних кератиноцитів ($5,8 \pm 0,3$ %). Псоріазомодифіковані клітини мають більш високу, ніж інтактні (здорові) кератиноцити, чутливість до ОНМ.

3. При концентраціях ОНМ, що ефективно знижують життєдіяльність і метаболічну активність HaCaT/P, вихідна лінія HaCaT залишалася життєздатною (близькою до 100 %), що може свідчити про потенційно сприятливий профіль безпеки ОНМ. Цей результат свідчить про вибірккову дію ОНМ на патологічно змінені псоріазомодифіковані клітини й потенційно безпечніший профіль порівняно з кортикостероїдним препаратом гідрокортизону бутиратом, що виявляє більшу цитотоксичність.

РОЗДІЛ 6

ВИВЧЕННЯ ОКРЕМИХ ЛАНОК МЕХАНІЗМУ ДІЇ ОЧИЩЕНОГО
НАФТАЛАНОВОГО МАСЛА В МОДЕЛЬНИХ СИСТЕМАХ IN VITRO6.1 Оцінка рівня апоптозу та продукції АФК модифікованих
кератиноцитів HaCaT/P внаслідок дії ОНМ та ПП

Для подальшої оцінки ефективності та деталізації механізму дії нового потенційного антипсоріатичного продукту ОНМ на кератиноцити, модифіковані цитокінами, оцінювали параметри апоптозу в клітинах після дії досліджуваної речовини (табл. 6.1, рис. 6.1). В результаті було показано, що % клітин у пізній фазі апоптозу статистично достовірно збільшується після експозиції клітин з ОНМ ($p \leq 0,05$): у 2 рази порівняно з контрольними клітинами. Також спостерігалось збільшення кількості клітин у фазі середнього та раннього апоптозу після впливу досліджуваного продукту порівняно з контрольними клітинами, хоча різниця не була статистично значущою (табл. 6.1). При цьому ПП також викликав статистично значуще збільшення кількості апоптичних клітин на стадії середнього та пізнього апоптозу.

Таблиця 6.1 – Кількість кератиноцитів HaCaT/P у різних фазах апоптозу після експозиції їх з ОНМ та ПП

Досліджувана речовина	Концентрація досліджуваної сполуки, %	Живі клітини, %	Ранній апоптоз, %	Середній апоптоз, %	Пізній апоптоз, %
Контроль клітин	-	90,5±0,4	0,3±0,1	0,28±0,01	9,0±0,5
ОНМ	1,0	78,95±0,25*	0,56±0,06	1,87±0,5	18,64±0,81*
ПП	0,05	72,71±3,47*	0,19±0,02	0,42±0,02*	26,7±3,47*

Примітка: * - зміни показників статистично достовірні відносно контрольної групи, $p \leq 0,05$.

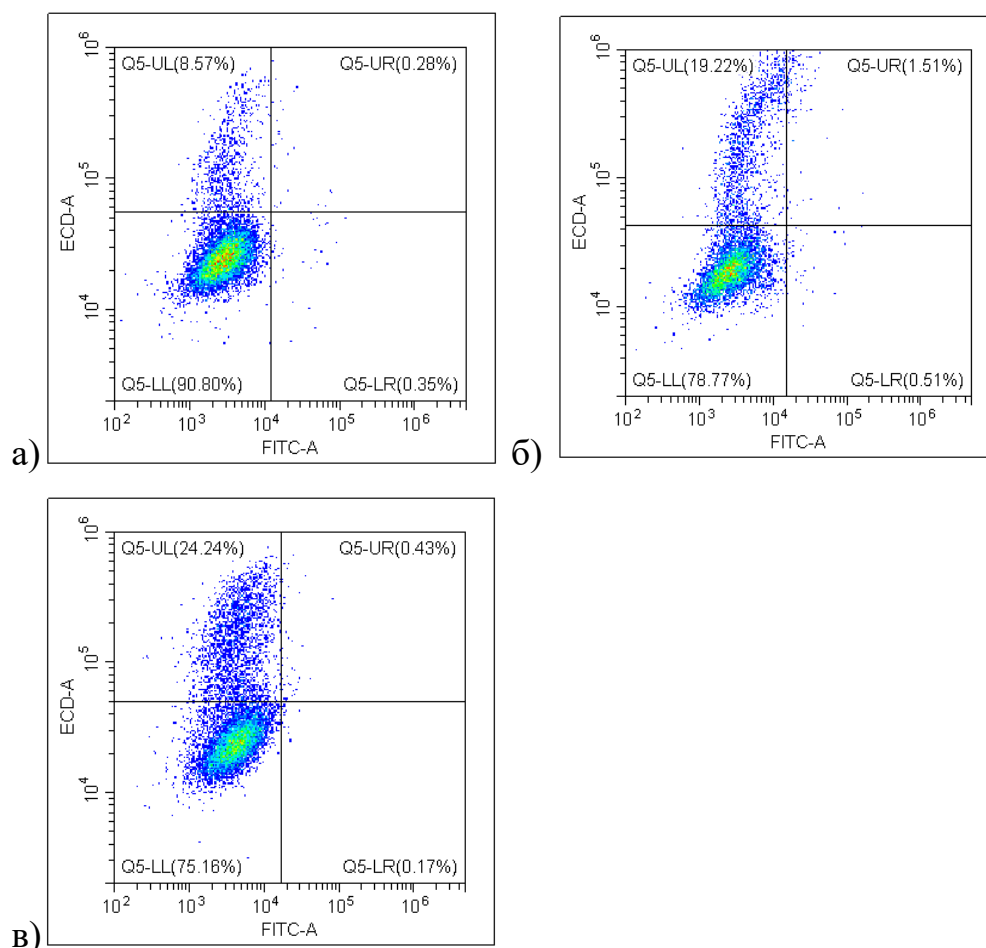


Рисунок 6.1 – Параметри апоптозу модифікованих кератиноцитів HaCaT/P після експозиції їх з ОНМ та ПП. Репрезентативні гістограми. А – контроль клітин HaCaT/P; Б – HaCaT/P + ОНМ; В – HaCaT/P + ПП.

Сьогодні вже відомо, що окисно-відновний баланс / дисбаланс є надзвичайно важливим фактором у розвитку та прогресуванні псоріазу. В результаті окисно-відновних реакцій в організмі постійно утворюються активні форми кисню (АФК), які відіграють важливу роль у багатьох фізіологічних і біохімічних процесах [61, 88]. За звичайних умов концентрація АФК у тканинах низька, а продукція їх збільшується внаслідок різних впливів, зокрема: під дією гіпер- та гіпоксії, іонізуючого випромінювання, токсичних речовин, запальних процесів тощо. Нами було виявлено значне підвищення рівня продукції АФК в клітинах з псоріазоподібними характеристиками (HaCaT/P) під впливом досліджуваного продукту – ОНМ (рис. 6.2, таблиця 6.2).

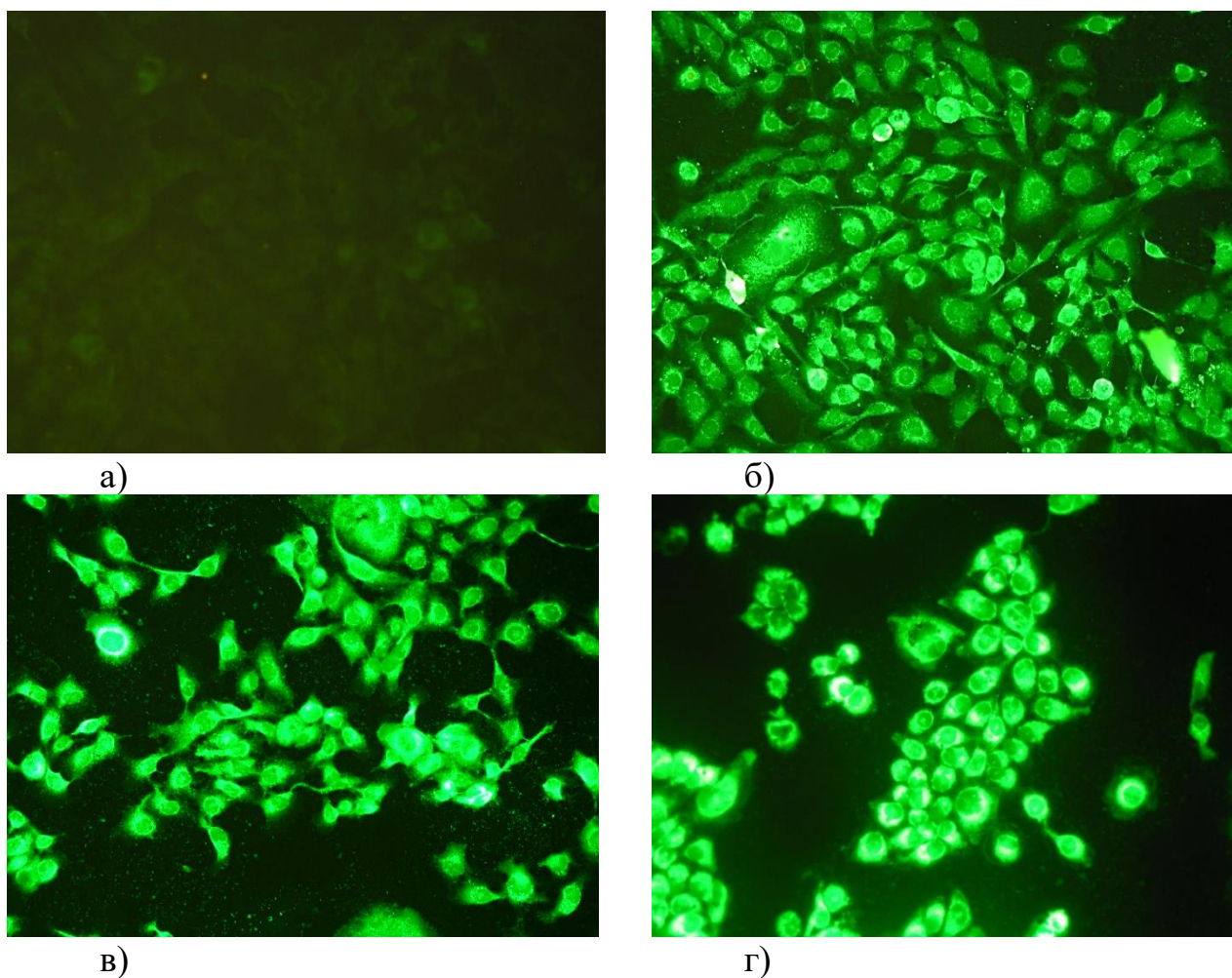


Рисунок 6.2 – Продукція АФК клітинами HaCaT/R після експозиції їх з ОНМ та ПП. А – клітини без забарвлення; Б – контроль клітин (DCFH фарбування); В – HaCaT/R + ОНМ, 0,5 % (DCFH фарбування); Г - HaCaT/R + ПП (Гідрокортизоновий крем 0,05 %) (DCFH фарбування). Збільшення x200

Таблиця 6.2 – Результати напівкількісного аналізу продукції АФК в кератиноцитах HaCaT/R після їх культивування з ОНМ та ПП

Експериментальна група	Рівень продукції АФК, бали
HaCaT/R негативний контроль, нефарбовані клітини	0,0
HaCaT/R контроль, зафарбовані клітини	10,0
HaCaT/R + ОНМ, 0,5 %	35,0
HaCaT/R + ПП (Гідрокортизоновий крем, 0,05 %)	100,0

6.2 Оцінка продукції прозапальних цитокінів IL-8 та IL-1 β модифікованими кератиноцитами HaCaT/P після їх експозиції з ОНМ

Важливою складовою патогенезу псоріазу є регуляція прозапальних цитокінів, а саме IL-8 і IL-1 β , які відіграють ключову роль. Оцінювання впливу ОНМ на ці цитокіни у клітинах HaCaT/P є критичним для розуміння протизапальної / прозапальної дії досліджуваної субстанції. Для порівняльної оцінки впливу досліджуваних препаратів на продукцію прозапальних цитокінів кератиноцитами модифікованої сублінії HaCaT/P досліджували в середовищі культури клітин після експозиції їх з досліджуваних зразків (табл. 6.3, 6.4).

Таблиця 6.3 – Зміни продукції IL-8 кератиноцитами HaCaT/P після експозиції їх з ОНМ або ПП

Група	Продукція IL-8, пг/мл	Зміни продукції IL-8
HaCaT/P контроль клітин	298,3 $\pm$ 18,1	-
HaCaT/P + ОНМ, 0,5 %	103,4 $\pm$ 2,5*	↓ на 65,3 %
HaCaT/P + Гідрокортизоновий крем, 0,05 %	182,4 $\pm$ 5,2*	↓ на 38,9 %

Примітка: * - зміни показників статистично достовірні відносно контрольної групи, $p \leq 0,05$.

Таблиця 6.4 – Продукція IL-1 β кератиноцитами HaCaT/P після експозиції їх з ОНМ або ПП

Група	Продукція IL-1 β , пг/мл	Зміни продукції IL-1 β
HaCaT/P контроль клітин	67,88 $\pm$ 0,18	-
HaCaT/P + ОНМ, 0,5 %	63,23 $\pm$ 5,9	-
HaCaT/P + Гідрокортизоновий крем, 0,05 %	37,15 $\pm$ 0,21*	↓ на 45,3 %

Примітка: * - зміни показників статистично достовірні відносно контрольної групи, $p \leq 0,05$.

При оцінці продукції інтерлейкінів 8 та 1 β виявлено статистично значуще зниження продукції IL-8 клітинами з псоріазоподібними характеристиками – лінією HaCaT/P після дії нового потенційного антипсоріатичного продукту – ОНМ в порівнянні з контрольними клітинами (без впливу). Крім того, спостерігається

суттєве зниження рівня продукції IL-8 в модифікованих клітинах після дії ОНМ відносно ПП. Водночас при оцінці продукції іншого досліджуваного цитокіну – IL-1 β під впливом ОНМ змін не спостерігалось, тоді як ПП статистично значуще знижував рівень IL-1 β в клітинах HaCaT/P (табл. 6.3).

Отже, отримані нами дані про вплив ОНМ на життєздатність кератиноцитів людини, систему проліферація/апоптоз, рівень продукції АФК та прозапальних цитокінів – інтерлейкінів, є актуальними та затребуваними на сьогодні з огляду на детальну характеристику ОНМ його фармакологічних властивостей як потенційного інгредієнту у складі антипсоріатичних лікарських засобів.

Висновки до розділу 6

1. Застосування ОНМ (1,0 %) призвело до зростання відсотка клітин у пізній фазі апоптозу в 2 рази ($p \leq 0,05$) порівняно з контролем, що може вказувати на спрямовану дію цього продукту на патологічні клітини та перспективу його використання для елімінування гіперпроліферативних кератиноцитів.

2. У псоріазоподібних клітинах HaCaT/P зареєстровано суттєве підвищення рівня продукції АФК під впливом ОНМ (напівкількісно – до 35 балів порівняно з 10 балами у контролі). З одного боку, високий рівень АФК може сприяти окисному стресу, проте водночас АФК можуть бути індуктором апоптозу патологічних клітин. Цей результат відкриває можливості для подальших досліджень, оскільки терапевтичні стратегії при псоріазі можуть бути спрямовані як на пригнічення надлишкової продукції АФК, так і на її посилення з метою усунення патологічних клітин.

3. Під дією ОНМ (0,5 %) відбувається статистично значуще зниження ($p \leq 0,05$) продукції IL-8 на 65,3 %, порівняно з контролем ($298,3 \pm 18,1$ пг/мл $\rightarrow$ $103,4 \pm 2,5$ пг/мл). Такий ефект перевищує дію кортикостероїдного препарату порівняння (гідрокортизоновий крем), який зменшує рівень IL-8 на 38,9 %. Водночас рівень IL-1 β залишався незмінним після впливу ОНМ. Натомість гідрокортизону бутират статистично зменшував вміст цього цитокіну майже на 45

%. Отримані дані свідчать про вибірковий вплив ОНМ на прозапальні сигнальні шляхи, а саме, більш виражену здатність пригнічувати ІЛ-8.

4. Пригнічення життєздатності псоріазоподібних клітин, підвищення рівня їх апоптозу та зменшення продукції ІЛ-8, дозволяє розглядати ОНМ як перспективну субстанцію у складі топічних лікарських засобів для лікування псоріазу.

Даний розділ висвітлено в матеріалах наступній публікації:

Зайченко Г.В., Горбач А.О. Експериментальне обґрунтування механізму протизапальної дії очищеного нафталанового масла. «Здобутки клінічної і експериментальної медицини» №1(61)'2025. DOI 10.11603/1811-2471.2025.v.i1.15125

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Псоріаз – хронічне, запальне, системне імуноопосередковане захворювання мультифакторіальної природи, еритематозно-сквамозний дерматоз у розвитку якого домінуюче значення відіграють генетичні фактори. Псоріаз характеризується прискореною проліферацією епідермоцитів і порушенням їх диференціювання, імунними реакціями в дермі та синовіальних оболонках, порушенням кератинізації, дисбалансом між про- і протизапальними цитокінами, хемокінами, а також частими патологічними змінами в різних органах і системах. Це стигматизуюче захворювання, що негативно впливає на самопочуття та якість життя хворої людини [23, 43, 105].

Своєчасне виявлення і адекватна фармакологічна корекція, що включає сучасні лікарські засоби системної і місцевої (топічної) дії, позитивно впливає на розвиток захворювання і запобігає прогресуванню псоріазу. Сучасні клінічні рекомендації і протоколи лікування передбачають в залежності від ступеня тяжкості і форми хвороби застосування кортикостероїдів, переважно місцевої дії (сила рекомендацій А), інгібіторів кальциневрину (сила рекомендацій В), синтетичних аналогів вітаміну D (сила рекомендацій А), синтетичних ретиноїдів (сила рекомендацій В), зволожувальних засобів (сила рекомендацій В), препаратів саліцилової кислоти місцевої дії (сила рекомендацій В), антраліну (сила рекомендацій В). У разі легкого чи середньотяжкого псоріатичного ураження шкіри терапією першого вибору є лікарські засоби місцевої дії, лише за відсутності клінічного ефекту від монотерапії топічними засобами або їх комбінаціями розглядається можливість інших видів лікування (фототерапія, системна терапія, біологічна терапія) [43]. Незважаючи на прогрес у лікуванні псоріазу, залишаються невирішеними низка проблем, пов'язаних із ризиками побічних реакцій (атрофія шкіри, приєднання інфекцій), розвитком толерантності і наявністю синдрому відміни від кортикостероїдів та імунодепресантів, а також обмеженою ефективністю препаратів, що містять синтетичний вітамін D і ретиноїди. Незадовільнені потреби пацієнтів, прагнення лікарів до розширення арсеналу

топічних засобів для лікування псоріазу з покращеними фармакологічними і фармацевтичними властивостями привернули нашу увагу до препаратів природного походження, похідних нафталанової нафти.

Більше сторіччя для лікування псоріазу та інших дерматологічних захворювань використовували неочищену (так звану «чорну») нафталанову нафту, їй притаманні ряд недоліків: потенційні канцерогенні властивості, ризики системної токсичності (гепатотоксичності і нефротоксичності), обмежена терапевтична ефективність, специфічний неприємний запах і темний колір, що забарвлює білизну, перев'язувальні матеріали. Вона виявляє фармацевтичну несумісність із багатьма речовинами, що створює складнощі при розробці лікувальних і косметичних засобів, значно обмежує її використання у фармації та медицині. Присутність ароматичних вуглеводнів, смол і асфальтенів у неочищеній нафталановій нафті викликає питання щодо безпеки пацієнтів при тривалому лікуванні хронічних дерматологічних захворювань.

Очищене нафталанове масло містить поліциклічні нафтеніві вуглеводні, зокрема такі сполуки як гопани, стерани, андростани і холестерани, що були виявлені методом газової хроматографії з мас-спектрометричною детекцією [58], саме вони вважаються активними компонентами нафталану, при цьому вміст поліароматичних сполук у ньому суттєво знижений. Разом з тим ОНМ демонструє ряд переваг перед неочищеним нафталановим маслом, а саме відсутність токсичних фракцій, покращені протизапальні властивості, пов'язані зі стероїдними ефектами концентрованих гопанів і стеранів, має покращені органолептичні властивості [9]. У деяких фракціях ОНМ було виявлено поліциклічні нафтени, схожі за структурою з ядром стероїдних гормонів (циклопентанопергідрофенантрена), що дає підстави для припущення про можливий «гормоноподібний» вплив таких компонентів [7]. Саме нафтеніві вуглеводні, за даними низки досліджень [143], проявляють значно менше токсичних і канцерогенних властивостей, водночас забезпечують фармакологічні ефекти, серед яких протизапальна, ранозагоювальна види дії [166]. Наявність у складі нафталану вітаміну К та естрогеноподібних речовин [37], що посилює

інтерес науковців до вивчення фармакологічних властивостей, механізмів дії ОНМ, для обґрунтування розробки на його основі лікарських засобів нового покоління для лікування дерматологічних захворювань, зокрема псоріазу. Це стало метою нашої дисертаційної роботи.

На першому етапі було проведено скринінгове дослідження тест-зразків кремів із різним вмістом речовин, отриманих з нафти (неочищеного нафталану, вазелінового масла, очищеного нафталанового масла) і допоміжних речовин з метою вивчення їх базових фармакологічних властивостей (аналгетичної та протизапальної видів дії) на моделі карагінан-індукованого запалення у щурів.

За результатами скринінгового дослідження анальгетичної активності виявлено, що тест-зразок крему з 10 % вазеліновим маслом продемонстрував помірну короткотривалу анальгетичну активність, що дорівнювала 19,3 % через 2 години після індукції запалення і дорівнювала дії препарату порівняння 1 % гідрокортизону ацетату, що проявив стабільну анальгетичну активність на рівні 23,4–21,9 % у різні фази запального процесу. Креми, що містили 10 % і 15 % ОНМ не продемонстрували значущого знеболювального ефекту, їм не притаманна знеболювальна дія в жодну із досліджуваних фаз запального процесу, викликаного карагінаном.

Дослідження протизапальної активності виявило, що найвищий показник протизапальної дії продемонстрував тест-зразок з 10 % ОНМ, через 2 години після індукції запалення він досяг 23,0 % (вдвічі вищий, ніж у гідрокортизону) та через 4 години його активність дорівнювала 16,0 % (на рівні препарату порівняння). Тест-зразок з 10 % вазеліновим маслом виявив слабшу протизапальну активність (12,8 %) лише в ранній фазі запалення. Тест-зразкам з 10 % вмістом нафталанської нафти та 15 % вмістом очищеного нафталанового масла була властива слабка протизапальна (проти набрякова, антиексудативна) дія.

За результатами проведених експериментальних скринінгових фармакологічних досліджень протизапальної та анальгетичної активності *in vivo* на моделі карагінанового набряку тест-зразків кремів різного складу виявлено, що тест-зразок крему, що містив в своєму складі 10 % ОНМ, продемонстрував хоча не

високу протизапальну активність (16,0–23,0 %), але вона була найбільшою серед кремів з нафтопродуктами, що досліджувалися. Враховуючи низьку протизапальну дію, відсутність аналгетичної активності в ОНМ, його не доцільно використовувати як активний фармацевтичний інгредієнт, а як допоміжну речовину для розробки дерматологічних лікарських форм, при цьому оптимальним вважається його 10 % вміст. Але для цього потрібно комбінувати ОНМ з речовинами, що виявляють доведені фармакологічні властивості (протизапальні, аналгетичні, протисвербіжні, кератолітичні тощо). Враховуючи його здатність посилювати провідність АФІ до глибоких шарів шкіри, таке поєднання може бути експериментальним обґрунтуванням розробки м'яких лікарських форм комбінованого складу з ОНМ для лікування дерматологічних захворювань різного генезу.

Наступний етап за програмою дослідження включав поглиблене вивчення фармакологічних властивостей монокомпонентного 10 % крему з ОНМ, крему з 10 % ОНМ у комбінації з 2 % інгібітором ФДЕ4 – дротаверином. Для порівняння були розроблені і досліджені в аналогічних умовах експерименту тест-зразки крему комбінованого складу з 10 % вазеліновим маслом (класичною для м'яких лікарських форм допоміжною речовиною, що також виробляється з нафти, не нафталанської, відрізняється за складом від ОНМ) і 2 % дротаверином, а також крем з 1 % гідрокортизону бутиратом (наявний у протоколах лікування псоріазу).

Як відомо, пригнічення ФДЕ4, ферменту, що експресується дендритними клітинами, Т-лімфоцитами, макрофагами і моноцитами, приводить до накопичення внутрішньоклітинного цАМФ. Збільшення вмісту цАМФ в клітинах шкіри, супроводжується пригніченням синтезу багатьох прозапальних цитокінів, в тому числі $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-12 , IL-17 , IL-22 , IL-23 та хемокінів (CXCL9, CXCL10, CCL4), що задіяні в патогенезі псоріазу [38, 39, 40]. Одночасно з блокуванням ФДЕ4 підвищується вироблення протизапальних медіаторів, включаючи IL-10, що забезпечує зменшення клітинної інфільтрації в шкірі. Таким чином, відбувається гальмування розвитку запального каскаду на початковому етапі та регуляція продукції ключових цитокінів як медіаторів запальної відповіді. Тільки два

лікарських засоби з групи інгібіторів ФДЕ4 (апреміласт – системної дії і рофлуміласт – місцевої дії) схвалені регуляторними органами США, Євросоюзу і України для лікування псоріазу, натепер вони є доволі високовартісними препаратами. Нами вперше запропоновано вивчення дротаверину, який відомий як міотропний спазмолітик і до цього часу призначається у вигляді лікарських засобів системної дії (таблеток, розчину для ін'єкцій) для усунення спастичного болю, а як протизапальний активний фармацевтичний інгредієнт у складі крему для місцевої дії ще не досліджувався.

Вивчення антипсоріатичної дії кремів з ОНМ проводилося на моделі експериментального псоріазоподібного ураження шкіри, індукованого іміквімодом у мишей лінії BALB/c, за умов 21-ї денного курсу лікування. Для оцінки ефективності використано модифікований індекс PASI (mPASI), що включав оцінку 3-х показників: гіперемія (еритема), ущільнення (потовщення, інфільтрація), лущення (поява лусочок) на ураженій ділянці шкіри спини кожної тварини. Оцінка кожного показника здійснювалася за шкалою від 0 до 4 балів.

Крем з 10 % ОНМ у комбінації з 2 % дротаверином виявив найбільш виражену антипсоріатичну дію, в нього на відміну від інших тест-зразків кремів та препарату порівняння, спостерігалася стабільна тенденція до зниження індексу mPASI. На 21-у добу лікування цей тест-зразок перевищував за ефективністю дію препарату порівняння гідрокортизону бутирату для якого індекс mPASI на цей самий період спостереження становив 1,5 (0,0; 3,0) бали, а у крему з ОНМ і дротаверином він дорівнював 1,0 (0,0; 1,0) балу, що є найкращим показником серед усіх досліджуваних тест-зразків.

Всі тест-зразки кремів, включаючи препарат порівняння гідрокортизону бутират, за винятком крему з 10 % ОНМ, проявили аллогенну дію на 14-у добу від початку лікування. Тест-зразок крему з 10 % ОНМ не впливав на больову чутливість мишей з псоріазоподібним ураженням шкіри протягом усього періоду спостереження. Больова чутливість у лікованих мишей за застосування усіх дослідних ТЗ через 21 добу від початку лікування, фактично, не змінювалася, про що свідчить показник ПБЧ, коливання якого не мало закономірного характеру та

суттєвого значення порівняно до значень як у нелікованих тварин, так і у мишей, яких лікували ПП.

Виявлено більш значне підвищення порога больової чутливості у тварин із псоріазоподібним ушкодженням шкіри порівняно з інтактними мишами може пояснюватися комплексом взаємопов'язаних нейрофізіологічних, імунних та поведінкових механізмів. По-перше, хронічне запалення, яке супроводжує псоріазоподібний процес, здатне змінювати функціонування периферичних та центральних відділів аналізатора болю. З одного боку, активовані імунні клітини (Т-лімфоцити, макрофаги тощо) та кератиноцити можуть продукувати широкий спектр прозапальних цитокінів (наприклад, IL-1 β , IL-6, TNF- α), які беруть участь у формуванні сенситизації больових рецепторів. З іншого боку, індукція протизапальних механізмів (наприклад, підвищена продукція IL-10, TGF- β) може призводити до стимуляції ендогенних систем гальмування болю та посиленого синтезу ендогенних опіоїдів, що, ймовірно, сприяє підвищенню порога больової чутливості.

По-друге, центральні механізми регуляції болю можуть зазнавати суттєвих змін унаслідок тривалого подразнення, зумовленого псоріазоподібним ушкодженням шкіри. Існують дані про те, що при хронічних запальних процесах може відбуватися адаптаційне «налаштування» супраспінальних структур (зокрема, таламуса та ряду ядер стовбура мозку), що призводить до посиленого залучення антиноцицептивних трактів, таких як ретикулярна формація та періакведуктальна сіра речовина. Це може виявлятися підвищеною активацією низхідних гальмівних впливів на спинальні нейрони, які передають больові сигнали.

По-третє, поведінкові фактори мають істотне значення у формуванні кінцевого ефекту. Тварини можуть демонструвати специфічні реакції звикання до процедури та до дослідника, що, зокрема, знижує рівень стресу і тривожності. Відомо, що стрес та тривога можуть посилювати больову чутливість, тож зменшення їхнього впливу може сприяти підвищенню ПБЧ. За умови псоріазоподібного ураження шкіри, на додаток до цих механізмів, ймовірно,

долучаються також психоемоційні кореляти хронічного запального стану, які потребують подальшого з'ясування.

Насамкінець, не можна виключати особливості генотипу мишей лінії BALB/c, що можуть детермінувати як підвищену схильність до адаптації, так і специфічні імунорегуляторні відповіді. Отже, більш інтенсивне підвищення порога больової чутливості у мишей з псоріазоподібним ураженням шкіри слід розглядати як результат складної взаємодії між запальними, нейрогуморальними та поведінковими процесами, які у сукупності впливають на діяльність як периферичного, так і центрального відділів аналізатора болю. Для остаточного з'ясування вкладу кожного із зазначених механізмів доцільне проведення подальших експериментальних досліджень із використанням біохімічних, імуногістохімічних та електрофізіологічних методів, що дозволить встановити точні причинно-наслідкові зв'язки в регуляції больової чутливості за умов псоріазоподібних уражень шкіри.

У лабораторних тварин із індукованим псоріазоподібним ураженням шкіри на фоні посиленого карагінаном гострого запалення тест-зразок крему з 10 % ОНМ знижував больову чутливість (поріг больової чутливості зростав) та виявляв більш високу протизапальну активність порівняно з іншими тест-зразками кремів і препаратом порівняння гідрокортизоном. При дослідженні протизапальної дії монокомпонентний крем з 10 % ОНМ виявляв низьку протизапальну активність – 19,0 %. Через 4 години після введення карагінану протинабрякова активність тест-зразка комбінованого крему з 10 % ОНМ в комбінації з 2 % дротаверином дорівнювала 29,0 %, що була зіставна з препаратом порівняння, ефективність якого становила 32,0 %. Комбінація ОНМ з дротаверином виявляє синергістичну протизапальну дію. Отже, дані результати свідчать про доцільність використання очищеного нафталанового масла, як допоміжної речовини в комбінації з іншими активними фармацевтичними інгредієнтами, що виявляють протизапальну дію.

Результати гістологічного та морфометричного аналізу шкіри тварин свідчать, що при топічному застосуванні тест-зразків кремів з ОНМ на моделі імківмодового псоріазоподібного ураження шкіри мишей відновлюється

нормальна стратифікована будова епідермісу, зменшується запалення (усуваються набряки та лімфомакрофагальні інфільтрати), нормалізується судинний тонус та структури колагенових волокон у дермі. Більш висока репаративна активність відмічалася при використанні тест-зразка крему з 10 % очищеним нафталановим маслом у комбінації з 2 % дротаверином. На 21-у добу лікування в більшості уражених ділянок шкіри відбувалося відновлення шарів епідермісу, зменшення запальних вогнищ у дермі, покращення мікроциркуляції та часткове відновлення придатків шкіри (навіть стимулювався ріст волосяного покриву). Це суттєво відрізняло фармакологічний вплив ОНМ з дротаверином від дії кортикостероїдних лікарських засобів місцевої дії. Гістологічні зміни на 21 добу лікування псоріазоподібного ураження шкіри у мишей при застосуванні гідрокортизону бутирату супроводжувалися появою характерних для цієї групи проявів дерматотоксичності, зокрема розвитком атрофічних змін епідермісу, гіпотрофії, а іноді атрофії волосяних фолікулів і голокринових залоз. Спостерігали вогнищевий набряк дерми в ділянках прилеглих до епідермісу; крововиливи під епідермісом і діapedез еритроцитів в базальний шар епідермісу, відшарування рогового шару від зернистого шару епідермісу, посилення лімфомакрофагальної інфільтрації дерми, гіперплазії та гіпертрофії фібробластів з формуванням вогнищового склерозу дерми.

Отже, на відміну від стероїдних атрофічних змін, крем з ОНМ виявляв регенераторний вплив і відновлення стану всіх шарів шкіри.

Від рівня тканинних змін було цікаво простежити вплив препаратів з ОНМ на прояви клітинних і внутрішньоклітинних (молекулярних) процесів в кератиноцитах людини, що наближало нас до розуміння механізмів фармакологічної дії і прогнозування профілю безпеки нової генерації лікарських засобів з нафталанської нафти.

Було проведено порівняльне дослідження життєздатності та метаболічної (дихальної) активності вихідних (контрольних) клітин НаСаТ (іморталізованих кератиноцитів) і модифікованих шляхом тривалого впливу цитокінів клітин для експериментального моделювання псоріазоподібних змін – клітин лінії НаСаТ/Р.

Показано, що модифіковані HaCaT/P клітини характеризуються статистично значущим зниженням IC_{50} до ОНМ порівняно з контрольними клітинами, що свідчить про суттєве підвищення їх чутливості (у 8,8 разів при фарбуванні кристалічним фіолетовим і в 5 разів відповідно до результатів МТТ тесту) до нового потенційного антипсоріатичного препарату з ОНМ.

Для деталізації механізму дії ОНМ на кератиноцити з псоріазоподібним фенотипом нами було оцінено параметри апоптозу в клітинах після впливу досліджуваної речовини. Показано, що відсоток клітин у пізній фазі апоптозу статистично значуще зростає після експозиції клітин з ОНМ ($p \leq 0,05$): у 2 рази відносно контрольних клітин. Слід додати, що отримані нами дані про суттєву різницю в індексі цитотоксичності для клітин – «умовно нормальних» кератиноцитів (вихідної лінії HaCaT) та цитокін-модифікованих – «патологічних», що імітують псоріазоподібні зміни, є надзвичайно цікавими і потребують подальших досліджень. Ці результати можуть свідчити про те, що ОНМ при своїй високій ефективності матиме потенційно безпечний профіль за рахунок суттєвої різниці в межах впливу на «патологічні» та «умовно нормальні клітини»: під впливом дози, що діє на «патологічні» клітини, умовно нормальні клітини зберігають 100 % своєї життєздатності.

Показано, що під дією досліджуваного продукту – ОНМ виявлено значне підвищення рівня продукції АФК клітинами HaCaT/P, що також є надзвичайно цікаво, оскільки на сьогодні існують протилежні підходи до використання рівня АФК при псоріатичній патології в стратегії лікування хворих. Відомо, що при прогресуванні псоріазу відбувається аномальна продукція АФК та їх накопичення в уражених ділянках шкіри. Одним із індукторів АФК при псоріазі є фактор некрозу пухлини альфа (ФНП, $TNF-\alpha$), який спонукає як кератиноцити, так і фібробласти до продукції АФК [14, 27, 158]. Таке аномальне вивільнення та накопичення АФК клітинами призводить до стану окисно-відновного дисбалансу та окисидативного стресу в тканині / організмі [63]. Накопичення АФК підвищує рівень іонів кальцію в цитозолі, а надмірна концентрація кальцію, на думку авторів, призводить до загибелі клітин [63, 94]. Відповідно до результатів багатьох факторів, які описують

окисно-відновний профіль клітин при псоріазі, вважається, що регуляція стану окислювального стресу в організмі може зменшити симптоми псоріазу [101], але при цьому слід пам'ятати, що при прогресуванні псоріазу під дією окисної та антиоксидантної систем в організмі рівень АФК не завжди може перебувати в стані окисного стресу, оскільки цей процес динамічний. Наразі моніторинг та регуляція продукції АФК є особливо важливими, оскільки існують 2 терапевтичні шляхи / стратегії, пов'язані з окисно-відновним потенціалом, окислювальним стресом і, відповідно, рівнями АФК при псоріазі. А саме: зниження АФК в клітинах для нормалізації стану та зменшення патологічних проявів у клітинах, або навпаки – підвищення АФК для знищення патологічних клітин із надлишковою продукцією АФК, що, відповідно, також призводить до зменшення патологічних проявів. Водночас слід додати, що за даними авторів [4, 63, 170], при псоріазі апоптоз, опосередкований АФК, призводить до нормалізації епідермісу, внаслідок чого покращується клінічна картина у пацієнта.

Одну із ключових ролей у перебігу патологічного процесу при псоріазі відіграють цитокіни, а антиінтерлейкінова терапія є, відповідно, одним із варіантів лікування пацієнтів із псоріазом середнього та тяжкого ступеня [150]. Ми в своїй роботі досліджували продукцію двох прозапальних цитокінів – IL-8 та IL-1 β після дії тестового продукту ОНМ та ПП. Відомо, що IL-8 індукує надмірний ріст кератиноцитів при псоріазі, а його надмірна експресія в шкірі пов'язана з накопиченням великої кількості нейтрофілів, що в свою чергу сприяє розвитку запального процесу [82, 150]. Сигнальний шлях IL-1 також відіграє важливу роль у патогенезі хронічних аутозапальних захворювань шкіри зокрема і при псоріазі, однак точні клітинні та молекулярні механізми до кінця ще не вивчені [24]. У нашій роботі було показано, що при дії ОНМ не змінюється продукція IL-1 β , тоді як продукція IL-8 клітинами з псоріазоподібними характеристиками HaCaT/P після дії ОНМ статистично значуще знижується в порівнянні з контрольними клітинами (без впливу). Очищене нафталанове масло знижує експресію IL-8 (важливого учасника хемотаксису клітин при псоріатичному запаленні), що може гальмувати поширення патологічного процесу, сприяє контролю проліферації кератиноцитів

та уповільнює розвиток запальних реакцій у шкірі. Це нові ланки в механізмі дії, що вперше виявлені в ОНМ.

Цікаво, що препарат порівняння 0,05 % гідрокортизон знизив рівень ІЛ-8 лише на 38,9 %, що повною мірою узгоджується з існуючими уявленнями про механізм імуносупресивної і протизапальної дії кортикостероїдів, однак менша вираженість ефекту, порівняно з ОНМ, може вказувати на більш вибірккову дію комплексу речовин нафталанового походження саме стосовно ІЛ-8.

Отже, за впливом на продукцію ІЛ-1 β ОНМ виявилося неактивним, тоді як стероїдний препарат порівняння істотно пригнічував цей цитокін, що відображає відмінні механізми дії цих речовин. З погляду на сучасний патогенез псоріазу [11, 18, 21, 24], ІЛ-1 β важливий на ранніх етапах запуску запалення, він стимулює низку сигналів, що підтримують проліферацію кератиноцитів і міграцію імунних клітин (рис. 7.1). Натомість ІЛ-8 критично залучений до формування клітинної інфільтрації (переважно нейтрофільної), характерної для псоріатичних бляшок. Можна зробити висновок, що ОНМ може бути ефективним у зменшенні переважно нейтрофільного компонента запалення, а гідрокортизон виявляє більш широкий спектр впливу на різні прозапальні цитокіни, включно з ІЛ-1 β .

Узагальнений механізм можливої синергістичної дії ОНМ та інгібітора ФДЕ4 – дротаверина – наведено на рис. 7.1.

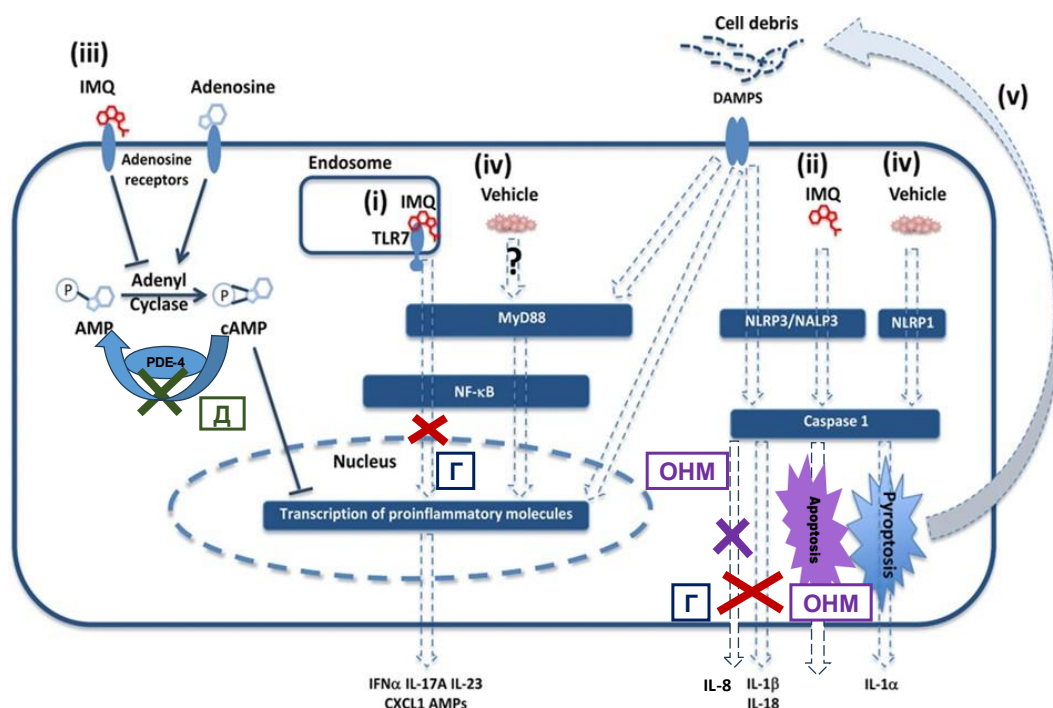


Рисунок 7.1 – Можливий механізм протизапальної дії очищеного нафталанового масла (ОНМ) у комбінації з дротаверином (Д) порівняно з гідрокортизоном (Г) на моделі іміквімод-індукованого псоріатичного ураження шкіри у мишей. Іміквімод (IMQ) активує імунне запалення [66] різними шляхами, включаючи: (i) активацію toll-подібних рецепторів TLR7-залежного шляху MyD88 (цитоплазматичний адаптерний білок) в імунних клітинах; (ii) активації інфламасоми NALP3; (iii) порушення передачі сигналів аденозинового рецептора, що призводить до зниження рівня протизапального циклічного АМФ (цАМФ); (iv) прямої активації шляху запалення через невідомі рецептори переносника лікарських засобів; (v) загибелі клітин шляхом активації каспази-1, наступного піроптозу, апоптозу та вивільнення IL-1 β , IL-18. Гідрокортизон виявляє протизапальну дію через інгібування ядерного нуклеофільного фактору NF- κ B і продукцію цитокінів (IL-17, IL-23, IL-1 β , IL-8 та ін.), тоді як ОНМ регулює апоптоз, інгібує синтез IL-8, проте більш потужно, ніж гідрокортизон. Дротаверин (Д), блокуючи ФДЕ-4 (PDE-4), призводить до накопичення внутрішньоклітинного цАМФ. Збільшення вмісту цАМФ в клітинах супроводжується пригніченням синтезу багатьох прозапальних цитокінів, в тому числі TNF- α , IL – 12, 17, 22, 23 та хемокинів (CXCL9, CXCL10, CCL4), що задіяні в патогенезі псоріазу [52, 108].

Оцінка рівня апоптозу продемонструвала достовірне збільшення частки клітин у пізній фазі апоптозу після впливу ОНМ ($p \leq 0,05$), що може свідчити про його потенційну цитостатичну активність. Це може мати важливе значення для розуміння впливу ОНМ на процеси надмірної десквамації, лущення, врівноваження надмірної проліферації через посилення апоптозу. Це особливо важливо при псоріазі, де змінені патологічним процесом кератиноцити характеризуються підвищеною проліферацією і здатністю «уникати» природних механізмів загибелі. Сприяння програмованій загибелі аномальних клітин розглядається як один із перспективних підходів у терапії псоріазу, вперше виявлено для ОНМ, як сполуки, отриманої з нафти.

Дослідження рівня продукції АФК показало значне підвищення їх рівня після дії ОНМ у модифікованих кератиноцитах, проте цей ефект був значно менш вираженим, ніж у групі порівняння з гідрокортизоновим кремом, що може вказувати на більш слабкий, ніж у стероїдів, вплив ОНМ на окисно-відновний баланс клітин.

Виявлено, що ОНМ порівняно з 1 % гідрокортизоновим кремом у більшій мірі інгібує ріст псоріазомодифікованих клітин (HaCaT/P), водночас зберігає відносно високу життєздатність умовно нормальних кератиноцитів (HaCaT). Це свідчить про певну вибірковість дії ОНМ, а також нижчу ймовірність виникнення побічних ефектів з боку здорових клітин при місцевому застосуванні.

Підсумовуючі результати проведених досліджень, можна розширити існуючі уявлення і сформулювати нові погляди на молекулярні ланки реалізації механізму дії ОНМ, зокрема його вплив на ключові показники проліферації клітин і апоптоз, рівень продукції активних форм кисню (АФК) та синтез прозапальних цитокінів (IL-8), що мають важливе значення у патогенезі псоріазу.

Препарат порівняння 1 % гідрокортизоновий крем, хоча і мав певні переваги у зниженні IL-1 β , все ж асоціювався з більш вираженими побічними впливами на нормальні клітини. Очищене нафталанове масло у свою чергу продемонструвало кращий профіль безпеки, що є вагомим аргументом на користь розробки інноваційних лікарських форм із використанням похідних нафталану.

Отже, результати експериментальних досліджень фармакології безпеки підтверджують наявність в ОНМ вибіркової дії щодо патологічних псоріазомодифікованих клітин, що лежить в основі його потенційних переваг перед традиційними гормональними кортикостероїдними мазями та кремами, особливо при тривалій терапії псоріазу.

ВИСНОВКИ

1. За результатами скринінгового дослідження виявлено, що крем з 10 % очищеним нафталановим маслом (ОНМ) на гідрофільній основі продемонстрував найвищу протизапальну активність серед усіх досліджуваних тест-зразків кремів з природними речовинами, отриманими з нафти (нафталанової нафти, очищеного нафталанового масла, вазелінового масла). У фазі раннього запалення (через 2 години) активність досягла 23,0 %, що вдвічі перевищує активність препарату порівняння (ПП) гідрокортизону (10,9 %). Через 4 години активність знизилася до 16%, що відповідає дії ПП (18,1 %).

2. На етапі поглибленого вивчення ефективності тест-зразків кремів на моделі псоріазоподібного ураження шкіри мишей найвищу активність продемонстрував тест-зразок крему з 10 % ОНМ у комбінації з 2 % дротаверином, зниження індексу mPASI становило 1,0 бал на 21 добу лікування, перевищивши за ефективністю дію гідрокортизону бутирату, для якого цей показник становив 1,5 бали. На другій моделі посиленого карагінаном псоріазоподібного ураження шкіри мишей крем з 10 % очищеним нафталановим маслом в комбінації з 2 % дротаверином антипсоріатична активність становила 29,0 %, що була зіставна з препаратом порівняння (32,0 %). Тест-зразок крему з монокомпонентним 10 % очищеним нафталановим маслом виявляв низьку протизапальну активність на двох моделях, що обумовлює доцільність його застосування як допоміжної речовини у складі антипсоріатичних засобів місцевої дії. Комбінація 10 % очищеного нафталанового масла з інгібітором ФДЕ4 – 2 % дротаверином значно підвищує ефективність крему, забезпечуючи виражену протизапальну і антипсоріатичну дію, що свідчить про його здатність до синергізму.

3. Результати гістологічного та морфометричного аналізу шкіри тварин свідчать, що при застосуванні тест-зразків кремів на основі очищеного нафталанового масла відновлюється нормальна стратифікована будова епідермісу, зменшується запалення (усуваються набряки та лімфомакрофагальні інфільтрати), нормалізується судинний тонус та структури колагенових волокон у дермі. Висока

репаративна активність відмічалася при використанні тест-зразка крему з 10 % очищеним нафталановим маслом у комбінації з 2 % дротаверином. На 21-у добу лікування в більшості уражених ділянок шкіри відбувалося відновлення шарів епідермісу, зменшення запальних вогнищ у дермі, покращення мікроциркуляції та часткове відновлення придатків шкіри (стимулювався ріст волосяного покриву).

4. За ефективністю антипсоріатичної дії тест-зразок крему комбінованого складу з 10 % очищеним нафталаном маслом і 2 % дротаверином на моделі імквімодового ураження шкіри і на моделі посиленого карагінаном псоріазоподібного ураження шкіри за 21-денного курсу лікування не поступався дії препарату порівняння гідрокортизону бутирату, а відсутність негативних морфологічних змін шкіри, що виникали під впливом кортикостероїдного препарату свідчать про більш сприятливий профіль безпеки і надають йому додаткових переваг при тривалому застосуванні.

5. Результати токсикологічних досліджень *in vivo* демонструють безпеку застосування крему з 10 % ОНМ, що відноситься до практично нетоксичних речовин за умов однократного і тривалого 21-денного нашкірного нанесення, не виявляє місцевоподразнювальної дії у тварин. У дослідях *in vitro* на ізольованих псоріазомодифікованих клітинах лінії HaCaT/P, виявлена підвищена їх чутливість до дії ОНМ (у 8,8 рази) за показником життєздатності кератиноцитів (IC_{50}) порівняно з немодифікованими (нормальними) клітинами HaCaT, тоді як препарат порівняння – гідрокортизону бутират – знижує життєдіяльність псоріазозмінених кератиноцитів HaCaT/P у 6,8 рази. Це може свідчити про високу селективність дії очищеного нафталанового масла саме до клітин, що мають псоріазоподібні характеристики.

6. Очищене нафталанове масло знижує продукцію прозапального цитокіну IL-8 на 65,3 % у модифікованих кератиноцитах HaCaT/P, що підтверджує наявність у нього певного протизапального потенціалу, тоді як гідрокортизону бутират забезпечує менш виражене зниження (на 38,9 %). Очищене нафталанове масло значно посилює утворення активних форм кисню у модифікованих кератиноцитах HaCaT/P, що може бути одним з опосередкованих механізмів його

антипсоріатичної дії на патологічно змінені клітини (активація проапоптичних процесів у псоріазомодифікованих кератиноцитах).

7. Враховуючи виявлений протизапальний потенціал, що реалізується різними механізмами (контроль гострого запалення через зниження рівня медіаторів ранньої фази – гістаміну, і хронічного запалення через зниження рівня прозапального цитокіну IL-8; стимуляція апоптозу – програмованої загибелі аномальних псоріатичних клітин), доцільно використовувати очищене нафталанове масло як допоміжну речовину з покращеними фармакологічними і фармацевтичними властивостями у складі комбінованих дерматологічних лікарських засобів, при цьому оптимальним вважається його 10 % вміст. Воно може посилювати фармакологічну активність інших активних фармацевтичних інгредієнтів, зокрема інгібіторів фосфодіестерази-4 типу, за рахунок модифікації сигнальних шляхів псоріатичного запалення шкіри.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Abbasov VM, Isayeva GA, Aliyev FS, Nabiyeve ND, Movsumova PA, Ismayilova GE. Analysis of scientific results on the study of therapeutic Naftalan oil. *PPOR*. 2024;25(4):953-984. doi: 10.62972/1726-4685.2024.4.953.
2. Adigozalova VA. Naftalan oil is a specific balneological factor of Azerbaijan. *Azerbaijan J Physiol*. 2023;38(1):48–56. doi: 10.59883/ajp.52.
3. Ahluwalia A. Topical glucocorticoids and the skin—mechanisms of action: an update. *Mediators Inflamm*. 1998;7(3):183-193. doi: 10.1080/09629359891126.
4. Ahmad Jamil H, Abdul Karim N. Unraveling Mitochondrial Reactive Oxygen Species Involvement in Psoriasis: The Promise of Antioxidant Therapies. *Antioxidants (Basel)*. 2024 Oct 11;13(10):1222. doi: 10.3390/antiox13101222.
5. Ahmed SS, Manchanda Y, De A, Das S, Kumar R. Topical Therapy in Psoriasis. *Indian J Dermatol*. 2023 Jul-Aug;68(4):437-445. doi: 10.4103/ijd.ijd_422_23.
6. Alajbeg I, Brkić D, Ahel M, Telen S, Džanić E, Fingler S, Alajbeg A. Chemical Composition and Physical Properties of «Pale Yellow» Naphtalan. *Croat Chem Acta*. 2011;84(4):521-530. doi: 10.5562/cca1886.
7. Alajbeg I, Dinter G, Alajbeg A, Telen S, Prostenik M. Study of Croatian non-aromatic naphthalene constituents with skeletons analogous to bioactive compounds. *J Chromatogr A*. 2001 May 18;918(1):127-134. doi: 10.1016/s0021-9673(01)00720-8.
8. Alajbeg I, Ivanković S, Jurin M, Alajbeg ŽI, Rošin-Grget K, Cekić-Arambašin A. Non-aromatic naphthalene as a potential healing medium. *Period Biol*. 2001;103(1):89.
9. Alajbeg I, Krnjević-Pezić G, Smeh-Skrbin A, Vrzogić P, Vucićeović-Boras V, Dobrić I, Cekić-Arambasin A. Non-aromatic naphthalene preparation; preliminary clinical study in the treatment of psoriasis vulgaris. *J Pharm Biomed Anal*. 2001 Dec;26(5-6):801-9. doi: 10.1016/s0731-7085(01)00458-7.
10. Almudaris SA, Gatea FK. Effects of topical ivermectin on imiquimod-induced psoriasis in mouse model – novel findings. *Pharmacia*. 2024;71:1-14. doi: 10.3897/pharmacia.71.e114753.

11. Alwan W, Nestle FO. Pathogenesis and treatment of psoriasis: exploiting pathophysiological pathways for precision medicine. *Clin Exp Rheumatol*. 2015 Sep-Oct;33(5 Suppl 93):S2-6.
12. Armstrong AW, Mehta MD, Schupp CW, Gondo GC, Bell SJ, Griffiths CEM. Psoriasis Prevalence in Adults in the United States. *JAMA Dermatol*. 2021 Aug 1;157(8):940-946. doi: 10.1001/jamadermatol.2021.2007.
13. Armstrong AW, Read C. Pathophysiology, Clinical Presentation, and Treatment of Psoriasis: A Review. *JAMA*. 2020 May 19;323(19):1945-1960. doi: 10.1001/jama.2020.4006.
14. Baek JO, Byamba D, Wu WH, Kim TG, Lee MG. Assessment of an imiquimod-induced psoriatic mouse model in relation to oxidative stress. *Arch Dermatol Res*. 2012 Nov;304(9):699-706. doi: 10.1007/s00403-012-1272-y.
15. Bagrii MM, Dibrova VA, et al.; Edited by Bagrii MM, Dibrova VA. *Metodyky Morfolohichnykh Doslidzhen: Monohrafiia* [Morphological Research Methods: A Monograph]. Vinnytsia: Nova Knyha; 2016. 328 p. [in Ukrainian]
16. Bannon A. W. Models of nociception: Hot-plate, tail-flick, and formalin tests in rodents / A. W. Bannon, A. B. Malmberg // *Curr. Protoc. Neurosci.* – 2007. – Chapter 8, Unit 8.9. doi: 10.1002/0471142301.ns0809s41.
17. Bell KA, Balogh EA, Feldman SR. An update on the impact of depression on the treatment of psoriasis. *Expert Opin Pharmacother*. 2021 Apr;22(6):695-703. doi: 10.1080/14656566.2020.1849141.
18. Blauvelt A, Chiricozzi A. The Immunologic Role of IL-17 in Psoriasis and Psoriatic Arthritis Pathogenesis. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2018 Dec;55(3):379-390. doi: 10.1007/s12016-018-8702-3.
19. Bocheńska K, Smolińska E, Moskot M, Jakóbkiewicz-Banecka J, Gabig-Cimińska M. Models in the Research Process of Psoriasis. *Int J Mol Sci*. 2017 Nov 24;18(12):2514. doi: 10.3390/ijms18122514.
20. Boffa MJ, Chalmers RJG. Methotrexate for psoriasis. *Clin Exp Dermatol*. 1996 Nov;21(6):399-408. doi: 10.1111/j.1365-2230.1996.tb00142.x.

21. Brembilla NC, Boehncke WH. Revisiting the interleukin 17 family of cytokines in psoriasis: pathogenesis and potential targets for innovative therapies. *Front Immunol.* 2023 May 22;14:1186455. doi: 10.3389/fimmu.2023.1186455.
22. Brożyna AA, Slominski RM, Nedoszytko B, Zmijewski MA, Slominski AT. Vitamin D Signaling in Psoriasis: Pathogenesis and Therapy. *Int J Mol Sci.* 2022 Aug 2;23(15):8575. doi: 10.3390/ijms23158575.
23. Bu J, Ding R, Zhou L, Chen X, Shen E. Epidemiology of Psoriasis and Comorbid Diseases: A Narrative Review. *Front Immunol.* 2022 Jun 10;13:880201. doi: 10.3389/fimmu.2022.880201.
24. Cai Y, Xue F, Quan C, Qu M, Liu N, Zhang Y, et al. A critical role of the IL-1 β -IL-1R signaling pathway in skin inflammation and psoriasis pathogenesis. *J Invest Dermatol.* 2019 Jan;139(1):146-156. doi: 10.1016/j.jid.2018.07.025.
25. Chang YT, Chen TJ, Liu PC, Chen YC, Chen YJ, Huang YL, Jih JS, Chen CC, Lee DD, Wang WJ, Lin MW, Liu HN. Epidemiological study of psoriasis in the national health insurance database in Taiwan. *Acta Derm Venereol.* 2009;89(3):262-6. doi: 10.2340/00015555-0642.
26. Chen WY, Chen SC, Hsu SY, Lin YA, Shih CM, Huang CY, Wang KH, Lee AW. Annoying Psoriasis and Atopic Dermatitis: A Narrative Review. *Int J Mol Sci.* 2022 Apr 28;23(9):4898. doi: 10.3390/ijms23094898.
27. Chiang CC, Cheng WJ, Korinek M, Lin CY, Hwang TL. Neutrophils in Psoriasis. *Front Immunol.* 2019 Oct 9;10:2376. doi: 10.3389/fimmu.2019.02376.
28. Choi MR, Kim HD, Cho S, Jeon SH, Kim DH, Wee J, et al. Anoctamin1 induces hyperproliferation of HaCaT keratinocytes and triggers imiquimod-induced psoriasis-like skin injury in mice. *Int J Mol Sci.* 2021 Jul 1;22(13):7145. doi: 10.3390/ijms22137145.
29. Colombo MD, Cassano N, Bellia G, Vena GA. Cyclosporine regimens in plaque psoriasis: an overview with special emphasis on dose, duration, and old and new treatment approaches. *ScientificWorldJournal.* 2013 Jul 25;2013:805705. doi: 10.1155/2013/805705.

30. Conrad C, Gilliet M. Psoriasis: from Pathogenesis to Targeted Therapies. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2018 Feb;54(1):102-113. doi: 10.1007/s12016-018-8668-1.
31. Council of Europe. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. Strasbourg: Council of Europe; 1986. 52 p.
32. Crowley EL, Gooderham MJ. Phosphodiesterase-4 inhibition in the management of psoriasis. *Pharmaceutics*. 2023 Dec 22;16(1):23. doi: 10.3390/pharmaceutics16010023.
33. Curcio A, Kontzias C, Gorodokin B, Feldman S, Kircik L. Patient preferences in topical psoriasis treatment. *J Drugs Dermatol*. 2023 Apr 1;22(4):326-332. doi: 10.36849/JDD.7372.
34. D'Ambrosio F, Maida A, Pappalardo C, Scardigno A, Nisticò A, Ricciardi R, et al. The costs of psoriasis and atopic dermatitis in Europe: a systematic literature review. *Popul Med*. 2023;5(Suppl):A1785. doi: 10.18332/popmed/163876.
35. da Silva CAP, Von Kossel K, Leszczynski M, Melnik T, Riera R. Methotrexate for psoriasis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2019 Apr 9;2019(4):CD010498. doi: 10.1002/14651858.CD010498.pub2.
36. Damiani G, Bragazzi NL, Karimkhani Aksut C, Wu D, Alicandro G, McGonagle D, et al. The Global, Regional, and National Burden of Psoriasis: Results and Insights From the Global Burden of Disease 2019 Study. *Front Med (Lausanne)*. 2021 Dec 16;8:743180. doi: 10.3389/fmed.2021.743180.
37. Di Rosa M, Giroud JP, Willoughby DA. Studies on the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. *J Pathol*. 1971 May;104(1):15-29. doi: 10.1002/path.1711040103.
38. Diulmezova-Bilash OO. Osoblyvosti likuvannia riznykh form psoriazu u zhinok. *Dermatovenerol Kosmetol Seksopatol*. 2019;3-4:48-49. doi: 10.37321/dermatology.2019.3-4-08.
39. Draelos ZD, Adam DN, Hong HC, Lebwohl MG, Lynde CW, Nahm WK, et al. Efficacy and safety of roflumilast cream for chronic plaque psoriasis with facial/neck

and intertriginous area involvement: a post hoc analysis from a randomized controlled trial. *Br J Dermatol*. 2023 May 24;188(6):810-812. doi: 10.1093/bjd/ljad060.

40. Drakos A, Vender R, Torres T. Topical roflumilast for the treatment of psoriasis. *Expert Rev Clin Immunol*. 2023 Jul-Dec;19(9):1053-1062. doi: 10.1080/1744666X.2023.2219897.

41. Duvic M, Asano AT, Hager C, Mays S. The pathogenesis of psoriasis and the mechanism of action of tazarotene. *J Am Acad Dermatol*. 1998 Oct;39(4 Pt 2):S129-33. doi: 10.1016/s0190-9622(98)70309-3.

42. Elder AJ, Patel P, Daveluy S. Tapinarof. [Updated 2023 Aug 6]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK594244/>

43. Elmetts CA, Korman NJ, Prater EF, Wong EB, Rupani RN, Kivelevitch D, et al. Joint AAD–NPF guidelines of care for the management and treatment of psoriasis with topical therapy and alternative medicine modalities for psoriasis severity measures. *J Am Acad Dermatol*. 2021 Feb;84(2):432-470. doi: 10.1016/j.jaad.2020.07.087.

44. Federman DG, Froelich CW, Kirsner RS. Topical psoriasis therapy. *Am Fam Physician*. 1999 Feb 15;59(4):957-62, 964.

45. Feldman SR, Lewitt GM. Chronic plaque psoriasis in adults: treatment of disease amenable to topical therapy [Internet]. UpToDate. Dellavalle RP, Duffin KC, editors. Waltham (MA): UpToDate; 2024 Aug 5 [cited 2024 Aug 19]. Available from: <https://www.uptodate.com/contents/chronic-plaque-psoriasis-in-adults-treatment-of-disease-amenable-to-topical-therapy/print>

46. Fenix K, Wijesundara DK, Cowin AJ, Grubor-Bauk B, Kopecki Z. Immunological memory in imiquimod-induced murine model of psoriasiform dermatitis. *Int J Mol Sci*. 2020 Sep 30;21(19):7228. doi: 10.3390/ijms21197228.

47. Ferrara F, Verduci C, Laconi E, Mangione A, Dondi C, Del Vecchio M, Carlevatti V, Zovi A, Capuozzo M, Langella R. Current therapeutic overview and future perspectives regarding the treatment of psoriasis. *Int Immunopharmacol*. 2024 Dec 25;143(Pt 1):113388. doi: 10.1016/j.intimp.2024.113388.

48. Fitch E, Harper E, Skorcheva I, Kurtz SE, Blauvelt A. Pathophysiology of psoriasis: recent advances on IL-23 and Th17 cytokines. *Curr Rheumatol Rep*. 2007 Dec;9(6):461-7. doi: 10.1007/s11926-007-0075-1.
49. Francis SH, Houslay MD, Conti M. Phosphodiesterase inhibitors: factors that influence potency, selectivity, and action. *Handb Exp Pharmacol*. 2011;(204):47-84. doi: 10.1007/978-3-642-17969-3_2.
50. Gabros S, Nessel TA, Zito PM. Topical Corticosteroids. [Updated 2023 Jul 10]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532940/>
51. Gangwar RS, Gudjonsson JE, Ward NL. Mouse Models of Psoriasis: A Comprehensive Review. *J Invest Dermatol*. 2022 Mar;142(3 Pt B):884-897. doi: 10.1016/j.jid.2021.06.019.
52. Gao JC, Wu AG, Contento MN, Maher JM, Cline A. Apremilast in the Treatment of Plaque Psoriasis: Differential Use in Psoriasis. *Clin Cosmet Investig Dermatol*. 2022 Mar 8;15:395-402. doi: 10.2147/CCID.S266036.
53. Garner KK, Hoy KDS, Carpenter AM. Psoriasis: recognition and management strategies. *Am Fam Physician*. 2023 Dec;108(6):562-573.
54. Gisondi P, Girolomoni G. Apremilast in the therapy of moderate-to-severe chronic plaque psoriasis. *Drug Des Devel Ther*. 2016 May 25;10:1763-70. doi: 10.2147/DDDT.S108115.
55. Gooderham M, Papp K. Selective Phosphodiesterase Inhibitors for Psoriasis: Focus on Apremilast. *BioDrugs*. 2015 Oct;29(5):327-39. doi: 10.1007/s40259-015-0144-3.
56. Griffiths CEM, Armstrong AW, Gudjonsson JE, Barker JNWN. Psoriasis. *Lancet*. 2021 Apr 3;397(10281):1301-1315. doi: 10.1016/S0140-6736(20)32549-6.
57. Grine L, Steeland S, Van Ryckeghem S, Ballegeer M, Lienenklaus S, Weiss S, et al. Topical imiquimod yields systemic effects due to unintended oral uptake. *Sci Rep*. 2016 Jan 28;6:20134. doi: 10.1038/srep20134.

58. Guliyev IS, Huseynov DA, Martynova GS, Maksakova OP, Zeinalov SG. Biomarkers of Naftalan oil. *ANAS Trans Earth Sci.* 2024;1:119-128. doi: 10.33677/ggianas20240100113.

59. Guo J, Zhang H, Lin W, Lu L, Su J, Chen X. Signaling pathways and targeted therapies for psoriasis. *Signal Transduct Target Ther.* 2023 Nov 27;8(1):437. doi: 10.1038/s41392-023-01655-6. Erratum in: *Signal Transduct Target Ther.* 2024 Jan 22;9(1):25. doi: 10.1038/s41392-023-01733-9.

60. Hawkes JE, Gudjonsson JE, Ward NL. The Snowballing Literature on Imiquimod-Induced Skin Inflammation in Mice: A Critical Appraisal. *J Invest Dermatol.* 2017 Mar;137(3):546-549. doi: 10.1016/j.jid.2016.10.024.

61. Holzerová E, Prokisch H. Mitochondria: Much ado about nothing? How dangerous is reactive oxygen species production? *Int J Biochem Cell Biol.* 2015 Jun;63:16-20. doi: 10.1016/j.biocel.2015.01.021.

62. Horváth S, Komlódi R, Perkecz A, Pintér E, Gyulai R, Kemény Á. Methodological refinement of Aldara-induced psoriasiform dermatitis model in mice. *Sci Rep.* 2019 Mar 6;9(1):3685. doi: 10.1038/s41598-019-39903-x.

63. Hu J, Bian Q, Ma X, Xu Y, Gao J. A double-edged sword: ROS related therapies in the treatment of psoriasis. *Asian J Pharm Sci.* 2022 Nov;17(6):798-816. doi: 10.1016/j.ajps.2022.10.005.

64. Isayeva GA. Analysis of scientific research results in the field of therapeutic Naphthalene oil. *PPOR.* 2023;24(2):184-195. doi: 10.36719/1726-4685/94/184-195.

65. Ismayilova GE, Namazov NR, Bakhshaliyeva KF, Yusifova MR, Jalilova SKh. Antifungal activity of substances obtained from different sources. *Int J Adv Res Biol Sci.* 2019;6(6):1-6. doi: 10.22192/ijarbs.2019.06.06.001.

66. Jabeen M, Boisgard AS, Danoy A, El Kholti N, Salvi JP, Boulieu R, et al. Advanced characterization of imiquimod-induced psoriasis-like mouse model. *Pharmaceutics.* 2020 Aug 20;12(9):789. doi: 10.3390/pharmaceutics12090789.

67. Jett JE, McLaughlin M, Lee MS, Parish LC, DuBois J, Raoof TJ, et al. Tapinarof cream 1 % for extensive plaque psoriasis: a maximal use trial on safety,

tolerability, and pharmacokinetics. *Am J Clin Dermatol*. 2022 Jan;23(1):83-91. doi: 10.1007/s40257-021-00641-4.

68. Kaczmarska A, Kwiatkowska D, Skrzypek KK, Kowalewski ZT, Jaworecka K, Reich A. Pathomechanism of pruritus in psoriasis and atopic dermatitis: novel approaches, similarities and differences. *Int J Mol Sci*. 2023;24(19):14734. doi: 10.3390/ijms241914734.

69. Kamiya K, Kishimoto M, Sugai J, Komine M, Ohtsuki M. Risk Factors for the Development of Psoriasis. *Int J Mol Sci*. 2019 Sep 5;20(18):4347. doi: 10.3390/ijms20184347.

70. Kim BY, Choi JW, Kim BR, Youn SW. Histopathological findings are associated with the clinical types of psoriasis but not with the corresponding lesional psoriasis severity index. *Ann Dermatol*. 2015 Feb;27(1):26-31. doi: 10.5021/ad.2015.27.1.26.

71. Kim WB, Jerome D, Yeung J. Diagnosis and management of psoriasis. *Can Fam Physician*. 2017 Apr;63(4):278-285.

72. Kolasinski SL, Neogi T, Hochberg MC, Oatis C, Guyatt G, Block J, et al. 2019 American College of Rheumatology/Arthritis Foundation guideline for the management of osteoarthritis of the hand, hip, and knee. *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2020 Feb;72(2):149-162. doi: 10.1002/acr.24131. Epub 2020 Jan 6. Erratum in: *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2021 May;73(5):764. doi: 10.1002/acr.24615.

73. Korman NJ. Management of psoriasis as a systemic disease: what is the evidence? *Br J Dermatol*. 2020 Apr;182(4):840-848. doi: 10.1111/bjd.18245.

74. Korneev A, Peshkova M, Koteneva P, Gundogdu A, Timashev P. Modulation of the skin and gut microbiome by psoriasis treatment: a comprehensive systematic review. *Arch Dermatol Res*. 2024 Jun 8;316(7):374. doi: 10.1007/s00403-024-03024-x.

75. Kotsiumbas IYa, ed. *Doklinichni doslidzhennia veterynarnykh likarskykh zasobiv*. Lviv: Triada plus; 2006. 360 p.

76. Kotvitska AA, Carlo VV. Research prevalence of psoriasis in countries and Ukraine. *Zaporozhye Med J* [Internet]. 2013 Jun 13 [cited 2024 Feb 19];15(3). Available from: <http://zmj.zsmu.edu.ua/article/view/13569>

77. Kozhemiakin Yu. M., Khromov O. S., Filonenko M. A., Saifetdinova H. A. Naukovo-praktychni rekomendatsii z utrymannia laboratornykh tvaryn ta roboty z nymy. – K.: Avitsena, 2002. – 156 p

78. Krantz Å, Carrero JJ, Yang Y, Schalin L, Lysell J, Mazhar F. Psoriasis/Psoriatic Arthritis Patients' Long-term Treatment Patterns and Adherence to Systemic Treatments Monitoring Recommendations. *Acta Derm Venereol.* 2023 Jun 15;103:adv6505. doi: 10.2340/actadv.v103.6505.

79. Kravchenko VG, Emchenko YA, Kravchenko AV, Dashchuk AM. Psoriasis: current status of incidence and organizational measures. *Ukrainian Journal of Dermatology, Venereology, Cosmetology.* 2022;3-4(86-87):42-48. doi: 10.30978/UJDVK2022-3-4-42.

80. Kravchenko VG, Kyazyamov GA. Naphtalan – the curative gift of nature, or a new appearance of an old friend. *Dermatovenerol Cosmetol Seksopatol.* 2006;(1-2):89–96.

81. Krnjevic-Pezic G, Alajbeg I, Marčić G, et al. Naphthalan oil in the treatment of psoriasis and psoriatic arthritis. *Psoriasis Forum.* 2012;18a(1):26-31. doi: 10.1177/247553031218a00104.

82. Kutwin M, Woźniacka A. Interleukins 20 and 8 - less widely known cytokines in psoriasis. *Postepy Dermatol Alergol.* 2023 Apr;40(2):194-203. doi: 10.5114/ada.2022.119077.

83. Lang TA, Secic M. *How to report statistics in medicine: annotated guidelines for authors, editors, and reviewers.* 2nd ed. Philadelphia (PA): ACP Press; 2006. 490 p.

84. Lapach SM, Chubenko AV, Babich PM. *Statystychni metody u biomedichnykh doslidzhenniakh iz vykorystanniam Excel.* 2nd ed. Kyiv: Morion; 2001. 196 p.

85. Lebwohl M. The role of salicylic acid in the treatment of psoriasis. *Int J Dermatol.* 1999 Jan;38(1):16-24. doi: 10.1046/j.1365-4362.1999.00500.x.

86. Lee HJ, Kim M. Challenges and Future Trends in the Treatment of Psoriasis. *Int J Mol Sci.* 2023 Aug 28;24(17):13313. doi: 10.3390/ijms241713313.

87. Lee K, Kircik L, Armstrong AW. Real-world evidence on the use of calcipotriene and betamethasone dipropionate aerosol foam 0.005%/0.064% in the

treatment of psoriasis: a review of investigator-initiated studies around the globe. *J Drugs Dermatol*. 2023 Sep 1;22(9):s5-14.

88. Lennicke C, Cochemé HM. Redox metabolism: ROS as specific molecular regulators of cell signaling and function. *Mol Cell*. 2021 Sep 16;81(18):3691-3707. doi: 10.1016/j.molcel.2021.08.018.

89. Li H, Zuo J, Tang W. Phosphodiesterase-4 Inhibitors for the Treatment of Inflammatory Diseases. *Front Pharmacol*. 2018 Oct 17;9:1048. doi: 10.3389/fphar.2018.01048.

90. Li Q, Liu W, Gao S, et al. Application of imiquimod-induced murine psoriasis model in evaluating interleukin-17A antagonist. *BMC Immunol*. 2021;22:11. doi: 10.1186/s12865-021-00401-3.

91. Lim WL, How CH, Tan KW. Management of psoriasis in primary care. *Singapore Med J*. 2021 Mar;62(3):109-112. doi: 10.11622/smedj.2021026.

92. Lin YK, Yang SH, Chen CC, Kao HC, Fang JY. Using Imiquimod-Induced Psoriasis-Like Skin as a Model to Measure the Skin Penetration of Anti-Psoriatic Drugs. *PLoS One*. 2015 Sep 10;10(9):e0137890. doi: 10.1371/journal.pone.0137890.

93. Lis-Święty A, Frątczak A. Proactive therapy: New perspectives for long-term topical treatment of psoriasis. *Dermatol Ther*. 2022 May;35(5):e15364. doi: 10.1111/dth.15364.

94. Magenta A, Dellambra E, Ciarapica R, Capogrossi MC. Oxidative stress, microRNAs and cytosolic calcium homeostasis. *Cell Calcium*. 2016 Sep;60(3):207-17. doi: 10.1016/j.ceca.2016.04.002.

95. Mamchych TI, Olenko AY, Osypchuk MM, Shportiuk VG. *Statystychnyi analiz danykh z paketom STATISTICA: navchalno-metodychnyi posibnyk*. Drohobych: Vydavnycha firma «Vidrodzhennia»; 2006. 208 p. ISBN 966-538-161-X.

96. Mammedova PB, Valiyeva MN, Agamalieva AJ. Preparation of nano-emulsion on the basis of Naftalan oil by modern technology. *Sci Eur*. 2023;(111):22-27.

97. Massi D, editor. *Dermatopathology*. 1st ed. Cham: Springer; 2016. XIX, 367 p. (Encyclopedia of Pathology). doi: 10.1007/978-3-319-30006-1.

98. McCarson K. E. Models of inflammation: Carrageenan- or Complete Freund's Adjuvant (CFA)-induced edema and hypersensitivity in the rat / K. E. McCarson, J. C. Fehrenbacher // *Curr. Protoc.* – 2021. – Vol. 1, № 7. – P. e202. doi: 10.1002/cpz1.202.

99. McMahon SB, Dargan P, Lanus A, Wiffen P. The burden of musculoskeletal pain and the role of topical non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in its treatment. Ten underpinning statements from a global pain faculty. *Curr Med Res Opin.* 2021 Feb;37(2):287-292. doi: 10.1080/03007995.2020.1847718.

100. Mease PJ. Measures of psoriatic arthritis: Tender and Swollen Joint Assessment, Psoriasis Area and Severity Index (PASI), Nail Psoriasis Severity Index (NAPSI), Modified Nail Psoriasis Severity Index (mNAPSI), Mander/Newcastle Enthesitis Index (MEI), Leeds Enthesitis Index (LEI), Spondyloarthritis Research Consortium of Canada (SPARCC), Maastricht Ankylosing Spondylitis Enthesis Score (MASES), Leeds Dactylitis Index (LDI), Patient Global for Psoriatic Arthritis, Dermatology Life Quality Index (DLQI), Psoriatic Arthritis Quality of Life (PsAQOL), Functional Assessment of Chronic Illness Therapy-Fatigue (FACIT-F), Psoriatic Arthritis Response Criteria (PsARC), Psoriatic Arthritis Joint Activity Index (PsAJAI), Disease Activity in Psoriatic Arthritis (DAPSA), and Composite Psoriatic Disease Activity Index (CPDAI). *Arthritis Care Res (Hoboken)*. 2011;63(Suppl 11):S64-S85. doi: 10.1002/acr.20577.

101. Medovic MV, Jakovljevic VL, Zivkovic VI, Jeremic NS, Jeremic JN, Bolevich SB, et al. Psoriasis between Autoimmunity and Oxidative Stress: Changes Induced by Different Therapeutic Approaches. *Oxid Med Cell Longev.* 2022 Mar. 12;2022:2249834. doi: 10.1155/2022/2249834.

102. Mehta AB, Nadkarni NJ, Patil SP, Godse KV, Gautam M, Agarwal S. Topical corticosteroids in dermatology. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 2016 Jul-Aug;82(4):371-8. doi: 10.4103/0378-6323.178903.

103. Menter A, Griffiths CE. Current and future management of psoriasis. *Lancet.* 2007 Jul 21;370(9583):272-284. doi: 10.1016/S0140-6736(07)61129-5.

104. Menter A, Korman NJ, Elmets CA, Feldman SR, Gelfand JM, Gordon KB, et al. Guidelines of care for the management of psoriasis and psoriatic arthritis: section 4.

Guidelines of care for the management and treatment of psoriasis with traditional systemic agents. *J Am Acad Dermatol.* 2009 Sep;61(3):451-85. doi: 10.1016/j.jaad.2009.03.027.

105. Menter A, Strober BE, Kaplan DH, Kivelevitch D, Prater EF, Stoff B, et al. Joint AAD-NPF guidelines of care for the management and treatment of psoriasis with biologics. *J Am Acad Dermatol.* 2019 Apr;80(4):1029-1072. doi: 10.1016/j.jaad.2018.11.057.

106. Milakovic M, Gooderham MJ. Phosphodiesterase-4 Inhibition in Psoriasis. *Psoriasis (Auckl).* 2021 Mar 17;11:21-29. doi: 10.2147/PTT.S303634.

107. Motta A, Gonzalez LF, Garcia G, Guzman J, Prada L, Herrera H, et al. Atlas of Dermatology. Inflammatory, Infectious and Tumoral Skin Diseases. Springer Nature Switzerland AG; 2022.

108. Nassim D, Alajmi A, Jfri A, Pehr K. Apremilast in dermatology: A review of literature. *Dermatol Ther.* 2020 Nov;33(6):e14261. doi: 10.1111/dth.14261.

109. Nast A, Smith C, Spuls PI, Avila Valle G, Bata-Csörgö Z, Boonen H, et al. EuroGuiDerm Guideline on the systemic treatment of Psoriasis vulgaris - Part 1: treatment and monitoring recommendations. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2020 Nov;34(11):2461-2498. doi: 10.1111/jdv.16915.

110. Neu SD, Strzepa A, Martin D, Sorci-Thomas MG, Pritchard KA Jr, Dittel BN. Myeloperoxidase Inhibition Ameliorates Plaque Psoriasis in Mice. *Antioxidants (Basel).* 2021 Aug 25;10(9):1338. doi: 10.3390/antiox10091338.

111. Nogueira S, Rodrigues MA, Vender R, Torres T. Tapinarof for the treatment of psoriasis. *Dermatol Ther.* 2022 Dec;35(12):e15931. doi: 10.1111/dth.15931.

112. Ogawa K, Okada Y. The current landscape of psoriasis genetics in 2020. *J Dermatol Sci.* 2020 Jul;99(1):2-8. doi: 10.1016/j.jdermsci.2020.05.008.

113. Orsmond A, Bereza-Malcolm L, Lynch T, March L, Xue M. Skin Barrier Dysregulation in Psoriasis. *Int J Mol Sci.* 2021 Oct 7;22(19):10841. doi: 10.3390/ijms221910841.

114. O'Toole A, Gooderham M. Topical Roflumilast for Plaque Psoriasis. *Skin Therapy Lett.* 2023 Sep;28(5):1-4.

115. Parab S, Doshi G. The Experimental Animal Models in Psoriasis Research: A Comprehensive Review. *Int Immunopharmacol*. 2023 Apr;117:109897. doi: 10.1016/j.intimp.2023.109897.
116. Parisi R, Iskandar IYK, Kontopantelis E, Augustin M, Griffiths CEM, Ashcroft DM, et al. National, regional, and worldwide epidemiology of psoriasis: systematic analysis and modelling study. *BMJ*. 2020;369:m1590. doi: 10.1136/bmj.m1590.
117. Petit RG, Cano A, Ortiz A, Espina M, Prat J, Muñoz M, et al. Psoriasis: from pathogenesis to pharmacological and nano-technological-based therapeutics. *Int J Mol Sci*. 2021 May 7;22(9):4983. doi: 10.3390/ijms22094983
118. Piquero-Casals J, Morgado-Carrasco D, Granger C, Trullàs C, Jesús-Silva A, Krutmann J. Urea in Dermatology: A Review of its Emollient, Moisturizing, Keratolytic, Skin Barrier Enhancing and Antimicrobial Properties. *Dermatol Ther (Heidelb)*. 2021 Dec;11(6):1905-1915. doi: 10.1007/s13555-021-00611-y.
119. Pixley JN, Schaetzle T, Feldman SR. A Review of Topical Roflumilast for the Treatment of Plaque Psoriasis. *Ann Pharmacother*. 2023 Aug;57(8):966-969. doi: 10.1177/10600280221137750.
120. Portarapillo A, Potestio L, Tommasino N, Lauletta G, Feo F, Salsano A, et al. Novel pharmacotherapies and breakthroughs in psoriasis treatment: 2024 and beyond. *Expert Opin Pharmacother*. 2024 Jun;25(9):1187-1198. doi: 10.1080/14656566.2024.2373354.
121. Raharja A, Mahil SK, Barker JN. Psoriasis: a brief overview. *Clin Med (Lond)*. 2021 May;21(3):170-173. doi: 10.7861/clinmed.2021-0257.
122. Ramic L, Sator P. Topical treatment of psoriasis vulgaris. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2023 Jun;21(6):631-642. doi: 10.1111/ddg.15042.
123. Reid C, Griffiths CEM. Psoriasis and Treatment: Past, Present and Future Aspects. *Acta Derm Venereol*. 2020 Jan 30;100(3):adv00032. doi: 10.2340/00015555-3386.
124. Rendon A, Schäkel K. Psoriasis Pathogenesis and Treatment. *Int J Mol Sci*. 2019 Mar 23;20(6):1475. doi: 10.3390/ijms20061475.

125. Rogulj AA, Z Alajbeg I, Brailo V, Škrinjar I, Žužul I, Vučićević-Boras V, et al. Topical NAVS naphthalan for the treatment of oral lichen planus and recurrent aphthous stomatitis: A double blind, randomized, parallel group study. *PLoS One*. 2021 Apr 8;16(4):e0249862. doi: 10.1371/journal.pone.0249862.
126. Sarama R, Matharu PK, Abduldaiem Y, Corrêa MP, Gil CD, Greco KV. In vitro disease models for understanding psoriasis and atopic dermatitis. *Front Bioeng Biotechnol*. 2022;10:803218. doi: 10.3389/fbioe.2022.803218.
127. Sbidian E, Chaimani A, Guelimi R, Garcia-Doval I, Hua C, Hughes C, et al. Systemic pharmacological treatments for chronic plaque psoriasis: a network meta-analysis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2023 Jul 12;7(7):CD011535. doi: 10.1002/14651858.CD011535.pub6.
128. Schafer P. Apremilast mechanism of action and application to psoriasis and psoriatic arthritis. *Biochem Pharmacol*. 2012 Jun 15;83(12):1583-90. doi: 10.1016/j.bcp.2012.01.001.
129. Schlager JG, Rosumeck S, Werner RN, Jacobs A, Schmitt J, Schlager C, Nast A. Topical treatments for scalp psoriasis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2016 Feb 26;2(2):CD009687. doi: 10.1002/14651858.CD009687.pub2.
130. Schlager JG, Rosumeck S, Werner RN, Jacobs A, Schmitt J, Schlager C, Nast A. Topical treatments for scalp psoriasis: summary of a Cochrane Systematic Review. *Br J Dermatol*. 2017 Mar;176(3):604-614. doi: 10.1111/bjd.14811.
131. Schön MP, Manzke V, Erpenbeck L. Animal models of psoriasis-highlights and drawbacks. *J Allergy Clin Immunol*. 2021 Feb;147(2):439-455. doi: 10.1016/j.jaci.2020.04.034.
132. Seredynska NM, Mokhort MA, Kyrychok LM. Bolova chutlyvist ta adekvatnist yiyi otsinky za testom «tail-flick». *Farmakol Lik Toksikol*. 2014;(3):45–51.
133. Sieminska I, Pieniawska M, Grzywa TM. The Immunology of Psoriasis-Current Concepts in Pathogenesis. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2024 Apr;66(2):164-191. doi: 10.1007/s12016-024-08991-7.
134. Sigmund AM, Winkler M, Engelmayer S, Kugelmann D, Egu DT, Steinert LS, et al. Apremilast prevents blistering in human epidermis and stabilizes keratinocyte

adhesion in pemphigus. *Nat Commun.* 2023 Jan 9;14(1):116. doi: 10.1038/s41467-022-35741-0. Erratum in: *Nat Commun.* 2023 Feb 7;14(1):665. doi: 10.1038/s41467-023-36464-6.

135. Singh K, Argáez C. Cyclosporine for moderate to severe plaque psoriasis in adults: a review of clinical effectiveness and safety [Internet]. Ottawa (ON): Canadian Agency for Drugs and Technologies in Health; 2018 Apr 3 [cited 2024 Feb 19]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532206/>

136. Singh R, Koppu S, Perche PO, Feldman SR. The Cytokine Mediated Molecular Pathophysiology of Psoriasis and Its Clinical Implications. *Int J Mol Sci.* 2021 Nov 26;22(23):12793. doi: 10.3390/ijms222312793.

137. Smith CH, Yiu ZZN, Bale T, Burden AD, Coates LC, Edwards W, et al.; British Association of Dermatologists' Clinical Standards Unit. British Association of Dermatologists guidelines for biologic therapy for psoriasis 2020: a rapid update. *Br J Dermatol.* 2020 Oct;183(4):628-637. doi: 10.1111/bjd.19039.

138. Soleymani T, Hung T, Soung J. The role of vitamin D in psoriasis: a review. *Int J Dermatol.* 2015 Apr;54(4):383-92. doi: 10.1111/ijd.12790.

139. Stefanov OV, ed. *Doklinichni doslidzhennia likarskykh zasobiv: metodychni rekomendatsii.* Kyiv: Avicenna; 2001. 528 p.

140. Swindell WR, Michaels KA, Sutter AJ, Diaconu D, Fritz Y, Xing X, et al. Imiquimod has strain-dependent effects in mice and does not uniquely model human psoriasis. *Genome Med.* 2017 Mar 9;9(1):24. doi: 10.1186/s13073-017-0415-3.

141. Takeshita J, Grewal S, Langan SM, Mehta NN, Ogdie A, Van Voorhees AS, et al. Psoriasis and comorbid diseases: Epidemiology. *J Am Acad Dermatol.* 2017 Mar;76(3):377-390. doi: 10.1016/j.jaad.2016.07.064.

142. Tatiya A, Patil J, Girase T, Patil M, Patel K. An Overview on Management of Psoriasis Using Calcipotriene and Its Amalgamation as Nano Based Drug Delivery System. *Mater Proc.* 2023;14:38. doi: 10.3390/IOCN2023-14504.

143. Thaci D, Schindewolf M, Smeh-Skrbin A, Krnjevic-Pezic G, Vrzogic P, Dobric I, et al. Heavy naphthen oil exhibits antipsoriatic efficacy in vivo and

antiproliferative as well as differentiation-inducing effects on keratinocytes in vitro. *Arch Dermatol*. 2000 May;136(5):678-9. doi: 10.1001/archderm.136.5.678.

144. Todorović V, McDonald HA, Hoover P, Wetter JB, Marinopoulos AE, Woody CL, et al. Cytokine induced 3-D organotypic psoriasis skin model demonstrates distinct roles for NF- κ B and JAK pathways in disease pathophysiology. *Exp Dermatol*. 2022;31(7):1036-1047. doi: 10.1111/exd.14551.

145. Todorović V, Su Z, Putman CB, Kakavas SJ, Salte KM, McDonald HA, Wetter JB, Paulsboe SE, Sun Q, Gerstein CE, Medina L, Sielaff B, Sadhukhan R, Stockmann H, Richardson PL, Qiu W, Argiriadi MA, Henry RF, Herold JM, Shotwell JB, McGaraughty SP, Honore P, Gopalakrishnan SM, Sun CC, Scott VE. Small Molecule IL-36 γ Antagonist as a Novel Therapeutic Approach for Plaque Psoriasis. *Sci Rep*. 2019 Jun 24;9(1):9089. doi: 10.1038/s41598-019-45626-w. PMID: 31235749; PMCID: PMC6591177.

146. Tokuyama M, Mabuchi T. New Treatment Addressing the Pathogenesis of Psoriasis. *Int J Mol Sci*. 2020 Oct 11;21(20):7488. doi: 10.3390/ijms21207488.

147. Torales J, Echeverría C, Barrios I, García O, O'Higgins M, Castaldelli-Maia JM, Ventriglio A, Jafferany M. Psychodermatological mechanisms of psoriasis. *Dermatol Ther*. 2020 Nov;33(6):e13827. doi: 10.1111/dth.13827.

148. Torsekar R, Gautam MM. Topical Therapies in Psoriasis. *Indian Dermatol Online J*. 2017 Jul-Aug;8(4):235-245. doi: 10.4103/2229-5178.209622.

149. Trémezaygues L, Reichrath J. Vitamin D analogs in the treatment of psoriasis: Where are we standing and where will we be going? *Dermatoendocrinol*. 2011 Jul;3(3):180-6. doi: 10.4161/derm.3.3.17534.

150. Tsai YC, Tsai TF. Anti-interleukin and interleukin therapies for psoriasis: current evidence and clinical usefulness. *Ther Adv Musculoskelet Dis*. 2017 Nov;9(11):277-294. doi: 10.1177/1759720X17735756.

151. Uppala R, Tsoi LC, Harms PW, Wang B, Billi AC, Maverakis E, Michelle Kahlenberg J, Ward NL, Gudjonsson JE. «Autoinflammatory psoriasis»-genetics and biology of pustular psoriasis. *Cell Mol Immunol*. 2021 Feb;18(2):307-317. doi: 10.1038/s41423-020-0519-3.

152. Uva L, Miguel D, Pinheiro C, Antunes J, Cruz D, Ferreira J, Filipe P. Mechanisms of action of topical corticosteroids in psoriasis. *Int J Endocrinol*. 2012;2012:561018. doi: 10.1155/2012/561018.
153. van de Kerkhof PC, Kragballe K. Recommendations for the topical treatment of psoriasis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2005 Jul;19(4):495-9. doi: 10.1111/j.1468-3083.2005.01198.x.
154. van de Kerkhof PC. From Empirical to Pathogenesis-Based Treatments for Psoriasis. *J Invest Dermatol*. 2022 Jul;142(7):1778-1785. doi: 10.1016/j.jid.2022.01.014.
155. van der Fits L, Mourits S, Voerman JSA, Kant M, Boon L, Laman JD, et al. Imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice is mediated via the IL-23/IL-17 axis. *J Immunol*. 2009 May 1;182(9):5836–5845. doi: 10.4049/jimmunol.0802999.
156. Varma SR, Sivaprakasam TO, Mishra A, Prabhu S, M R, P R. Imiquimod-induced psoriasis-like inflammation in differentiated Human keratinocytes: Its evaluation using curcumin. *Eur J Pharmacol*. 2017 Oct 15;813:33-41. doi: 10.1016/j.ejphar.2017.07.040.
157. Vrzogić P, Ostrogović Z, Alajbeg A. Naphthalan--a natural medicinal product. *Acta Dermatovenereol Croat*. 2003;11(3):178-84.
158. Wang WM, Jin HZ. Role of Neutrophils in Psoriasis. *J Immunol Res*. 2020 Jun 5;2020:3709749. doi: 10.1155/2020/3709749.
159. Witman PM. Topical therapies for localized psoriasis. *Mayo Clin Proc*. 2001 Sep;76(9):943-9. doi: 10.4065/76.9.943.
160. Wu DH, Zhang MM, Li N, Li X, Cai QW, Yu WL, Liu LP, Zhu W, Lu CJ. PSORI-CM02 alleviates IMQ-induced mouse dermatitis via differentially regulating pro- and anti-inflammatory cytokines targeting of Th2 specific transcript factor GATA3. *Biomed Pharmacother*. 2019 Feb; 110:265-274. doi: 10.1016/j.biopha.2018.11.092.
161. Wu H, Ou J, Li K, Wang T, Nandakumar KS. Comparative studies on mannan and imiquimod induced experimental plaque psoriasis inflammation in inbred mice. *Clin Exp Immunol*. 2023 Mar 24;211(3):288-300. doi: 10.1093/cei/uxad004.

162. Wu JJ, Suryavanshi M, Davidson D, Patel V, Jain A, Seigel L. Economic Burden of Comorbidities in Patients with Psoriasis in the USA. *Dermatol Ther (Heidelb)*. 2023 Jan;13(1):207-219. doi: 10.1007/s13555-022-00832-9.
163. Wu M, Dai C, Zeng F. Cellular mechanisms of psoriasis pathogenesis: a systemic review. *Clin Cosmet Investig Dermatol*. 2023;16:2503-2515. doi: 10.2147/CCID.S420850.
164. Yemchenko YaO, Ishcheikin KE, Kaidashev IP. Obesity and circadian rhythm disorders in patients with psoriasis. *Visnyk Ukrainskoi Medychnoi Stomatolohichnoi Akademii*. 2021;21(1):160-165. doi: 10.31718/2077-1096.21.1.160.
165. Zaichenko G, Horbach A, Stan I. Experimental modeling of psoriasis-like skin lesions in inbred BALB/c mice. In: Continuous Professional Development of Pharmaceutical Workers: Current State, Issues, and Prospects; 2023 Nov 1–2; Kharkiv. p. 271–3. [in Ukrainian].
166. Zaychenko G, Gorchakova N, Horbach A, Stan I, Simonov P. Theoretical and experimental justification of development of dermatological medicinal products based on natural compounds of Naftalan oil. *Fitoterapiia. Chasopys – Phytotherapy. Journal*. 2024;3:52–61. doi: 10.32782/2522-9680-2024-3-52.
167. Zeichner JA, Armstrong A. The Role of IL-17 in the Pathogenesis and Treatment of Psoriasis. *J Clin Aesthet Dermatol*. 2016 Jun;9(6 Suppl 1):S3-S6.
168. Zhang Y, Dong S, Ma Y, Mou Y. Burden of psoriasis in young adults worldwide from the global burden of disease study 2019. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2024 Feb 13;15:1308822. doi: 10.3389/fendo.2024.1308822.
169. Zhou X, Chen Y, Cui L, Shi Y, Guo C. Advances in the pathogenesis of psoriasis: from keratinocyte perspective. *Cell Death Dis*. 2022 Jan 24;13(1):81. doi: 10.1038/s41419-022-04523-3.
170. Zou A, Kong Q, Sang H. Identification of key apoptosis-related genes and immune infiltration in the pathogenesis of psoriasis. *Hereditas*. 2022 Jun 22;159(1):26. doi: 10.1186/s41065-022-00233-0.

ДОДАТКИ

Додаток А. Акти впровадження результатів роботи в науковий обіг та практичну діяльність

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Перший проректор
Полтавського державного медичного
університету
доктор медичних наук, професор
Валентин ДВОРНИК

«12» лютого 2025 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

- 1. Назва пропозиції для впровадження:** Результати дослідження, проведеного в рамках дисертаційної роботи «Експериментальне обґрунтування доцільності розробки нового крему на основі очищеного нафталанового масла для лікування дерматологічних захворювань»
- 2. Установа, її адреса, виконавці:** кафедри фармакології Національного медичного університету імені О. О. Богомольця, 01601, м. Київ, бульвар Шевченка, 13, аспірантка Горбач Анна Олександрівна.
- 3. Джерела інформації:** Фрагмент науково-дослідної роботи: «Фармакологічне дослідження м'яких лікарських форм на основі нафтопродуктів для терапії дерматологічних захворювань» (номер державної реєстрації № 0123U101124)
 - Zaychenko G., Gorchakova N., Horbach A., Stan I., Simonov P. (2024). Teoretychne y eksperymentalne obgruntuvannya rozrobky dermatolohichnykh likarskykh zasobiv na osnovi pryrodnykh spoluk naftalanskoï nafty [Theoretical and experimental justification of development of dermatological medicinal products based on natural compounds of Naftalan oil]. Fitoterapiia. Chasopys – Phytotherapy. Journal, 3, 52–61, doi: <https://doi.org/10.32782/2522-9680-2024-3-52>
 - Horbach AO, Zaychenko GV. Comparative assessment of the effectiveness of new cream test samples with refined naftalan oil on an experimental model of psoriasis. Farmatsevychnyi Zhurnal. 2024;(6):61-72. doi:10.32352/0367-3057.6.24.05.
 - Зайченко ГВ, Горбач АО. Експериментальне обґрунтування механізму протизапальної дії очищеного нафталанового масла. Здобутки клінічної і експериментальної медицини. 2025;(1(61)). doi: 10.11603/1811-2471.2025.v.i1.15125.
- 4. Де і коли впроваджено:** в освітньо-науковий процес кафедри фармакології Полтавського державного медичного університету з «12» лютого 2025 р.
- 5. Результат впровадження:** Встановлені дисертанткою наукові положення містять результати експериментального дослідження що дозволяє розширити наукові уявлення про фармакологічні і токсикологічні властивості, механізми дії очищеного нафталанового масла, а також перспективи його використання у фармацевтичній розробці нових м'яких лікарських форм для топічного застосування як допоміжної речовини з покращеними фармакологічними та фармацевтичними властивостями в складі комбінованих лікарських засобів для лікування дерматологічних захворювань.
- 6. Зауваження та пропозиції:** не вносилися.
Обговорено та затверджено на засіданні кафедри фармакології Полтавського державного медичного університету, протокол №12 від «12» лютого 2025 р.

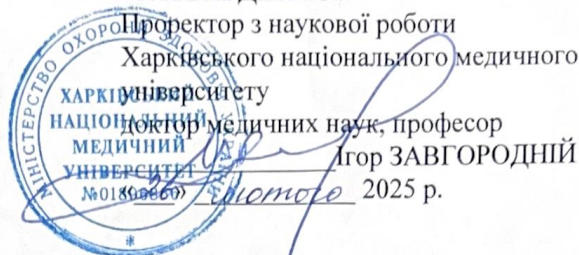
Відповідальний за впровадження:
Завідувач кафедри фармакології
д. мед. н., професор



Р.В. Луценко

Продовження додатку А

«ЗАТВЕРДЖУЮ»



Проректор з наукової роботи
Харківського національного медичного
університету
доктор медичних наук, професор
Ігор ЗАВГОРОДНІЙ
2025 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Назва пропозиції для впровадження:** Результати дослідження, проведеного в рамках дисертаційної роботи «Експериментальне обґрунтування доцільності розробки нового крему на основі очищеного нафталанового масла для лікування дерматологічних захворювань»
2. **Установа, її адреса, виконавці:** кафедри фармакології Національного медичного університету імені О. О. Богомольця, 01601, м. Київ, бульвар Шевченка, 13, аспірантка Горбач Анна Олександрівна.
3. **Джерела інформації:** Фрагмент науково-дослідної роботи: «Фармакологічне дослідження м'яких лікарських форм на основі нафтопродуктів для терапії дерматологічних захворювань» (номер державної реєстрації № 0123U101124)
 - Zaychenko G., Gorchakova N., Horbach A., Stan I., Simonov P. (2024). Teoretychne y eksperymentalne obgruntuvannya rozrobky dermatologichnykh likarskykh zasobiv na osnovi pryrodnykh spoluk naftalanskoj nafty [Theoretical and experimental justification of development of dermatological medicinal products based on natural compounds of Naftalan oil]. Fitoterapiia. Chasopys – Phytotherapy. Journal, 3, 52–61, doi: <https://doi.org/10.32782/2522-9680-2024-3-52>
 - Horbach AO, Zaychenko GV. Comparative assessment of the effectiveness of new cream test samples with refined naftalan oil on an experimental model of psoriasis. Farmatsevtichnyi Zhurnal. 2024;(6):61-72. doi:10.32352/0367-3057.6.24.05.
 - Зайченко ГВ, Горбач АО. Експериментальне обґрунтування механізму протизапальної дії очищеного нафталанового масла. Здобутки клінічної і експериментальної медицини. 2025;(1(61)). doi: 10.11603/1811-2471.2025.v.i1.15125.
4. **Де і коли впроваджено:** в освітньо-науковий процес кафедри фармакології та медичної рецептури при проведенні практичних занять за темою «Протизапальні, протиалергічні засоби» 2025 - 2026 рр.
5. **Результат впровадження:** Встановлені дисертанткою наукові положення містять результати експериментального дослідження що дозволяє розширити наукові уявлення про фармакологічні і токсикологічні властивості, механізми дії очищеного нафталанового масла, а також перспективи його використання у фармацевтичній розробці нових м'яких лікарських форм для топічного застосування як допоміжної речовини з покращеними фармакологічними та фармацевтичними властивостями в складі комбінованих лікарських засобів для лікування дерматологічних захворювань.
6. **Ефективність впровадження за критеріями, висловленими в джерелі інформації (п.3)** Впровадження в освітньо-науковий процес дерматологічної мазі на основі нафтопродуктів розширює знання і надає компетентностей в оволодінні практичними навичками
7. **Зауваження та пропозиції:** не вносилися.

Обговорено та затверджено на засіданні кафедри фармакології та медичної рецептури Харківського національного медичного університету, протокол № 15 від 26.02.2025 р.

Відповідальний за впровадження:

Завідувачка кафедри фармакології та медичної рецептури
д. фарм. н., професор

Тамара ЄРМОЛЕНКО

Продовження додатку А

«ЗАТВЕРДЖУЮ»
 Професор кафедри науково-педагогічної,
 навчальної роботи та якості освіти
 Запорізького державного медико-
 фармацевтичного університету, доцент
 Євгенія МОРДУНЦОВА

«04» лютого 2025 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Назва пропозиції для впровадження:** Результати дослідження, проведеного в рамках дисертаційної роботи «Експериментальне обґрунтування доцільності розробки нового крему на основі очищеного нафталанового масла для лікування дерматологічних захворювань»
2. **Установа, її адреса, виконавці:** кафедри фармакології Національного медичного університету імені О. О. Богомольця, 01601, м. Київ, бульвар Шевченка, 13, аспірантка Горбач Анна Олександрівна.
3. **Джерела інформації:** Фрагмент науково-дослідної роботи: «Фармакологічне дослідження м'яких лікарських форм на основі нафтопродуктів для терапії дерматологічних захворювань» (номер державної реєстрації № 0123U101124)
 - Zaychenko G., Gorchakova N., Horbach A., Stan I., Simonov P. (2024). Teoretychne y eksperymentalne obgruntuvannya rozrobky dermatolohichnykh likarskykh zasobiv na osnovi pryrodnykh spoluk naftalanskoï nafty [Theoretical and experimental justification of development of dermatological medicinal products based on natural compounds of Naftalan oil]. Fitoterapiia. Chasopys – Phytotherapy. Journal, 3, 52–61, doi: <https://doi.org/10.32782/2522-9680-2024-3-52>
 - Horbach AO, Zaychenko GV. Comparative assessment of the effectiveness of new cream test samples with refined naftalan oil on an experimental model of psoriasis. Farmatsevychnyi Zhurnal. 2024;(6):61-72. doi:10.32352/0367-3057.6.24.05.
 - Зайченко ГВ, Горбач АО. Експериментальне обґрунтування механізму протизапальної дії очищеного нафталанового масла. Здобутки клінічної і експериментальної медицини. 2025;(1(61)). doi: 10.11603/1811-2471.2025.v.i1.15125.
4. **Де і коли впроваджено:** в освітньо-науковий процес кафедри фармакології та медичної рецептури з курсом нормальної фізіології Запорізького державного медико-фармацевтичного університету з «04» лютого 2025 р.
5. **Результат впровадження:** Встановлені дисертанткою наукові положення містять результати експериментального дослідження що дозволяє розширити наукові уявлення про фармакологічні і токсикологічні властивості, механізми дії очищеного нафталанового масла, а також перспективи його використання у фармацевтичній розробці нових м'яких лікарських форм для топічного застосування як допоміжної речовини з покращеними фармакологічними та фармацевтичними властивостями в складі комбінованих лікарських засобів для лікування дерматологічних захворювань.
6. **Зауваження та пропозиції:** не вносилися.
 Обговорено та затверджено на засіданні кафедри фармакології та медичної рецептури з курсом нормальної фізіології Запорізького державного медико-фармацевтичного університету, протокол № 2 від «04» лютого 2025 р.

Відповідальний за впровадження:

Завідувач кафедри фармакології та медичної
 рецептури з курсом нормальної фізіології
 д. біол. н., професор



І.Ф. Бєленічев

Продовження додатку А

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з науково-педагогічної та
навчальної роботи Вінницького
національного медичного університету
імені М.І. Пирогова
доктор медичних наук, професор
Андрушко І.І.



Березня 2025 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

- 1. Назва пропозиції для впровадження:** Результати дослідження, проведеного в рамках дисертаційної роботи «Експериментальне обґрунтування доцільності розробки нового крему на основі очищеного нафталанового масла для лікування дерматологічних захворювань»
- 2. Установа, її адреса, виконавці:** кафедри фармакології Національного медичного університету імені О. О. Богомольця, 01601, м. Київ, бульвар Шевченка, 13, аспірантка Горбач Анна Олександрівна.
- 3. Джерела інформації:** Фрагмент науково-дослідної роботи: «Фармакологічне дослідження м'яких лікарських форм на основі нафтопродуктів для терапії дерматологічних захворювань» (номер державної реєстрації № 0123U101124)
 * Zaychenko G., Gorchakova N., Horbach A., Stan L., Simonov P. (2024). Teoretychne y eksperymentalne obgruntuvannya rozrobky dermatologichnykh likarskykh zasobiv na osnovi pryrodnykh spoluk naftalanskoï nafty [Theoretical and experimental justification of development of dermatological medicinal products based on natural compounds of Naftalan oil]. Fitoterapiia. Chasopys – Phytotherapy. Journal, 3, 52–61, doi: <https://doi.org/10.32782/2522-9680-2024-3-52>
 * Horbach AO, Zaychenko GV. Comparative assessment of the effectiveness of new cream test samples with refined naftalan oil on an experimental model of psoriasis. Farmatsevychnyi Zhurnal. 2024;(6):61-72. doi:10.32352/0367-3057.6.24.05.
 * Зайченко ГВ, Горбач АО. Експериментальне обґрунтування механізму протизапальної дії очищеного нафталанового масла. Здобутки клінічної і експериментальної медицини. 2025;(1(61)). doi: 10.11603/1811-2471.2025.v.i1.15125.
- 4. Де і коли впроваджено:** в освітньо-науковий процес кафедри фармакології Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова з «січня» 2025 р.
- 5. Результат впровадження:** Встановлені дисертанткою наукові положення містять результати експериментального дослідження що дозволяє розширити наукові уявлення про фармакологічні і токсикологічні властивості, механізми дії очищеного нафталанового масла, а також перспективи його використання у фармацевтичній розробці нових м'яких лікарських форм для топічного застосування як допоміжної речовини з покращеними фармакологічними та фармацевтичними властивостями в складі комбінованих лікарських засобів для лікування дерматологічних захворювань.
- 6. Зауваження та пропозиції:** не вносилися.
Обговорено та затверджено на засіданні кафедри фармакології Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова, протокол № 7 від «14» березня 2025 р.

Відповідальний за впровадження:
Завідувачка кафедри фармакології
д. мед. н., професор

Убова

Н.І. Волощук

Продовження додатку А

«ЗАТВЕРДЖУЮ»



Проректор з науково-педагогічної роботи
Одеського національного медичного
університету, д. мед. н., професор

Світлана КОТЮЖИНСЬКА

Січня 2025 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Назва пропозиції для впровадження:** Результати дослідження, проведеного в рамках дисертаційної роботи «Експериментальне обґрунтування доцільності розробки нового крему на основі очищеного нафталанового масла для лікування дерматологічних захворювань»
2. **Установа, її адреса, виконавці:** кафедри фармакології Національного медичного університету імені О. О. Богомольця, 01601, м. Київ, бульвар Шевченка, 13, аспірантка Горбач Анна Олександрівна.
3. **Джерела інформації:** Фрагмент науково-дослідної роботи: «Фармакологічне дослідження м'яких лікарських форм на основі нафтопродуктів для терапії дерматологічних захворювань» (номер державної реєстрації № 0123U101124)
 - Zaychenko G., Gorchakova N., Horbach A., Stan I., Simonov P. (2024). Teoretychne y eksperymentalne obgruntuvannya rozrobky dermatolohichnykh likarskykh zasobiv na osnovi pryrodnykh spoluk naftalanskoi nafty [Theoretical and experimental justification of development of dermatological medicinal products based on natural compounds of Naftalan oil]. Fitoterapiia. Chasopys – Phytotherapy. Journal, 3, 52–61, doi: <https://doi.org/10.32782/2522-9680-2024-3-52>
 - Horbach AO, Zaychenko GV. Comparative assessment of the effectiveness of new cream test samples with refined naftalan oil on an experimental model of psoriasis. Farmatsevychnyi Zhurnal. 2024;(6):61-72. doi:10.32352/0367-3057.6.24.05.
 - Зайченко ГВ, Горбач АО. Експериментальне обґрунтування механізму протизапальної дії очищеного нафталанового масла. Здобутки клінічної і експериментальної медицини. 2025;(1(61)). doi: 10.11603/1811-2471.2025.v.i1.15125.
4. **Де і коли впроваджено:** в освітньо-науковий процес кафедри загальної і клінічної фармакології та фармакогнозії Одеського національного медичного університету з «23» січня 2025 р.
5. **Результат впровадження:** Встановлені дисертанткою наукові положення містять результати експериментального дослідження що дозволяє розширити наукові уявлення про фармакологічні і токсикологічні властивості, механізми дії очищеного нафталанового масла, а також перспективи його використання у фармацевтичній розробці нових м'яких лікарських форм для топічного застосування як допоміжної речовини з покращеними фармакологічними та фармацевтичними властивостями в складі комбінованих лікарських засобів для лікування дерматологічних захворювань.
6. **Зауваження та пропозиції:** не вносилися.
Обговорено та затверджено на засіданні кафедри фармакології та фармакогнозії Одеського національного медичного університету, протокол №8 від «23» січня 2025р.

Відповідальний за впровадження:

Завідувач кафедри загальної і клінічної
фармакології та фармакогнозії ОНМедУ,
д. мед. н., професор

Ярослав РОЖКОВСЬКИЙ

Додаток Б. Список публікацій здобувача за темою дисертації

Наукові праці, в яких опубліковані основні результати дисертації:

1. Zaychenko G, Gorchakova N, Horbach A, Stan I, Simonov P. Teoretychne y eksperymentalne obgruntuvannya rozrobky dermatologichnykh likarskykh zasobiv na osnovi pryrodnykh spoluk naftalanskoï nafty [Theoretical and experimental justification of development of dermatological medicinal products based on natural compounds of Naftalan oil]. *Fitoterapiia. Chasopys – Phytotherapy. Journal.* 2024;3:52–61. <https://doi.org/10.32782/2522-9680-2024-3-52>.

2. Горбач, А. О., & Зайченко, Г. В. Порівняльна оцінка ефективності нових тест-зразків кремів з очищеним нафталановим маслом на експериментальній моделі псоріазу. *Фармацевтичний журнал.* 2024;(6):61-72. <https://doi.org/10.32352/0367-3057.6.24>.

3. Горбач А.О., Стан І.Ю., Луговський С.П., Зайченко Г.В. Вплив очищеного нафталанового масла у складі топічних препаратів на морфологічні зміни шкіри при експериментальному псоріазі. *Медична наука України* 2025;1 doi:10.32345/2664-4738.1.2025.01

4. Зайченко Г.В., Горбач А.О. Експериментальне обґрунтування механізму протизапальної дії очищеного нафталанового масла. «Здобутки клінічної і експериментальної медицини» №1(61) 2025. doi: 10.11603/1811-2471.2025.v.i1.15125

Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

7. Zaychenko G, Horbach A. Perspective for the development of new medicines based on purified Naftalan oil for the treatment of dermatological diseases. Proceedings of the 15th Congress of the European Association for Clinical Pharmacology and Therapeutics (EACPT) (June 25–28, 2022) Athens, Greece. Springer; 2022:48-49;

8. Зайченко ГВ, Горбач АО, Стан ІЮ. Експериментальне моделювання псоріазоподібного ураження шкіри у інбредних мишей лінії BALB/c: матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю, присвячена 30-річчю заснування Інституту підвищення кваліфікації спеціалістів фармації Національного фармацевтичного університету «Безперервний професійний

розвиток фармацевтичних працівників: сучасний стан, проблеми та перспективи» (1–2 листопад 2023 р.). Харків, НФаУ, 2023:271-273;

9. Зайченко ГВ, Горбач АО. Вивчення протизапальної активності кремів із різною концентрацією очищеного нафталанового масла на моделі карагінанового набряку у щурів. Матеріали науково-практичної конференції з міжнародною участю, присвяченої 25-річчю фармацевтичного факультету «Фармацевтична освіта, наука та практика: стан, проблеми, перспективи розвитку» (19–20 грудня 2023 р.) м. Київ: НМУ імені О.О. Богомольця. 2023:34-36.

10. Зайченко ГВ, Ляпунов МО, Безугла НП, Горбач АО. Модифікація макроскопічної оцінки антипсоріатичної активності топічних дермальних засобів. Матеріали Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю «Сучасна фармація: реалії сьогодення та перспективи розвитку» (9–12 квітня 2024 р.). Одеса, ОНУ, 2024:299-300;

11. Зайченко ГВ, Луговський СП, Горбач АО, Стан ІЮ. Морфологічна оцінка терапевтичної дії нових топічних засобів з очищеним нафталановим маслом при експериментальному псоріазі. Зб. Наук. Робіт за матеріалами Восьмої Всеукраїнської науково-практичної конференції з міжнародною участю «Теорія та практика сучасної морфології». м. Дніпро, 6–8 листопада 2024 р. Дніпро : ДДМУ; 2024:56-57;

12. Зайченко ГВ, Горбач АО, Стан ІЮ, Горчакова Н.О. Ренесанс нафтопрепаратів, що містять очищене нафталанове масло, і обґрунтування перспективи розробки на їх основі антипсоріатичних лікарських засобів. Збірник матеріалів наукового конгресу з міжнародною участю, залученням молодих вчених, студентів «Комплементарна/народна медицина, освіта, культура: від традиційних практик доклінічного дослідження» (13–14 червня 2024р.). Київ, ТНУ імені В.І. Вернадського, 2024:275.