

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
імені В. Н. КАРАЗІНА

Біологічний факультет
Кафедра молекулярної біології та біотехнології
**Розроблення гідрогелів і дослідження їхнього впливу на
швидкість регенерації шкіри**

Допущено до захисту
«__»_____ 2024 р.

Кваліфікаційна робота
студента кафедри
молекулярної біології та біотехнології
Бондаренка Степана Валерійовича

Завідувач кафедри

Оцінка «_____»

Голова ЕК _____

«__»_____ 2024 р.

Науковий керівник:
д.б.н., професор Божков А.І.

АНОТАЦІЯ

Кваліфікаційна робота на тему: «Розроблення гідрогелів і дослідження їхнього впливу на швидкість регенерації шкіри».

Дипломна робота присвячена дослідженню розробки гідрогелів та їх впливу на процес регенерації шкіри. У роботі представлено огляд літератури щодо процесів регенерації та старіння, конструювання гідрогелів та використання гідрогелевих препаратів у випадках шкірної травматизації для покращення процесу регенерації шкіри.

Основна увага приділена створенню потенційного продукту функціонального харчування на основі осадженого казеїну з коров'ячого молозива та витяжки соняшникового шроту, збагаченої поліфенольними сполуками, зокрема хлорогеновою кислотою.

Робота включає 64 сторінки, 2 таблиці, 16 рисунків, 10 додатків, 65 використаних джерел.

Ключові слова: *гідрогелі, регенерація, старіння, соняшниковий шрот, поліфеноли, хлорогенова кислота, казеїн, функціональне харчування.*

ABSTRACT

Qualification work on the topic: “Development of hydrogels and research of their influence on the rate of skin regeneration”.

The thesis is devoted to the research of hydrogels development and their influence on the skin regeneration process. The work presents a literature review on the processes of regeneration and aging, the design of hydrogels and the use of hydrogel preparations in cases of skin trauma to improve the process of skin regeneration.

The article focuses on the creation of a potential functional food product based on precipitated casein from cow colostrum and sunflower meal extract enriched with polyphenolic compounds, in particular chlorogenic acid.

The work includes 64 pages, 2 tables, 16 figures, 10 appendices, 65 references.

Keywords: *hydrogels, regeneration, aging, sunflower meal, polyphenols, chlorogenic acid, casein, functional food.*

ЗМІСТ

ВСТУП	7
Розділ 1. ОГЛЯД І АНАЛІЗ НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ	8
1.1. Визначення процесу та характеристика основних факторів регенерації шкіри (вікові аспекти)	8
1.1.1. <i>Гострі та хронічні рани</i>	12
1.1.2. <i>Старіння та його вплив на процес регенерації</i>	15
1.1.3. <i>Подовження фази запалення</i>	18
1.1.4. <i>Окислювальний стрес</i>	19
1.1.5. <i>Неефективна мікроциркуляція</i>	19
1.2. Характеристика гідрогелів та їх класифікація	20
1.3. Області використання у біотехнологіях	23
1.4. Поліфенольні сполуки, як основа для отримання гідрогелів	24
1.4.1. <i>Гідрогелі на основі хлорогенової кислоти</i>	25
1.4.2. <i>Гідрогелі на основі дубильної кислоти</i>	27
1.4.3. <i>Гідрогелі на основі епігалокатехінгалату</i>	27
1.4.4. <i>Гідрогелі на основі лігніну</i>	28
1.4.5. <i>Гідрогелі на основі дофаміну та його похідних</i>	28
1.4.6. <i>Інші гідрогелі на основі поліфенолів</i>	29
1.5. Способи зшивання гідрогелевих структур на основі поліфенолів	29
1.5.1. <i>Ковалентні зшивання</i>	30
1.5.2. <i>Нековалентні зшивання</i>	32
Висновок до розділу 1	33
Розділ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ	34
2.1. Соняшниковий шрот	34
2.2. Характеристика молозива та ізоформи казеїну	34
2.2.1. <i>α_{S1}-казеїн</i>	35
2.2.2. <i>α_{S2}-казеїн</i>	35
2.2.3. <i>β-казеїн</i>	36
2.2.4. <i>κ-казеїн</i>	36
2.3. Методи	37
2.3.1. <i>Отримання поліфенольного комплексу</i>	37
2.3.2. <i>Осадження казеїну</i>	37
2.3.3. <i>Відмивка та спектрофотометрія</i>	38
2.2.4. <i>Статистичний аналіз</i>	39
Висновок до розділу 2	40

Розділ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ	41
3.1. Отримані результати	41
3.1.1. «Зенітка».	41
3.1.2. «Чіта».	43
3.1.3. Підсумок.	45
3.2. Використання гідрогелів в якості продуктів функціонального харчування й метода доставки АФІ	45
3.3. Проблеми досліджень та способи їх вирішення	46
Висновок до розділу 3	47
ВИСНОВКИ	49
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	50
ДОДАТКИ	59

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

MDGF – фактор росту макрофагів (macrophage-derived growth factor)

ПКМ – позаклітинний матрикс

TGF – трансформуючий фактори росту (transforming growth factor)

IL – інтерлейкін (interleukin)

TNF – фактор некрозу пухлини (tumor necrosis factor)

АФК – активні форми кисню

ММР – матричні металопротеїнази

АМП – антимікробні пептиди

PDGF – тромбоцитарний фактор росту (platelet-derived growth factor)

ICAM – молекули міжклітинної адгезії (intercellular adhesion molecule)

VCAM – молекули адгезії судинних клітин (vascular cell adhesion molecule)

ЦОГ – циклооксигеназа

PGE₂ – простагландин E₂ (prostaglandin E₂)

НАДФН - нікотинамідаденіндинуклеотидфосфат

ХК, ХГК – хлорогенова кислота

ДК – дубильна кислота

ЕГКГ – епігалокатехінгалат

PDA – полідофамін

MPN – метал-фенольна мережа (metal-phenolic net)

ВСТУП

Шкіра є найбільшим органом людського тіла і відіграє ключову роль у підтримці гомеостазу та регуляції нормальних фізіологічних процесів: гідратація, захист від хімічних речовин і патогенів, ініціалізація синтезу вітаміну D, виділення та терморегуляція. Пошкодження шкірного покриву в залежності від серйозності ураження може призводити до негативних наслідків: від больового дискомфорту до летальних випадків [1].

В той же час здавна і по сьогодні активно ведуться розробки та дослідження форм препаратів, дія яких спрямована на покращення процесу відновлення шкірного покриву. Однією з таких форм є саме різноманіття гідрогелів – напівтвердих матеріалів, що здатні утримувати немалу кількість води із включеннями активних фармакологічних складників.

Тож, метою даного дослідження є огляд літератури, щодо застосування гідрогелевих препаратів у випадках шкірної травматизації для покращення її подальшої регенерації та часткова розробка потенційного продукту функціонального харчування на основі осадженого казеїну коров'ячого молозива з витяжкою соняшникового шроту, збагаченою поліфенольними сполуками, зокрема хлорогеновою кислотою [2].

Для виконання мети було поставлено такі задачі:

- Оглядово розібрати процес регенерації, зважаючи на вікові аспекти;
- Проаналізувати літературу щодо конструювання гідрогелів, властивостей поліфенолів та білкового складу молозива;
- Привести приклад найпопулярніших поліфенольних сполук, які включають у гідрогелеві матриці та їх вплив на процеси регенерації;
- На практиці довести можливість створення потенційного продукту функціонального харчування на основі ізоформ молозивного казеїну та поліфенольної витяжки з соняшникового шроту.

Розділ 1. ОГЛЯД І АНАЛІЗ НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Визначення процесу та характеристика основних факторів регенерації шкіри (вікові аспекти)

Епітеліальні клітини шкіри є лабільними елементами, які постійно видаляються в роговому шарі через процес десквамації кератиноцитів і замінюються в базальному шарі диференційованими елементами, отриманими в результаті проліферації та диференціювання стовбурових клітин. Оновлення клітин залежить від різних факторів, таких як травма, гормональний вплив, стан шкіри та індивідуальне самопочуття.

Загоєння ран – це багатогранний біологічний процес, який передбачає заміщення пошкоджених тканин і клітинних структур. Цей процес складається з численних фаз (рис. 1.1.), активованих внутрішньо- та міжклітинними біохімічними шляхами та узгоджених для відновлення цілісності тканини та гомеостазу. В цьому процесі залучені клітини: фібробласти, кератиноцити та ендотеліальні клітини, а також нейтрофіли, моноцити, макрофаги, лімфоцити та дендритні клітини як імунні компоненти. Вони в свою чергу відповідальні за процеси коагуляційного каскаду і регуляції запальних шляхів.

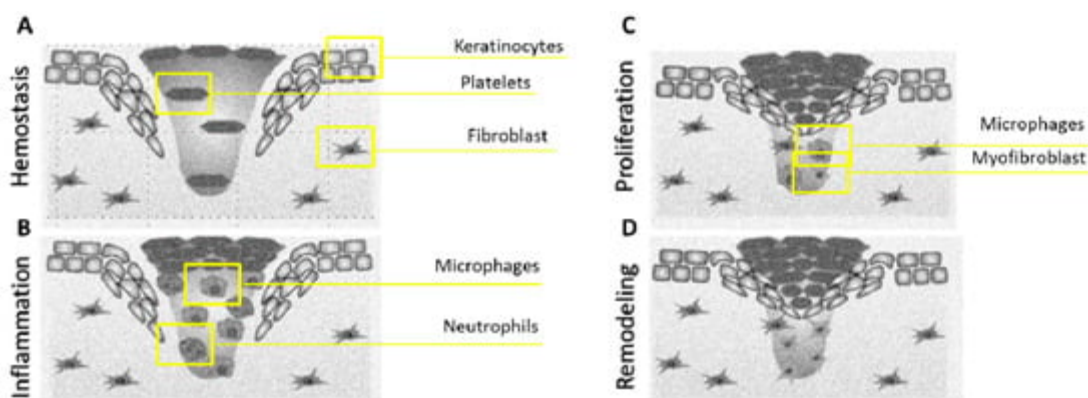


Рис. 1.1. Схематичне зображення процесу загоєння рани з клітинами, які беруть участь у кожній фазі [1].

Процес регенерації включає послідовні фази, які регулюються експресією генів за допомогою аутокринних або паракринних механізмів. Припинення активних процесів досягається глушінням генів під час прогресування процесу регенерації [3]. Загоєння ран є одним із найскладніших процесів в організмі людини, оскільки воно передбачає просторову та часову синхронізацію фази запалення з регенерацією та ремоделюванням тканин. Запальна фаза слідує за пошкодженням і включає в себе каскад коагуляції, запальний шлях і участь імунної системи [4].

Усі ці події мають місце, щоб запобігти надмірній втраті крові, рідини та розвитку інфекцій, а також полегшити видалення мертвої або девіталізованої тканини. Гемостаз досягається утворенням тромбоцитарного згустку з наступним утворенням фібринової матриці, яка діє як каркас для клітинної інфільтрації. В результаті дегрануляції тромбоцитів, виділення хемотаксичних сигналів некротичними тканинами та продуктів розпаду бактерій активується комплементарна система і нейтрофіли надходять до вогнища ураження. Нарешті, макрофаги координують усі події, що відбуваються у відповідь на пошкодження [5]. Ці клітини відповідають за активність фагоцитозу фібрину та клітинного сміття, а також вони секретують фактор росту, отриманий з макрофагів (MDGF) для фібробластів та ендотеліальних клітин. Утворення нової тканини починається протягом двох-десяти днів після ураження і складається з клітинної проліферації та міграції різних цитотипів. Коли ураження охоплює дерму, утворюється малодиференційована та сильно васкуляризована сполучна тканина, яка називається грануляційною тканиною, яка складається з клітинних і фібрилярних компонентів, інтегрованих у очевидно аморфну матрицю. Клітини грануляційної тканини — це фібробласти, відповідальні за синтез фібрилярного компонента; міофібробласти, що беруть участь у механізмі скорочення рани та ендотеліальні клітини, відповідальні за процес неангіогенезу [1, 5].

Процес повторної епітелізації, що характеризується проліферацією та міграцією кератиноцитів у напрямку до основної частини ураження, починається на цій фазі, коли область між дном і краями рани заповнюється грануляційною тканиною. Це являє собою матрицю, в якій кератиноцити, що знаходяться на краях ураження, мігрують і проліферують [4]. Структурну організацію реепітелізації шкіри можна пояснити двома моделями: ковзною та рухомою. Відповідно до ковзної моделі, кератиноцити базального шару зазнають модифікації своїх закріплюючих з'єднань, що дозволяє їх від'єднання та бічну міграцію в центральну частину ураження. Згідно з моделлю прокатки, кератиноцити проходять морфологічну та функціональну модифікацію разом із десмосомами, в результаті чого вони перекочуються до базальних кератиноцитів, які натомість залишаються прикріплені до базальної мембрани. Регенерація базального шару призводить до проліферації та вертикальної диференціації кератиноцитів, відновлюючи фізіологічні особливості багат шарової епітеліальної тканини [1, 6].

Фаза реконструкції починається приблизно через три тижні після появи травми і триває більше року. Під час цієї фази всі процеси, активовані на попередніх фазах, припиняються, а макрофаги, ізольовані ендотеліальні клітини та міофібробласти впадають у стан апоптозу або переміщуються з рани, залишаючи область, багату колагеном та іншими білками відкладення позаклітинного матриксу. Взаємодія між епідермісом і дермою разом із додатковим зворотним зв'язком дозволяє безперервно регулювати цілісність шкіри та гомеостаз. Колаген типу III, розташований в позаклітинному матриксі, поступово замінюється протягом 6-12 місяців [6].

Рубці (рис. 1.2.) є результатом ефективного процесу новоутворення тканин, однак вони не повністю відтворюють характеристики та функції фізіологічної тканини, яку вони замінюють [7]. Будь-яке пошкодження у людини відновлюється за допомогою новоутворення, яке замінює відсутню тканину позаклітинним матриксом, складеним переважно з фібронектину та

колагену типів I і III. Однак є деякі компоненти шкіри, які не можуть бути відновлені після серйозної травми, такі як субепідермальні придатки, волосяні фолікули або залози [8]. Матрикс рубцевої тканини, яка представлена грануляційною тканиною, є кінцевим продуктом і характеризується високою щільністю фібробластів, гранулоцитів, макрофагів, капілярів та колагенових волокон. У первинній фазі рубцювання ангиогенез ще не завершений, проте домінуючими клітинами є фібробласти, які виробляють колаген та компоненти ПКМ, такі як фібронектин, глікозаміноглікани, протеоглікани та гіалуронова кислота. Наприкінці цієї фази кількість фібробластів у фазі дозрівання зменшується через їх диференціацію в міофібробласти.

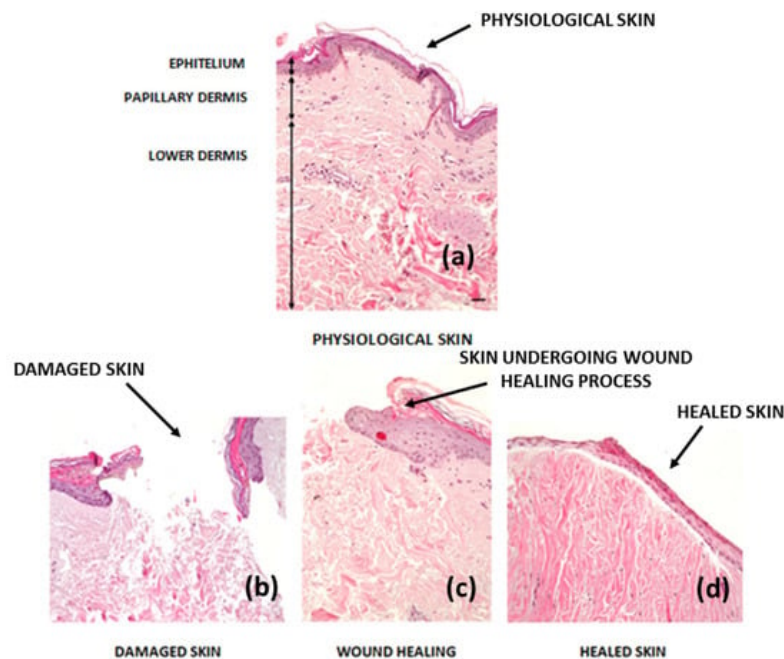


Рис. 1.2. Стадії процесу загоєння рани: (а) фізіологічна шкіра, (б) пошкоджена шкіра, (в) шкіра, яка проходить процес загоєння рани та (г) загоєна шкіра. Гістологічний знімок, гематоксилін-еозин, 10×, стовпчик: 20 мкм, червоні стрілки виділяють названі стадії [1].

Формування рубця завершується у фазі ремоделювання загоєння рани, яка починається на 21-й день і триває протягом 1 року після травми.

Під час дозрівання рани компоненти ПКМ зазнають постійних змін. Колаген типу III, який виробляється у фазі проліферації, тепер замінений найсильнішою формою колагену типу I, який орієнтований у невеликі паралельні пучки, відрізняючись від текстури здорової дерми [8]. Потім міофібробласти викликають скорочення рани завдяки міцному зчепленню з колагеном, сприяючи загоєнню рани. Крім того, зменшуються ангиогенні процеси і кровотік в ложі рани, гостра метаболічна активність рани сповільнюється і з часом припиняється, що призводить до формування зрілого рубця. Утворення рубців є фізіологічною кінцевою точкою загоєння ран у ссавців [9].

1.1.1. Гострі та хронічні рани. Гострі рани, такі як травматичні та хірургічні, проходять через нормальні етапи загоєння, що призводить до очікуваного і організованого відновлення тканин. У зворотному випадку, хронічні рани характеризуються дезорганізованим процесом відновлення і, в основному, можуть бути класифіковані як судинні виразки (наприклад, венозні та артеріальні виразки), діабетичні виразки та пролежні [10]. Хронічні рани проявляють стійку фазу запалення, що призводить до мікроорганізмів, розвитку біоплівки і вивільненню тромбоцитарних факторів, таких як бета-трансформуючий фактор росту (TGF- β) або молекули фрагментів ПКМ.

Каскад прозапальних цитокінів, таких як інтерлейкін-1 β (IL-1 β) і фактор некрозу пухлини α (TNF α), триває протягом тривалого періоду, що призводить до значних рівнів протеаз в рановому ложі. У хронічних ранах рівні протеаз перевищують рівень інгібіторів, що викликає руйнування ПКМ і посилює проліферативну та запальні фази [11]. Запальні клітини, зібрані в ложі хронічної рани, підвищуються до рівня активних форм кисню (АФК), що призводить до пошкодження білка ПКМ і передчасного старіння клітин. Хронічні травми також характеризуються фенотиповими дефектами в клітинах і шкірі, такими як знижена щільність рецепторів фактора росту та мітогенний потенціал, що ускладнює адекватну реакцію резидентних

клітин на сигнали загоєння ран. У той час як протеази жорстко регулюються їх інгібіторами під час гострих травм, уникнення руйнування ПКМ і підтримки фази проліферації. Основні фізичні прояви хронічних ран представлені ексудацією, стійкою інфекцією та некрозом, які відповідають за лікування рани та складність лікування [12].

Рановий ексудат є важливим відображенням фізіологічного стану ранового ложа і представляє собою мікрооточення ураженої тканини. Він може слугувати маркером хронічного стану травми або показником ефективності лікування рани. Зростає кількість доказів того, що деструктивні ефекти, які спостерігаються при хронічних травмах, можуть посилюватися компонентами ексудату. Ці компоненти, будучи корозійними за своєю природою, сприяють безперервній деградації позаклітинного матриксу.

Аналіз ексудату дозволив ідентифікувати металопротеїнази (ММР), зокрема ММР-9, як ключові компоненти в деструктивному процесі. Встановлено, що підвищені рівні ММР-9 корелюють з підвищеним рівнем бактерій у хронічних ранах. Це свідчить про взаємозв'язок між бактеріальною інфекцією та активністю ММР-9 у таких ранах.

Крім того, ексудат може бути першим індикатором можливих системних ускладнень. Передача сигналів медіаторів і вміст білка в ексудаті може надати інформацію про тип тканини, залученої до пошкодження, та допомогти у виборі найбільш відповідного підходу до лікування. Це робить ексудат цінним інструментом для клінічного моніторингу та управління ранами.

Після травми шкіра активує запальний механізм, який не тільки виробляє ексудат, але також стимулює утворення антимікробних пептидів (АМП) у відповідь на інфекцію. АМП є амфіпатичними пептидами, які або конститутивно експресуються, або індуюються після клітинної активації у відповідь на запальну або гомеостатичну стимуляцію. Найбільш ретельно вивченими сімействами АМП у шкірі людини є дефензини та кателіцидини.

Вони виробляються різними клітинами шкіри, такими як кератиноцити, фібробласти, дендритні клітини, моноцити, макрофаги, а також потові та сальні залози.

Доступ бактерій до ураженої ділянки шкіри є неминучим явищем, і іноді імунна відповідь виявляється неефективною, що призводить до ускладнень і навіть смерті у пацієнтів із серйозними хронічними ураженнями шкіри. Здорова шкіра насичена бактеріями, які відіграють важливу роль в її екосистемі. Проте, у разі порушення цілісності шкіри, бактерії мігрують з поверхні шкіри в області, де вони зазвичай не знаходяться, викликаючи дисбаланс, який призводить до інфекції в рані.

Бактерії можуть походити із зовнішнього середовища, наприклад, *Staphylococcus aureus*, або з внутрішніх органів, мігруючи через кров. Додаткову загрозу становить утворення біоплівки – шару мікрооточення, багатого глікопротеїном, який прилипає до ранового ложа, захищаючи бактерії та сприяючи їх розмноженню. Матриця біоплівки робить бактерії толерантними до складних умов і стійкими до антибактеріальних обробок. Це спричиняє широкий спектр хронічних захворювань, і через резистентність бактерій до антибіотиків лікування таких інфекцій стає дуже складним.

Девіталізація та/або некроз виникають, коли інфекція не вирішена або тканина має непоправне пошкодження. Часто поверхневі інфекції прогресують до глибоких шарів тканин, залучаючи кісткову тканину та іноді впливаючи на системні шляхи, що може призвести до генералізованого сепсису та бактеріємії. Некроз шкіри характеризується широким спектром етіології, включаючи зовнішні фактори або, частіше, оклюзію судин.

Некроз - це серйозне захворювання, яке визначається як загибель клітин або тканини з патологічних причин; зазвичай це проявляється як багрянний, синюшний або чорний колір шкіри, і це незворотно. Коли це супроводжується бактеріальною інфекцією та розкладанням, говорять про

гангрену. Основними некротичними інфекціями є: ектіма, бактеріальна інфекція, що викликає виразки та струпи; некротичний фасциит, інфекція, яка викликає швидкий некроз підшкірної жирової клітковини з утворенням сироватки з неприємним запахом; і гостра менінгокоцемія, яка викликає гострий петехіальний висип, який може супроводжуватися екхімозом та ішемічним некрозом.

1.1.2. Старіння та його вплив на процес регенерації. Старіння – це універсальний процес, який може спричинити зниження функції органів і різні захворювання [13]. Найяскравіші наслідки старіння можна помітно побачити на шкірі (рис. 1.3.), яка діє як бар'єр проти різних зовнішніх впливів. Старіння шкіри складається з внутрішніх і зовнішніх процесів, які працюють узгоджено і впливають один на одного.

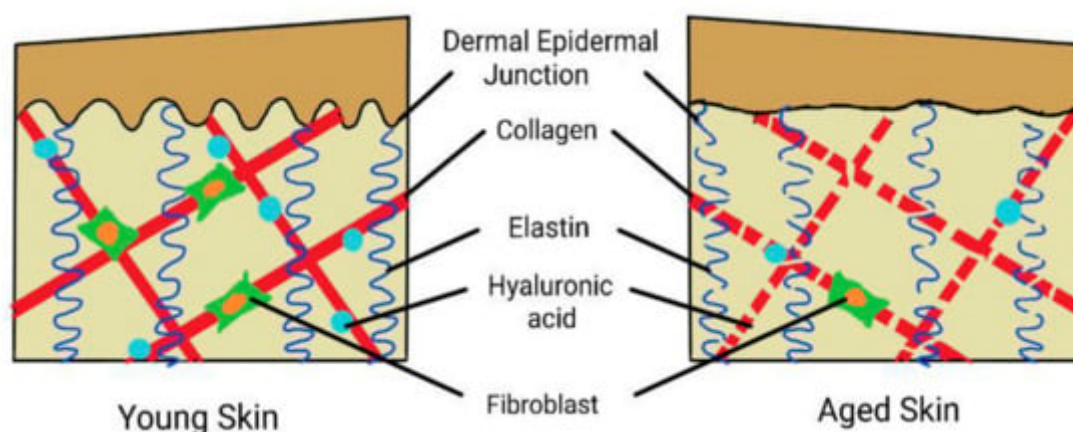


Рис. 1.3. Короткий опис впливу старіння на шкіру. Контакт між дермою та епідермісом сплющений, в дермі зменшена кількість фіброblastів із фрагментацією колагену, зменшенням еластину та виснаженням гіалуронової кислоти [13].

Внутрішнє старіння включає біохімічні дегенеративні процеси, які поступово відбуваються з віком. Зовнішнє старіння — це біохімічні процеси, викликані зовнішніми впливами, які призводять до старіння. У старій шкірі відбуваються значні морфологічні зміни на всіх рівнях, які

глибоко впливають на характеристики шкіри. Незважаючи на те, що шкіра зазнає пошкоджень зовнішніми впливами, вона має здатність загоюватися, щоб відновити свою нормальну структуру та функцію. Проте старіння значно впливає на функцію загоєння шкіри, подовжуючи фазу запалення та збільшуючи виробництво активних форм кисню (АФК). Це зміщує процес загоєння в бік більшої деградації білка, що може призвести до хронічного загоєння рани з великою кількістю ускладнень.

Внутрішнє старіння, також відоме як хронологічне старіння, є біохімічним дегенеративним процесом, що поступово прогресує з віком. Воно характеризується появою гладких, блідої шкіри з тонкими зморшками, зниженою еластичністю та підвищеною сухістю. Внутрішнє старіння найчастіше спостерігається у людей похилого віку та зумовлене генетичними та гормональними факторами, що призводить до значних відмінностей як між різними популяціями, так і серед окремих осіб, а також у різних ділянках тіла в одного індивідуума.

Кортизол, гормон стресу, є основним чинником, що впливає на старіння шкіри. Підвищені рівні кортизолу, що асоціюються зі збільшенням психосоціального стресу та зниженням когнітивних функцій, негативно впливають на білки позаклітинного матриксу, включаючи колаген, протеоглікани та еластин, спричиняючи їх деградацію. Пошкодження ДНК та вкорочення теломер також є ключовими факторами, що обмежують здатність клітин до проліферації.

Щоденні впливи, такі як радіація та хімічні речовини, можуть спричинити пошкодження ДНК. Хоча людський організм має потужні механізми відновлення ДНК, їх ефективність з віком знижується, що призводить до накопичення помилок у ДНК та збільшення генетичної нестабільності. Це може сприяти розвитку канцерогенезу та інших вікових захворювань.

Вкорочення теломер є ще однією основною причиною вікових захворювань та передчасного старіння. Теломери, розташовані на кінцях

хромосом, захищають їх та підтримують геномну стабільність. Однак, соматичні клітини людини не здатні подовжувати теломери через відсутність теломерази. З кожним поділом клітини теломери вкорочуються, і коли досягається критична точка, клітини вступають у фазу реплікативного старіння, відому як «ліміт Хейфліка», що обмежує їхню здатність до поділу. Це призводить до значних змін у структурі та функціях шкіри.

Зовнішнє старіння включає біохімічні процеси, спричинені зовнішніми факторами, а не генетичними особливостями людини. Воно зазвичай проявляється глибокими зморшками, грубою текстурою, тьмяністю, плямистою гіперпігментацією та втратою еластичності шкіри. Це явище може спостерігатися навіть у молодих людей і прогресує швидше, ніж внутрішнє старіння.

Основні причини зовнішнього старіння — це фактори навколишнього середовища, механічні впливи та спосіб життя. До основних екологічних факторів належать ультрафіолетове випромінювання та забруднення повітря. Механічні впливи включають напругу м'язів, що веде до пластичності тканин. Також важливими є фактори способу життя, такі як дієта, режим сну та куріння.

Одним з найбільш значущих факторів зовнішнього старіння є фотостаріння, спричинене безперервним незахищеним впливом сонячного випромінювання. Воно найбільш помітне на відкритих ділянках тіла, таких як обличчя, шия, руки та ноги. Приблизно 80% старіння шкіри обличчя пов'язане з впливом ультрафіолетових променів. Ступінь сонячного опромінення визначає масштаб і ступінь фотостаріння шкіри.

Крім того, куріння цигарок значно прискорює старіння шкіри, головним чином впливаючи на еластин. Зменшення еластину веде до втрати еластичності тканин, що проявляється чітким візерунком періоральних зморшок і гостро окресленими гусячими лапками, відомими як "обличчя курця".

1.1.3. Подовження фази запалення. Баланс між запаленням і його контролем є важливим для підтримки нормального процесу загоєння ран [14]. Це пов'язано з тим, що гостре запалення на ранній стадії загоєння рани сприяє видаленню залишків клітин і патогенів. Однак, якщо стан запалення тривалий, це призведе до подальшого руйнування сусідніх клітин і, зрештою, загальмує загоєння рани. Старіння змушує більше тромбоцитів прилипати до пошкодженого епітелію. Це призведе до вироблення більшої кількості прозапальних цитокінів, таких як PDGF, TGF- β і TGF- α . У відповідь на їх вивільнення нейтрофіли швидко залучаються до місця пошкодження. Одночасно моноцити також будуть залучатися до місця пошкодження. Однак, оскільки моноцити мають більший розмір, їм потрібні специфічні адгезивні молекули, такі як ICAM-1 і VCAM-1, щоб експресуватися на поверхні ендотелію, щоб проникнути в місце пошкодження. У віковій шкірі ці молекули адгезії значно знижені, і це погіршує інфільтрацію моноцитів. Таким чином, буде менша кількість моноцитів [14, 15], здатних проникнути та дозріти в макрофаги в місці пошкодження.

Виснаження макрофагів спричиняє погіршення процесу загоєння ран шляхом зменшення утворення грануляційної тканини та ангиогенезу, а також порушення синтезу колагену та фактору росту. Є також менше макрофагів, альтернативно активованих, що є вирішальним для переходу від запальної фази до проліферативної фази. Як тільки макрофаги альтернативно активуються, він буде виробляти IL-10 і зменшувати вироблення IL-12. Це зупинить запалення і почне відновлення тканин. У той же час пошкодження тканин також збільшить вироблення прозапальних цитокінів, які активують шлях ЦОГ. Це призведе до збільшення виробництва PGE2. Це спричинить запальну реакцію, яка ще більше руйнує сусідні клітини та затримує процес загоєння. Крім того, PGE2 також відіграє інгібіторну роль у фібробластах. Це пригнічує синтез колагену

фібробластами та порушує фазу проліферації. Т-клітинна інфільтрація також затримується в старій шкірі, але наслідки ще невідомі [16].

1.1.4. Окислювальний стрес. Активні форми кисню (АФК) також відіграють важливу роль у процесі загоєння ран [17]. Вони виробляються нейтрофілами та макрофагами через НАДФН-оксидазу та допомагають у знищенні мікробів та запобіганні інфекції рани. Вони також відіграють роль вазоконстриктора, допомагаючи зменшити кровотік і сприяти утворенню тромбу незабаром після травми. Для переходу в проліферативну фазу також необхідний окислювальний стрес. Низька кількість АФК позитивно впливає на загоєння ран, тоді як тривалий вплив АФК негативно впливає на процес загоєння ран [18]. Збільшене виробництво АФК, таких як оксид азоту та супероксид-аніони, збільшить пошкодження тканин і погіршить загоєння. У віковій шкірі через тривале запалення накопичується більше АФК. Отже, це подовжить стан окисного стресу. Тривалий стан окислювального стресу також посилить перекисне окислення ліпідів і сприятиме розпаду білків і пошкодженню ДНК, що, у свою чергу, погіршить загоєння ран через посилений апоптоз клітин і старіння [19]. Це значно погіршить проліферативну фазу і подовжить процес загоєння рани.

1.1.5. Нефективна мікроциркуляція. Старіюча шкіра зазвичай має пошкодження та порушення росту кровоносних судин. Як тільки мікроциркуляція порушується, відбуваються зміни у запальній відповіді через зменшення кількості клітин запалення та хімічних медіаторів, здатних досягти місця пошкодження [16]. Крім того, це також означає, що в місці пошкодження спостерігається відносна гіперперфузія, що призводить до меншої кількості поживних речовин і кисню для підтримки процесу загоєння рани. Це порушення кровопостачання також може призвести до гіпоксії, яка викликає загибель клітин через апоптоз і некроз. Тимчасова гіпоксія важлива в процесі загоєння ран, оскільки вона може стимулювати вивільнення цитокінів і факторів росту, щоб індукувати клітинну

проліферацію, міграцію, а також ангиогенез [18]. Однак тривалий стан гіпоксії негативно позначиться на процесі загоєння рани.

1.2. Характеристика гідрогелів та їх класифікація

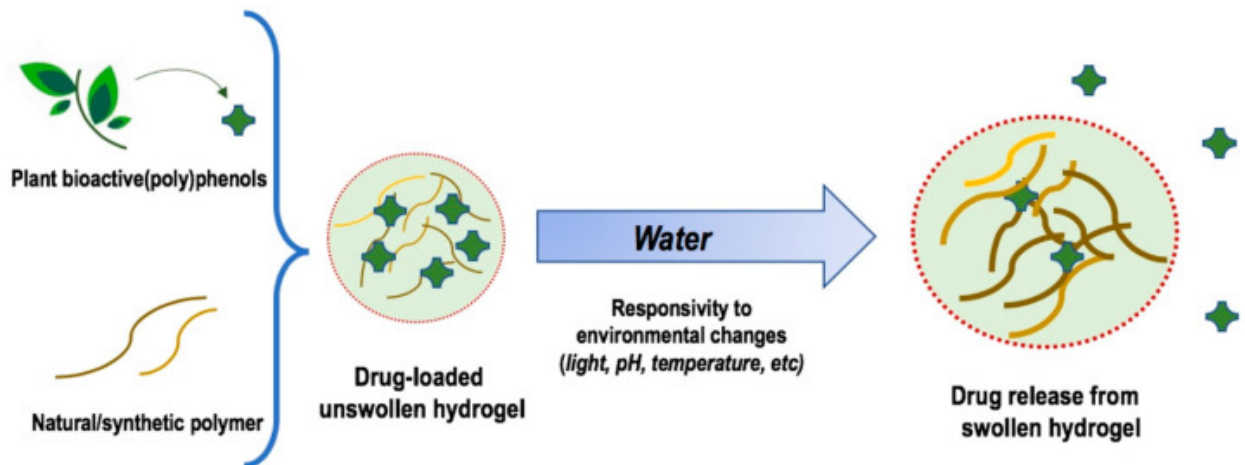


Рис. 1.4. Наповнені (полі)фенолом гідрогелі як розумні системи доставки ліків [21].

Гідрогелі — це м'які тривимірні матеріали, здатні набухати у водному середовищі та утримувати велику кількість води, не розчиняючись [21]. Вони також визначаються як напівтверді системи, які за своїми властивостями нагадують природну живу тканину. По суті, гідрофільний і гіперрозгалужений полімерний ланцюг відповідає за властивості адсорбції води, тоді як мережа поперечних зв'язків запобігає солюбілізації та надає стабільності отриманій системі.

Людське тіло здебільшого складається із води (60-65% від загальної маси), тому завдяки своїй фізичній схожості з тканинами людини гідрогелі спочатку використовувалися як субстрати для клітинних культур і ранові пов'язки, а з появою та розвитком тканинної інженерії їх почали використовувати для відновлення та регенерації тканин і органів. Останніми роками, завдяки перетину та злиттю біомедицини та матеріалознавства, з'явилися різноманітні гідрогелеві системи, які

використовуються для доставки ліків, виготовлення біосенсорів та біовізуалізації.

Гідрогелі можна класифікувати:

- За складом полімерного «скелету»:
 - Природні (основою є зазвичай полісахариди та поліпептиди; високо біосумісні, біорозкладні, але наділені поганими механічними властивостями);
 - Синтетичні (поліакрилова кислота чи поліакриламід; більш стабільні, але можуть бути цитотоксичними);
 - Ко-полімерні (розроблені відповідно до вимог біосумісності та механічної міцності бажаних ГГ);
 - Гомо- або мультиполімерні;
- За розміром:
 - Мікрогелі (від 1 мкм до 100 нм);
 - Наногелі (<100 нм);
 - Квазінаногелі (трохи більше 100 нм);
- За типом конфігурації молекул:
 - Кристалічні;
 - Напівкристалічні;
 - Аморфні;
- За типом заряду:
 - Нейонні (нейтральні);
 - Йонні (аніони чи катіони);
 - Амфотерний електроліт (містить кислотні та основні групи);
 - Цвіттеріонні (в кожній структурній одиниці мають аніонні та катіонні групи);
- За формою:
 - Матриці;
 - Плівки;

- Мікросфери;

Для вибору гелевої основи важливим чинником є дисперсність активного фармацевтичного інгредієнта та його фізико-хімічні властивості. Спосіб введення АФІ в основу, швидкість, порядок, час змішування, температурний режим є також важливими чинниками, що у подальшому також зумовлюють параметри технологічного процесу, оскільки впливають на реологічні властивості, стабільність під час зберігання, однорідність, консистенцію і фармакотерапевтичну ефективність гелю [22].

Функціональні особливості ідеального гідрогелевого матеріалу можна перерахувати наступним чином:

- Найбільша поглинальна здатність (максимальне рівноважне набухання) у фізіологічного розчину;
- Бажана швидкість поглинання (бажаний розмір частинок і пористість) залежить від вимог застосування;
- Найвища вбираюча здатність під навантаженням;
- Найменший розчинний вміст і залишковий мономер;
- Найнижча ціна;
- Найвища міцність і стійкість в середовищі набухання і при зберіганні;
- Найвища здатність до біологічного розкладання без утворення токсичних речовин після розкладання;
- рН-нейтральність після набухання у воді;
- Безбарвність, відсутність запаху, абсолютна нетоксичність;
- Фотостабільність;
- Здатність до повторного змочування (за потреби) гідрогель має бути здатним віддавати ввібраний розчин або підтримувати його; залежно від вимог застосування (наприклад, у сільськогосподарських або гігієнічних застосуваннях) [23].

Очевидно, що неможливо, щоб зразок гідрогелю одночасно відповідав всім перерахованим вище необхідним характеристикам. Фактично, синтетичні компоненти для досягнення максимального рівня деяких із цих пунктів призведуть до неефективності решти. Тому на практиці виробничі змінні повинні бути оптимізовані таким чином, щоб досягнути належного балансу між властивостями. Наприклад, гігієнічні продукти з гідрогелів повинні володіти найвищою швидкістю поглинання, найменшим повторним змочуванням і найменшим залишковим мономером, а гідрогелі, що використовуються для доставки ліків, повинні бути пористими та реагувати на рН або температуру.

1.3. Області використання у біотехнологіях

Ми вже встигли згадати, що гідрогелі можуть використовувати за основу для створення гігієнічних продуктів, але лише космецевтичною сферою їх застосування не обмежується. Тож розглянувши їх властивості можна й розглянути найуспішніші сфери їх використання.

Гідрогелі широко застосовуються:

- Як каркаси для створення тривимірних структур, що підтримують ріст і диференціацію клітин, де можуть забезпечити необхідне середовище для культивування та стимулювати утворення нових тканин, включаючи технології 3D-біопринтингу: вони можуть мати контрольовані пористість і механічні властивості [24, 25];
- Як транспортні системи для доставки лікарських засобів чи навіть цілих клітин до уражених ділянок організму: гідрогелі здатні інкапсулювати лікарські речовини і вивільняти їх у контрольованому режимі, що дозволяє забезпечити стабільну концентрацію лікарського засобу у місці дії протягом тривалого часу, що є особливо корисним при лікуванні хронічних захворювань чи довготривалих терапіях [24];

- Як складові біосенсорів, де вони виступають селективними елементами для виявлення біомолекул; завдяки своїй здатності до набухання у відповідь на зміни в хімічному складі навколишнього середовища, гідрогелі можуть бути частиною чутливих елементів у пристроях для моніторингу різних біомаркерів [26];

- Як матриці для іммобілізації ферментів, що підвищує їх стабільність і активність у промислових процесах. Це дозволяє створювати ефективні біокатализатори для виробництва хімічних речовин, харчових продуктів і фармацевтичних препаратів [27];

- Як фільтри для вилучення токсичних речовин, важких металів та органічних забруднювачів з води завдяки високій гідрофільності і здатності до адсорбції;

- Як акумулятори води з добривами для підтримки вологості та родючості ґрунтів у посушливих регіонах.

1.4. Поліфенольні сполуки, як основа для отримання гідрогелей

Термін *поліфеноли* вказує на групу хімічних речовин, які мають ароматичне кільце, що містить один або більше гідроксильних замісників або груп, з функціональними побічними продуктами (складні ефіри, метилові ефіри, глікозиди тощо). Сімейство поліфенолів являє собою один із найбільш поширених і широко вивчених класів молекул, які зазвичай поширені в царстві рослин. Ці сполуки є вторинними метаболітами рослин і відіграють роль у привабленні запилювачів, захисті від ультрафіолетового випромінювання та захисті рослин від мікробів і травоядних тварин. Цей клас сполук включає незліченну кількість дуже різноманітних фенольних структур, включаючи досить малі молекули, такі як фенольні кислоти, а також складні полімеризовані молекули. Поліфеноли вважаються основним класом фітохімічних речовин із корисними властивостями.

На даний момент було доведено, що поліфеноли мають хороші антиоксидантні, антибактеріальні, протипухлинні, імунорегуляторні, протирадіаційні та інші позитивні аспекти. Водночас вони мають високу сумісність з організмом людини, тому останніми роками знайшли широке застосування в харчовій, медичній, зокрема регенеративній, і косметичній галузях [28].

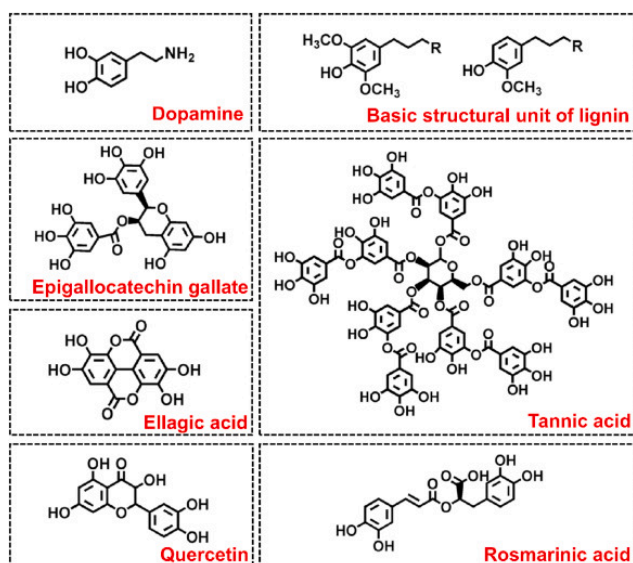


Рис 1.5. Типові поліфенольні компоненти гідрогелів [23].

На сьогоднішній день ідентифіковано понад 8000 молекул поліфенолів [29], і деякі з них, отримані з природних джерел, були безпосередньо використані або модифіковані для створення гідрогелевих систем на основі поліфенолів (рис. 1.5.).

1.4.1. Гідрогелі на основі хлорогенової кислоти. Хлорогенова кислота (ХК), яка є активним компонентом кави та чорниці, відома своїми потужними фармакологічними властивостями, такими як протипухлинна, протизапальна, імунорегулююча та антиоксидантна дії. Останні дослідження підкреслюють перспективний потенціал ХК у лікуванні ран, де вона стимулює міграцію та проліферацію фібробластів і кератиноцитів, а також сприяє синтезу колагену та еластину [30].

Однак, клінічне застосування ХК обмежене через її низьку біодоступність та стабільність, оскільки вона швидко метаболізується та виводиться з організму, що призводить до короткого періоду напіввиведення і низького системного впливу. Останнім часом зростає інтерес до розробки гідрогелевих систем, збагачених ХК, для покращення загоєння ран та у сфері тканинної інженерії.

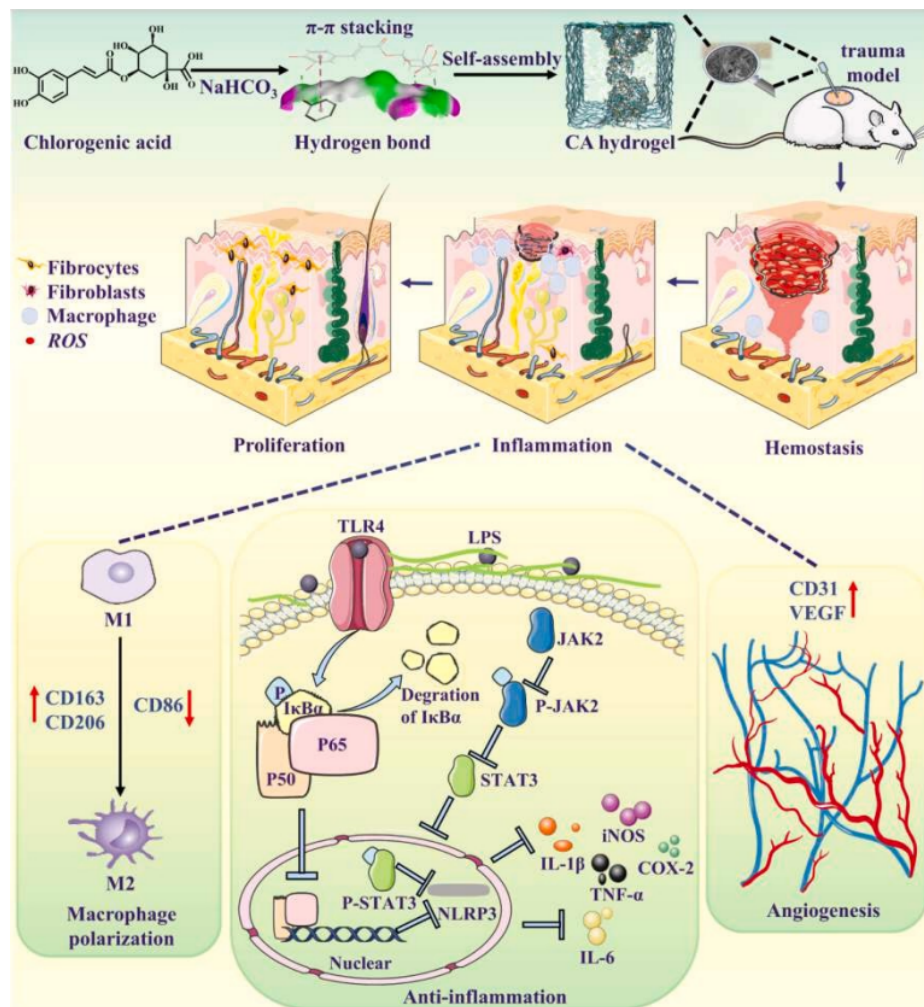


Рис. 1.6. Схема утворення самозбірного гідрогелю хлорогенової кислоти (ХК). Гідрогель ХК може ефективно прискорювати загоєння ран шляхом модуляції поляризації макрофагів від фенотипу M1 до фенотипу M2, пригнічуючи запалення та сприяючи ангиогенезу [31].

В свою чергу, у дослідженні [31] китайська команда вчених розробила гідрогель шляхом самоскладання хлорогенової кислоти у розчині з додаванням гідрокарбонату натрію (NaHCO_3) під впливом ультразвуку.

Розроблений гідрогель тестували щурах лінії *Sprague Dawley* шляхом його нанесення на ексцизійні рани. ХК гідрогель проявив гарну цитосумісність, сприяючи проліферації та міграції клітин; продемонстрував чудові протизапальні властивості та значно прискорив швидкість загоєння ран.

1.4.2. Гідрогелі на основі дубильної кислоти. Дубильна кислота (ДК) є поліфенольною сполукою природного походження, що забезпечує захист рослин від комах, патогенів та ультрафіолетового випромінювання [32].

Дослідження функціональних гідрогелів на основі ДК стало однією з актуальних тем у сфері дослідження поліфенольних гідрогелів. На відміну від маломолекулярного дофаміну, молекула ДК містить десять поліфенольних груп і має значно більшу молекулярну масу, що дозволяє їй безпосередньо брати участь у зшиванні гідрогелів без додаткової полімеризації або поєднання з іншими полімерними матеріалами. Найпоширенішим методом зшивання в гідрогелях на основі ДК є водневі зв'язки. На основі цих зв'язків також проводилися дослідження з впровадження координаційних взаємодій між ДК та іонами металів або ДК-боронатної взаємодії, щоб покращити властивості самовідновлення та механічну міцність гідрогелів [33]. Крім того, ДК має багато фармакологічних властивостей, таких як антиоксидантна, антибактеріальна та протизапальна дія, що робить гідрогелі на її основі дуже ефективними для загоєння ран [34].

1.4.3. Гідрогелі на основі епігалокатехінгалату. Дослідження показали, що регулярне вживання зеленого чаю приносить багато переваг, таких як профілактика раку, зниження рівня ліпідів у крові та зміцнення імунітету, головним чином завдяки вмісту поліфенолів [35]. У зеленому чаї міститься понад 30 поліфенолів у значній кількості, серед яких епігалокатехінгалат (ЕГКГ) займає провідне місце. Завдяки численним біологічним властивостям і відмінній біосумісності, ЕГКГ також використовується для створення багатьох гідрогелевих платформ [36]. З точки зору механізму зшивання, гідрогелі на основі ЕГКГ в основному

формується шляхом ковалентного зшивання, оскільки низька молекулярна маса EGCG ускладнює утворення тривимірної (3D) мережевої структури лише шляхом нековалентного зшивання [37].

1.4.4. Гідрогелі на основі лігніну. Лігнін є другим за кількістю відновлюваним органічним ресурсом на Землі, який широко зустрічається в ксилемі рослин і забезпечує їх жорсткість [38]. Лігнін представляє собою клас дуже складних тривимірних полімерів, структура яких подібна до поліфенолів, з великою кількістю ароматичних кілець із фенольними гідроксильними та метоксиловими групами. Однак кожна ароматична одиниця зазвичай містить лише одну фенольну гідроксильну групу, що означає, що природний лігнін не має виражених поліфенольних властивостей. Проте, шляхом деметилювання можна отримати численні поліфенольні одиниці, надаючи лігніну властивості, характерні для поліфенолів [39].

Завдяки окислювально-відновним реакціям між лігніном та іонами металів високої валентності, персульфат амонію може спричинити утворення вільних радикалів, що призводить до полімеризації мономерів, таких як акрилова кислота та гідроксіетилакриламід, без використання ініціатора [39, 40]. Крім того, зважаючи на багаті ресурси та низьку вартість лігніну, гідрогелі, отримані з цього матеріалу, мають хороші перспективи для широкомасштабного виробництва та застосування.

1.4.5. Гідрогелі на основі дофаміну та його похідних. Дофамін є найбільш поширеним нейромедіатором катехоламіну в мозку людини, який бере участь у регуляції різних функцій, включаючи рух, пізнання, емоції тощо [41]. Будучи низькомолекулярною поліфенольною сполукою з дуже простою структурою, дофамін часто використовують як будівельний блок для побудови більш складних поліфенольних гідрогелевих платформ. Дофамін може самополімеризуватися в полідофамін (PDA) з чудовою адгезивністю, здатністю до модифікації та біосумісністю в слабких лужних умовах, який може самостійно збиратися в наночастинки PDA або

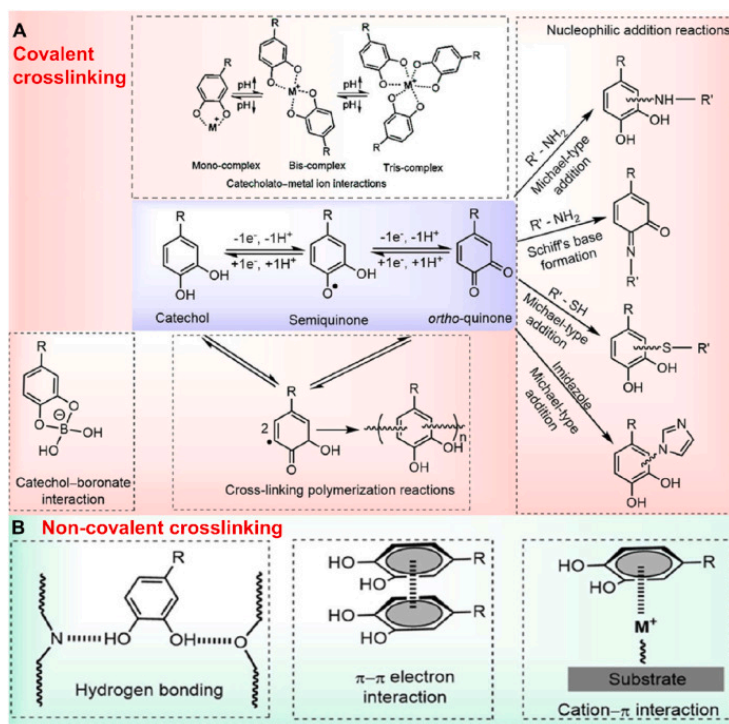
прикріплюватися до поверхні інших наноматеріалів, утворюючи покриття PDA [42]. Введення цих наноматеріалів на основі PDA в гідрогелі може збільшити адгезію, в'язкість і міцність системи. Тим часом ці наноматеріали також можна використовувати для доставки ліків і контрольованого вивільнення, а також для фототермічної терапії, тому вони мають широкий спектр біомедичних застосувань і перспектив розвитку. Крім того, враховуючи, що дофамін та його похідні мають типові катехолові групи без додаткових груп, їх можна з'єднати з класичними гідрогелевими матеріалами, такими як гіалуронова кислота та хітозан, за допомогою простої реакції заміщення, що може покращити адгезію та зміцнити гідрогелеві системи шляхом полімеризації. На сьогодні гідрогелі на основі дофаміну та його похідних є найбільш широко вивченими та застосовуваними поліфенольними гідрогелями.

1.4.6. Інші гідрогелі на основі поліфенолів. Окрім звичайних гідрогелів на основі поліфенолів згаданих вище, у виробництві гідрогелів використовуються також інші природні джерела поліфенолів, включаючи елагову кислоту, кверцетин, розмаринову кислоту, проантоціанідини, кармінову кислоту та тригідрат рутину [43, 44, 45]. Ці гідрогелі, як правило, мають ряд біологічних властивостей, таких як антибактеріальна, антиоксидантна та імуномодулююча дія, а також характеризуються хорошою біосумісністю та оптимізованими механічними властивостями. Завдяки цим характеристикам, такі гідрогелі мають високу дослідницьку цінність і перспективи для біомедичних застосувань.

1.5. Способи зшивання гідрогелевих структур на основі поліфенолів

Однією з найважливіших складових у приготуванні гідрогелів є формування 3D мережевих структур шляхом зшивання, яке визначає їхні властивості. Завдяки різноманітним взаємодіям, що можуть забезпечувати поліфеноли, гідрогелі на основі поліфенолів із 3D-структурами можуть

утворюватися шляхом фізичного та/або хімічного зшивання в різних формах. Представлені механізми зшивання гідрогелів на основі катехолу узагальнено на рис. 1.7. Різні методи зшивання створюють численні структури гідрогелів на основі поліфенолів, що надає більше можливостей для комбінування композицій для побудови гідрогелевих платформ на основі поліфенолів. Це також додатково розширює властивості та діапазони застосування таких гідрогелів [23].



Мал. 1.7. (А) Ковалентні та (В) нековалентні механізми зшивання гідрогелів на основі катехолу [23].

1.5.1. Ковалентні зшивання. До реакцій ковалентного зшивання гідрогелів на основі поліфенолів можна віднести:

- Реакції полімеризації: катехол (C₆H₄(OH)₂) може бути окислений до *o*-хінону в присутності окислювачів, які можуть утворювати димери шляхом самоз'єднання або реакції з іншими катехолами, а також поступово полімеризуватися в олігомери та/або полімери [46, 47]. Подібним чином, пірогалол також може бути окислений і додатково зшитий. Як дуже поширений метод зшивання, полімеризація катехолу

забезпечує стабільну та міцну основу для багатьох гідрогелів на основі катехолу [48];

- Реакції нуклеофільного приєднання: після окислення катехолової групи до хінону електрофільну сполучену систему легко можуть атакувати молекули, що містять нуклеофільні функціональні групи (такі як аміно- та тіолові), а потім генерувати заміщені бензохінонові сполуки за допомогою реакцій приєднання Міхаеля [49]. Крім того, може статися так, що атоми азоту нуклеофільної амінної сполуки атакують карбонільні атоми вуглецю, а потім дегідратуються з утворенням основ Шиффа. Умови реакцій є м'якими та простими в експлуатації, тому їх широко використовують для подальшої модифікації поліфенолів [50]. Поступово до зшивання гідрогелевої системи на основі поліфенолу почали впроваджувати реакції приєднання/основи Міхаеля, що підвищило міцність гідрогелів і уможливило зшивання поліфенолу з більшою кількістю молекул, що значно розширило дизайнерські ідеї;
- Взаємодія поліфенолу з йоном металу: поліфеноли можуть утворювати кисневий центр з високою електронною щільністю після депротонування, який може координуватися з катіонами металів [51]. У той же час, оскільки поліфеноли є різновидом полідентатних лігандів, вони можуть виробляти набагато сильніший координаційний ефект, ніж монодентатні ліганди. Коли велика кількість іонів металу бере участь у координації з поліфенолами, поліфенольна мережа з іонами металу як точка з'єднання може бути сформована під назвою метал-фенольна мережа (MPN). Завдяки хорошій адгезії, простому процесу підготовки та легкості подальшої модифікації покриття MPN широко використовується для модифікації поверхні різних речовин. У багатьох гідрогелевих платформах на основі поліфенолів координація іонів поліфенолу та металу також використовується при виготовленні гідрогелів як свого роду режим зшивання, а введення іонів металу також може надати гідрогелевій системі особливі властивості [52];

- Поліфенол-боронатна взаємодія: борна кислота може утворювати динамічні циклічні складні ефіри з молекулами на основі діолів і, отже, може утворювати комплексоутворення з поліфенолом [53]. Поліфенол-боронатне комплексоутворення здатне утворюватися при рН вище рКа поліфенолу та руйнуватися нижче його рКа, таким чином володіючи властивістю реагувати на рН. Багато досліджень використовували поліфенол-боронатну взаємодію для відповідної доставки протипухлинного препарату бортезомібу, враховуючи його властивість реагувати на рН. У галузі дослідження гідрогелю поліфенол-боронатну взаємодію також використовують для участі в утворенні зшивання гідрогелю. Крім того, за допомогою динамічної поліфенол-боронатної взаємодії поліфенольні групи можуть бути вибірково приховані або оголені за різних умов рН, таким чином досягаючи рН-залежної оборотної адгезії гідрогелів, яка має дуже широку перспективу застосування [54, 55].

1.5.2. *Нековалентні зшивання.* До взаємодій, що забезпечують нековалентне зшивання можна віднести:

- Водневий зв'язок: найбільшою характеристикою поліфенолів є те, що вони містять велику кількість фенольних гідроксильних груп, що визначає, що вони дуже легко утворюють велику кількість водневих зв'язків один з одним та іншими молекулами, що містять гідроксильні та аміногрупи [56]. Таким чином, водневий зв'язок є найпоширенішим способом зшивання в більшості гідрогелевих систем на основі поліфенолів. Водневий зв'язок слабший, ніж ковалентний, але сильніший, ніж сила Ван-дер-Ваальса. Враховуючи, що він може руйнуватися і формуватися оборотно, це часто пов'язують із самовідновленням і деякими механічними властивостями гідрогелів. Крім того, водневий зв'язок, утворений між поліфенолами та молекулами води, може збільшити гідрофільність гідрогелів, що сприяє покращенню біосумісності гідрогелів на основі поліфенолів [57];

- π - π стекінг: π - π стекінг-взаємодія є особливим просторовим розташуванням між багатими π -електронами ароматичними сполуками, а поліфеноли містять велику кількість ароматичних кільцевих структур, тому вони можуть утворювати широкий діапазон π - π взаємодії. У гідрогелевих системах на основі поліфенолів укладання π - π є таким же важливим, як і водневий зв'язок у відновлюваних нековалентних взаємодіях [58]. Як донорні зв'язки, вони можуть розсіювати енергію та вносити значний внесок у підтримку еластичності та властивостей самовідновлення гідрогелів;
- Катіон- π зв'язок: Катіон- π зв'язок може утворюватися через електростатичну та поляризаційну взаємодію між катіонами та багатими на π -електронами ароматичними сполуками [59]. Ці взаємодії поширені в біологічних системах і беруть участь у стабілізації білкових структур, взаємодії білок-нуклеїнова кислота тощо. У гідрогелях на основі поліфенолів міцність катіонного π зв'язку подібна до водневого зв'язку, який відіграє важливу роль у сприянні адгезії та когезії гідрогелів. Багато біоміметичних адгезивних матеріалів на основі катехолових та амінофрагментів були розроблені з використанням цього принципу та показали сильнішу адгезію, ніж катехолові групи окремо [60].

Висновок до розділу 1

Отже, в цьому розділі було розглянуто основні аспекти процесу шкірної регенерації, пройшло ознайомлення з поняттям «гідрогелі», найбільш дослідженими їх поліфенольними складовими для покращення загоєння ран та способами їх зв'язування.

Розділ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

2.1. Соняшниковий шрот

Соняшниковий шрот є побічним продуктом виробництва соняшникової олії із багатим вмістом білка: близько 30-50% у розрахунку на суху речовину. Також соняшниковий шрот містить поліфеноли – близько 2-3%. На частку хлорогенової кислоти припадає більше 50% усіх поліфенольних сполук соняшникового шроту. [2, 61].

2.2. Характеристика молозива та ізоформи казеїну

Молозиво – рідина, що виділяється молочними залозами ссавців у перші дні лактації і досить суттєво відрізняється від звичайного молока.

Як молозиво, так і молоко містять антитіла гуморальної імунної системи та клітини, які, як відомо, функціонують у клітинній імунній системі, включаючи Т-клітини, В-клітини та макрофаги, але насамперед вони відрізняються набагато більшим вмістом ліпідів у молозиві а також концентраціями основних молочних білків.

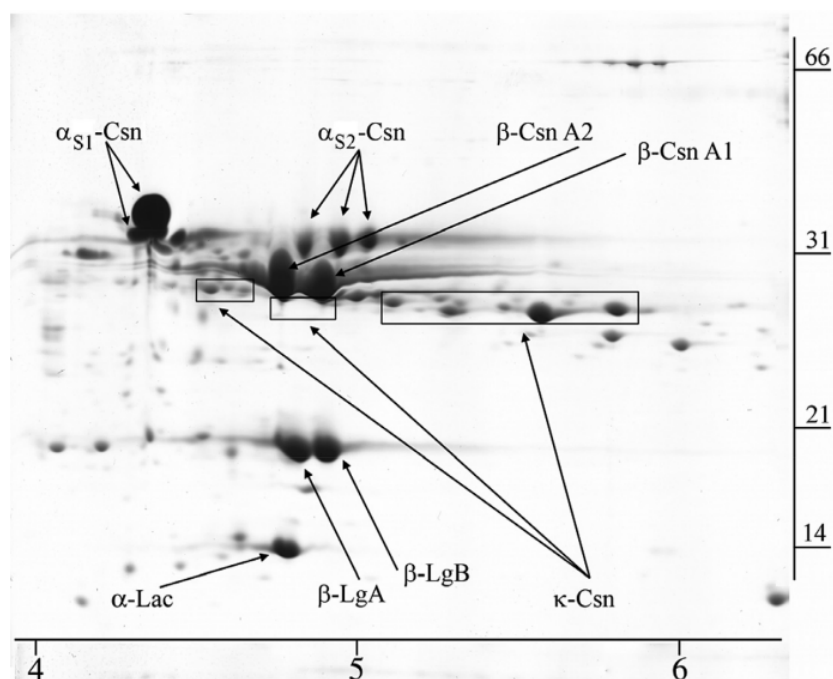


Рис. 2.1. 2-D гель коров'ячого молока із демонстрацією основних форм білків [63].

Білки казеїнового комплексу (рис. 2.1.) коров'ячого молока включають чотири окремих білки: α_{S1} -, α_{S2} -, β -казеїн та κ -казеїни. Ці білки відрізняються за своєю первинною структурою і складають приблизно 37%, 10%, 35% та 15% від загальної кількості казеїну відповідно, проте наприклад співвідношення β -казеїну до κ -казеїну в молозиві становить 0,61, порівняно з 0,30 у зрілому молоці [2, 62].

В експерименті використовувалося молозиво другої лактації двох корів: «Зенітки» та «Чіти» породи «Українська чорно-біла», що живуть на фермі «Альфа» в Золочівському районі Харківської області; збеігалорсь у морозильній камері за температури -18°C не більше місяця.

2.2.1. α_{S1} -казеїн. Білок α_{S1} -казеїн є одним з основних компонентів казеїнового комплексу в молоці ссавців, зокрема корів. α_{S1} -казеїн складається приблизно з 199 амінокислотних залишків, молекулярна маса близько 23-25 кДа. Існує кілька генетичних варіантів (ізоформ) α_{S1} -казеїну, які відрізняються по послідовності амінокислот. Найпоширенішими є В, С, і D ізоформи. α_{S1} -казеїн є високофосфорильованим білком, що містить від 8 до 9 залишків фосфорної кислоти, зв'язаних з сериновими залишками. Цей білок відіграє ключову роль у формуванні казеїнових міцел. Казеїнові міцели стабілізуються за рахунок взаємодії між фосфокальцієвими комплексами і білковими молекулами [63].

2.2.2. α_{S2} -казеїн. Цей білок також є важливим компонентом казеїнового комплексу в молоці. α_{S2} -казеїн складається приблизно з 207 амінокислотних залишків, молекулярною масою близько 25 кДа. α_{S2} -казеїн є дуже фосфорильованим білком, містить від 10 до 13 залишків фосфорної кислоти, зв'язаних з сериновими залишками. Це робить його одним з найбільш фосфорильованих білків в молоці. α_{S2} -казеїн разом з іншими казеїнами (α_{S1} , β , і κ -казеїнами) формує казеїнові міцели, які стабілізуються за рахунок взаємодій між фосфокальцієвими комплексами і білковими молекулами[63].

2.2.3. *β*-казеїн. Один з чотирьох основних казеїнів, що містяться в коров'ячому молоці, містить 209 амінокислотних залишків у дуже гнучкому та динамічному поліпептидному ланцюзі з молекулярною масою 24 кДа. *β*-казеїн містить як гідрофільні, так і гідрофобні ділянки вздовж свого поліпептидного ланцюга, що робить його амфифільною молекулою. Унікальна структурна організація молекул в казеїну робить їх особливо придатними для розробки природних нанотехнологій доставки гідрофобних та амфифільних сполук [63, 64].

2.2.4. *κ*-казеїн. Зрілий білок складається з одного ланцюга з 169 амінокислот і має теоретичну молекулярну масу 19 037 Да. *κ*-казеїн не містить кластерів фосфосерину і, ймовірно, відіграє невелику роль у зв'язуванні кальцію. Його головною особливістю є змінний ступінь глікозилювання. Жвавий інтерес до *κ*-казеїну в основному зумовлений його ключовою роллю як стабілізатора структури міцели (рис. 2.2.).

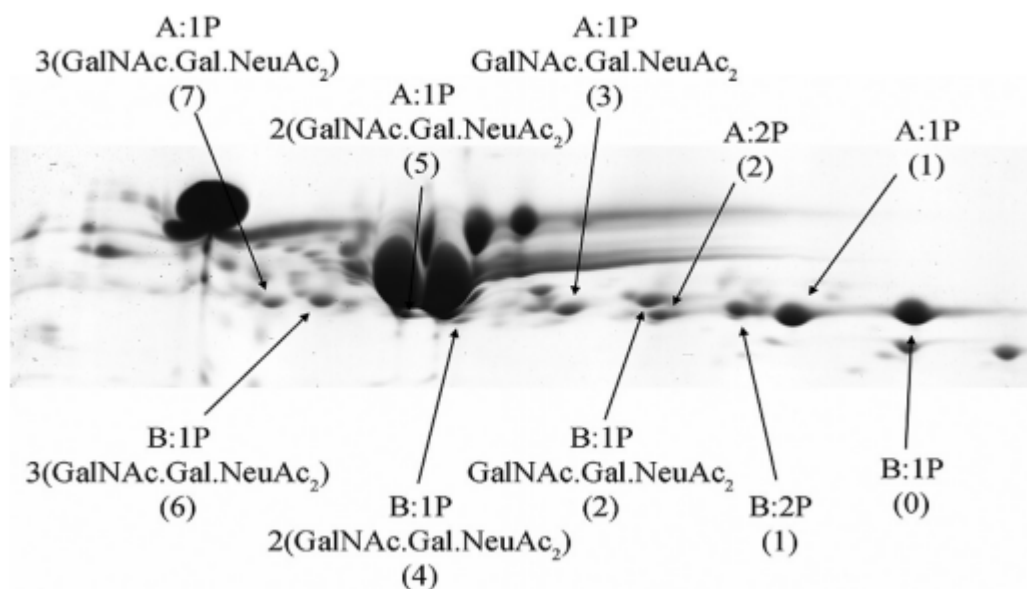


Рис 2.2. Гетерогенність *κ*-казеїну в коров'ячому молоці. Двовимірний гель, що демонструє кілька форм *κ*-казеїну. Вказано генетичний варіант, кількість фосфатних залишків і ступінь глікозилювання. Цифри в дужках вказують на додаткові негативно заряджені залишки відносно *κ*-казеїну [63].

к-казеїн відіграє ключову роль у стабільності міцел, діючи як міцеліальний шар, який забезпечує як стеричне, так і електростатичне відштовхування між міцелами, запобігаючи агрегації. Глікозилування к-казеїну збільшує як розмір гідрофільних С-кінцевих «волосків», так і їх заряд через основну масу гідрофільних залишків цукру з їх гідратними оболонками та негативний заряд груп нейрамінової кислоти відповідно. Теоретично, чим вищий ступінь глікозилування к-казеїну, тим більшою має бути його стабілізуюча здатність. Таким чином, можна очікувати, що ступінь глікозилування к-казеїну матиме помітний вплив як на розмір, так і на стабільність міцел казеїну [63].

2.3. Методи

2.3.1. Отримання поліфенольного комплексу. Поліфенольна витяжка збагачена хлорогеновою кислотою добувалась шляхом трикратної водної екстракції соняшникового шроту у співвідношенні 1:9 (50 г шроту, 450 мл води) по 2-3 хв при постійному перемішуванні. Отримані розчини в подальшому були об'єднані і сконцентровані на роторному випарювачі, із подальшим визначенням вмісту сухих речовин.

2.3.2. Осадження казеїну. Попередньо розморожене молозиво знежирювали шляхом центрифугування (ЦЛС-31М) при 3000 об/хв 2 рази по 15 хв. Далі знежирене молозиво поділили на 4 зразки по 250 мл і додавали різні кількості поліфенольного концентрату з водою (табл. 2.1.) помішуючи вручну протягом 5 хв.

Таблиця 2.1.

**Варіанти внесення поліфенольного концентрату в знежирене
молозиво до виділення казеїну**

Var.	Об'єм молозива, мл	Об'єм води, мл	Об'єм концентрату, мл
1	250	11	0
2	250	0	11
3	250	5,5	5,5
4	250	8,3	2,7

До кожного варіанту було додано ще по 250 мл води, після чого кожен зразок на магнітній мішалці доводився до значення рН 4,6 1Н розчином оцтової кислоти (рис 2.3.). Отримані розчини утримували спочатку 1 год при кімнатній температурі (20°C), а потім ще 30 хв у холодильній камері (7-8°C).



Рис. 2.3. Процес зміщення ізоелектричної точки знежиреного молозива шляхом поступового додавання 1Н розчину оцтової кислоти.

2.3.3. Відмивка та спектрофотометрія. Після відстоювання зразки знову центрифугували для відділення осаджених казеїнових міцел від

сироватки із подальшим їх зважуванням, а саму сироватку із розведенням в 2 рази піддавали спектральному аналізу 200-400 нм для контролю вмісту поліфенолів та білків (спектрофотометр SHIMADZU UV-2600, Японія). Також визначалася суха маса речовин в надосадовій сироватці (сушка в термошафі, в чашках протягом доби, 45-50°C).

Отримані казеїнові осадки промивалися 2 рази: у кожен зразок додавалося 100 мл води із ручним перемішуванням 5-7 хв (рис 2.4).



Рис 2.4. Процес відмивання дистильованою водою осаджених зразків казеїну.

Після кожної промивки зразки центрифугувалися при 3000 об/хв по 15 хв. В надосадових рідинах вимірювали спектр поглинання і вміст сухих речовин. Після двох промивок казеїнові осадки були висушені в термошафі з вентиляцією при 45-50°C протягом двох діб із подальшим виміром їх маси.

Для визначення різноманітності поліфенолів отриманий раніше концентрат також піддавався спектральному аналізу при розведенні 1:200.

2.2.4. Статистичний аналіз. Кінцеві дані у вигляді маси висушених казеїнових осадків представлені як групові середні та стандартні помилки ($\bar{x} \pm SE$). Аналіз даних проводили за допомогою Excel 2013 (Microsoft Corporation., США).

Висновок до розділу 2

Отже, в цьому розділі були оглядово проаналізовані застосовані в експериментальній роботі матеріали, а також наведена детальна методика проведення експерименту з отримання казеїн-поліфенольного гідрогелю.

Розділ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Отримані результати

В ході екстрації поліфенольної витяжки із соняшникового шроту було отримано концентрат із сухим вмістом 133 г/л.

В ході спектрального аналізу було встановлено, що концентрат мав досить велике різноманіття поліфенольних сполук, що поглинали світло в діапазоні 300-340 нм, проте найвищі піки поглинання спостерігалися в зоні 315-320 нм (рис. 3.1.)

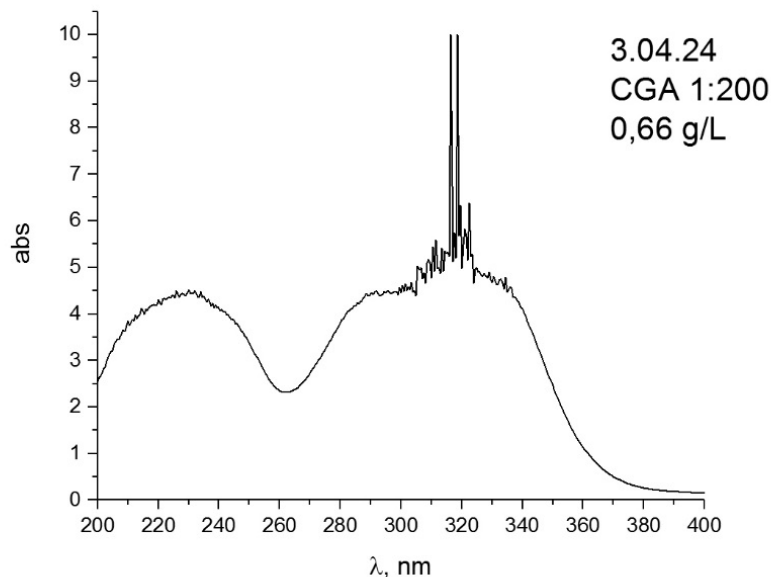


Рис. 3.1. Спектри поглинання поліфенольних сполук у водному розчині в діапазоні від 300 до 340 нм при концентрації 0,66 г/л.

3.1.1. «Зенітка». Під час осадження казеїну «Зенітки» до центрифугування всі зразки залишались відносно однорідними, чіткого розділення фаз не спостерігалось. Варіант №1 без внесення поліфенольної витяжки залишився надто пухким та водянистим навіть після центрифугування, тож його було виключено з подальшого аналізу. В свою чергу варіанти №2-4 проявили пряму залежність якості осадження казеїнових міцел від вмісту поліфенолів (ХГК): варіанти №2 та №3 після центрифугування мали досить щільний білий осад, а надосадова рідина була

жовтуватого напівпрозорого кольору; варіант №4 мав пухкий водянистий осад та білувато-жовтий колір (рис. 3.2. (а)).

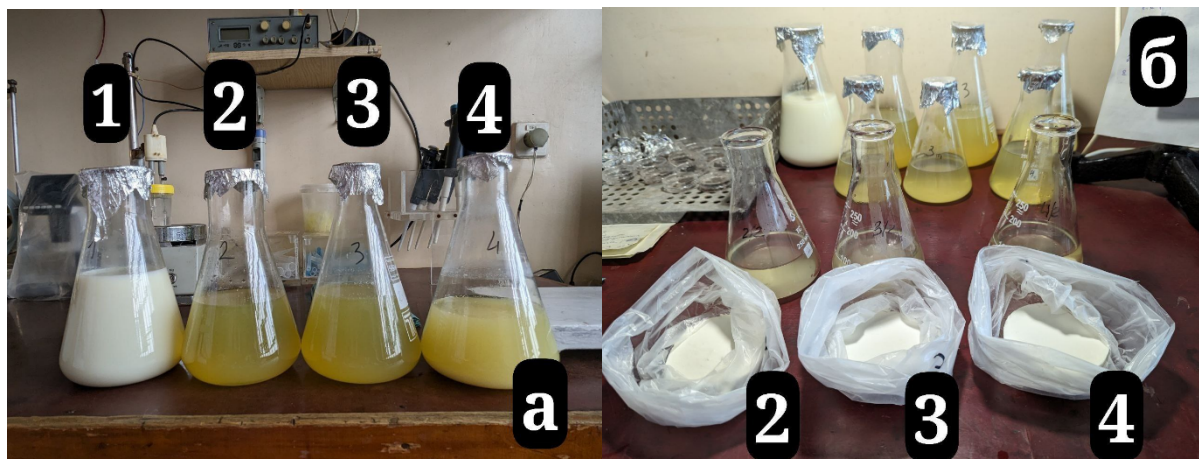


Рис. 3.2. (а) Надосадові рідини після осадження казеїну молозива «Зенітки». (б) Осаджений казеїн молозива «Зенітки» після двох промивок.

Із кожною відмивкою казеїновий осад ставав все щільнішим, а надосадова рідина містила все менше сухого залишку, що можна відслідкувати за рис. 3.3.

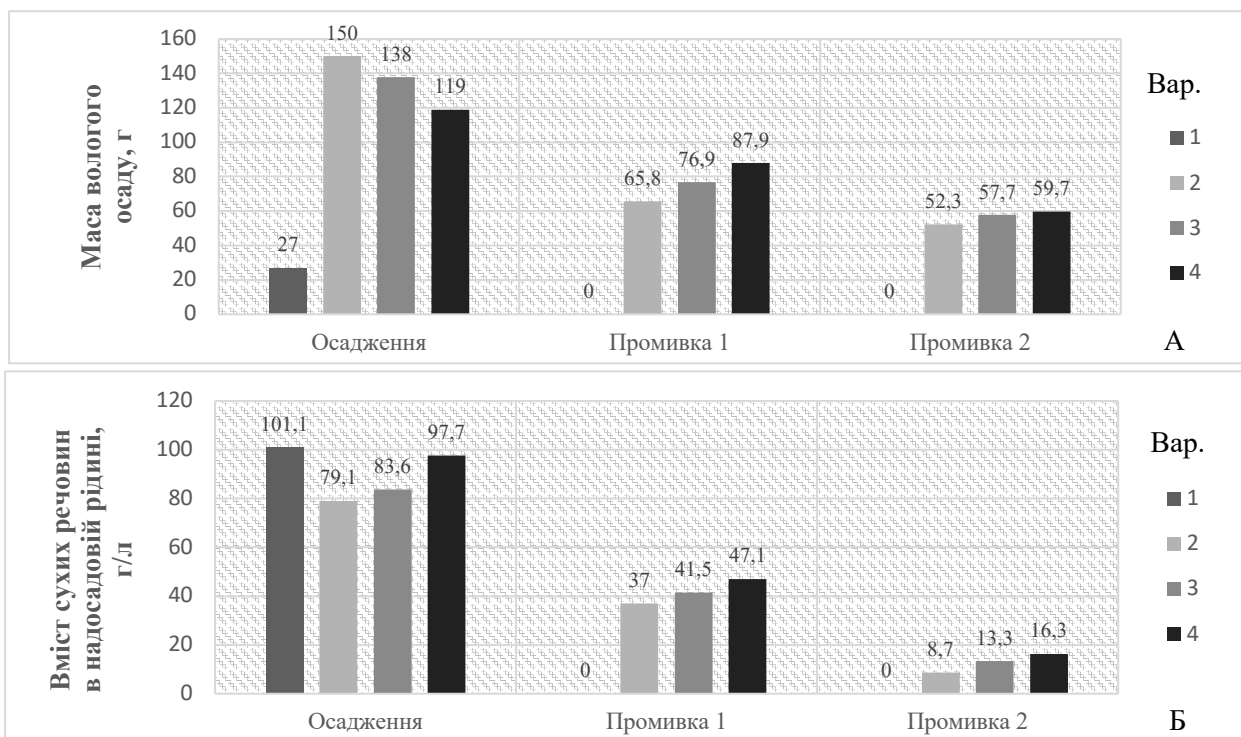


Рис 3.3. Гістограми, що відображають зміни (А) мас вологих осадів та (Б) вмістів сухих речовин на різних стадіях експерименту «Зенітки» (додатки 1-2).

Якщо звернути увагу на аналіз спектрів (додатки 5-7), то одразу можна помітити наявність дуже високих піків поглинання у варіанті №4 на 220-300 нм, що може свідчити про високу кількість вільних амінокислот та білків, які в свою чергу не пішли в осад. У варіанті №2 чітко видно піки поліфенольних сполук в діапазоні 300-340 нм, а варіант №3 мав невиразні спектри поглинання в діапазоні 220-300 нм.

Проте вже після першої промивки у варіантах №3 та №4 вміст поліфенолів сильно зменшився, у варіанті №2 не змінився. Після другої промивки у варіанті №2 явно відбулося просідання на ділянці 240-260 нм (амінокислоти-білки), чого не було помічено в двох інших зразках. Також не можна не зауважити про сильне зниження спектру поглинання поліфенольної ділянки у всіх зразках.

3.1.2. «Чіта». Вже через годину після додавання оцтової кислоти до знежиреного молозива «Чіти» спостерігалось виразне розділення фаз. Всі 4 варіанти були стабільними, після центрифугування мали однорідний щільний осад, надосадова рідина мала прозоро-жовтуватий колір (рис. 3.4).



Рис 3.4. Надосадові рідини після осадження казеїну зі знежиреного молозива «Чіти», після першої та другої промивок, а також казеїновий осад після двох промивок.

Із кожною відмивкою казеїновий осад ставав все щільнішим, а надосадова рідина містила все менше сухого залишку, що можна відслідкувати за рис. 3.5. Також хочеться зазначити відносну рівномірність даних у досліджуваних зразках.

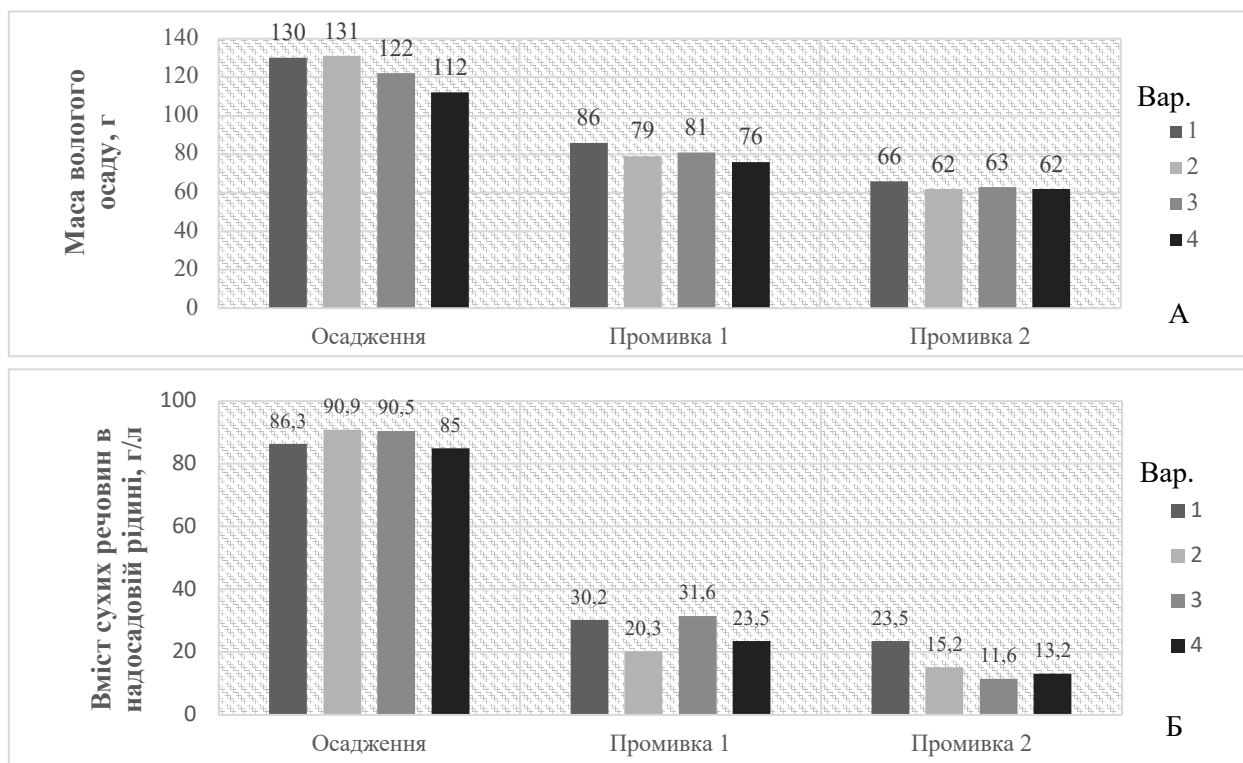


Рис. 3.5. Гістограми, що відображають зміни (А) мас вологих осадів та (Б) вмістів сухих речовин на різних стадіях експерименту «Чіти» (додатки 3-4).

Повертаючись до спектрів (додатки 8-10) одразу помітна різниця між варіантом №1 без внесення поліфенольного концентрату та іншими зразками.

Після першої промивки хочеться звернути увагу на варіанти №2 та №3: в діапазоні 240-260 нм з'явилися досить високі піки поглинаючих сполук. У варіанті №4 також присутній цей пік, але він не такий виразний. Після другої промивки цей же пік просів у всіх зразках, проте найбільше це спостерігалось у №2 та №3.

3.1.3. Підсумок. По завершенню цієї серії дослідів було отримано сухі казеїнові залишки (табл. 3.1.)

Таблиця 3.1.

Маси висушених казеїнових осадів, г

Варіанти	«Зенітка»	«Чіта»	Середні значення
1	-	18,3	9,15±9,15
2	17,2	17,6	17,4±0,2
3	18,2	17,5	17,85±0,35
4	17,8	16,6	17,2±0,6

Ізоформи білків казеїну, які утворюють міцели, утримуються разом слабкими міжмолекулярними зв'язками і легко розриваються при інтенсивному перемішуванні у фізіологічному розчині.

Введення в розчин казеїну поліфенольних сполук, збагачених хлорогеновою кислотою, з подальшою індукцією міцелоутворення призводить до включення поліфенолів у міцели. Ефективність включення поліфенолів у міцели казеїну (співвідношення вільних поліфенолів у розчині до кількості поліфенолів зв'язаних міцелами) залежить від співвідношення між кількістю казеїну та поліфенольних сполук.

3.2. Використання гідрогелів в якості продуктів функціонального харчування й метода доставки АФІ

В даний час гелеподібні структури використовуються для інкапсуляції біоактивних інгредієнтів і ароматичних сполук, вивільнення яких потім можна контролювати. Ці компоненти нестійкі, але дуже цінні завдяки позитивному впливу на здоров'я людини. У такій інкапсульованій формі їх можна використовувати для приготування інноваційних харчових продуктів.

Фенольні сполуки, нарівні з каротиноїдами, токоферолами та фітостеролами, активно використовуються для інкапсуляції з їстівними полімерами завдяки своїй біоактивності. Вони часто додаються до функціональних харчових продуктів. Проте процес обробки харчових продуктів може негативно вплинути на їхню стабільність, знижуючи цінність кінцевого продукту. Інтеграція фенольних сполук у плівки, покриття або гідрогелі допомагає зменшити небажані окислювальні реакції, які можуть погіршити якість продуктів, змінюючи їх колір, спричиняючи прогірклість та знижуючи харчову цінність [63].

Розроблені прототипи гідрогелів на основі молозивного казеїну та витяжки соняшникового шроту збагаченої хлорогеновою кислотою можна розглядати як потенційні складники продуктів функціонального харчування, вживання яких надасть амінокислотну базу з 20 стандартних амінокислот, що будуть активно йти на потребу організму, зокрема на шкірне відновлення. В свою чергу ХГК, що виступає як свого роду пребіотик, буде активною в організмі довше.

3.3. Проблеми досліджень та способи їх вирішення

При розробці гідрогелів із включенням поліфенолів як препаратів для зовнішнього застосування, чи як складників функціонального харчування, що в цілому можуть покращити якість життя, виникає ряд проблем вирішення яких є ключовим аспектом в контексті цілеспрямованої дії продукту.

Поліфеноли є чутливими до факторів навколишнього середовища, таких як світло, температура та рН. Це може призвести до деградації або втрати їх біологічної активності. Для вирішення цієї проблеми вжити таких заходів:

- контролювати умови зберігання (темні прохолодні місця з контрольованим рівнем вологості);

- мікрокапсулювати поліфеноли для того ж захисту від зовнішніх факторів.

Також пропри свої властивості, поліфенольні сполуки можуть мати низьку біодоступність, що означає погане їх засвоєння організмом, і саме для цього використовують різноманітні матриці для доставки поліфенолів: це і наночастинки, і кополімери, і спряження поліфенолів з білками на якому ґрунтувався практичний дослід.

В контексті білків та виділення казеїну з молозива слід звернути увагу на різницю фізіологічних показників донорів молозива: корови як і люди є окремими організмами з різними вродженими та набутими особливостями, що можуть прямо вплинути на кількість осадженого білку, якість збору ліпідів тощо, тож для отримання максимально якісного продукту, його донори мають жити в максимально комфортних умовах.

Слід звернути увагу, що казеїн є високомолекулярною складовою молозива, що в деяких випадках може спровокувати алергічні реакції.

Продовжуючи мову про функціональне харчування слід звернути увагу на сенсорні властивості розробленого продукту та його сприйняття споживачем: смак, текстура та аромат відіграють чи не найважливішу роль у харчових продуктах, тож для вирішення цієї проблеми слід працювати над рецептурою, складом, максимальним видаленням неприємних запахів і тестуванням цільовою аудиторією для оптимізації продукту.

Висновок до розділу 3

В цьому розділі була проведена розробка та отримання потенційного складника продуктів функціонального харчування на основі молозивного казеїну та поліфенольної витяжки із соняшникового шроту збагаченої хлорогеновою кислотою, для прискорення регенерації шкіри й всього організму, а також оглядово розглянуто проблеми та особливості розробки, на які слід звернути увагу.

У ході дослідження були розглянуті різні варіанти гідрогелевих систем, що включають поліфенольні сполуки. Ці системи показали високу здатність утримувати воду та забезпечувати контрольоване вивільнення активних фармакологічних інгредієнтів.

Оглянуті дослідження підтвердили, що використання гідрогелевих систем значно прискорює процес загоєння шкірних покривів, зменшує запальні процеси та покращує загальну регенерацію тканин. Це обумовлено властивостями поліфенольних сполук, які мають антиоксидантні та протизапальні властивості.

Також був запропонований складник функціонального харчування на основі молозивного казеїну та поліфенольної витяжки з соняшникового шроту, що показав перспективу у прискоренні регенераційних процесів не лише шкіри, але й всього організму. Це відкриває нові можливості для застосування подібних продуктів у медицині та спортивному харчуванні.

Для покращення властивостей розроблених гідрогелів та їх ефективності у клінічних умовах необхідні подальші дослідження, спрямовані на оптимізацію складу та умов застосування. Особливо важливо вивчити довгостроковий вплив таких систем на організм людини.

Ці висновки підтверджують високу потенційну цінність розроблених гідрогелевих систем для медицини та суміжних галузей, забезпечуючи нові підходи до лікування та догляду за шкірою.

ВИСНОВКИ

1. Обґрунтовано доцільність отримання гідрогелів з використанням поліфенольних сполук, у тому числі й хлорогенової кислоти.
2. Експериментально доведено можливість включення хлорогенової кислоти, яку було отримано зі щроти соняшнику, в міцели казеїну молозива.
3. Розроблено методику отримання казеїну-хлорогенових комплексів та обґрунтовано механізм формування таких комплексів.
4. Обґрунтовано перспективу використання казеїну-хлорогенових комплексів у функціональному харчуванні.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Tottoli E. M., Dorati R., Genta I., Chiesa E., Pisani S., Conti B. Skin wound healing process and new emerging technologies for skin wound care and regeneration // *Pharmaceutics*. 2020. Т. 12, № 8. С. 735. doi: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12080735>
2. Ivanov E., Ganin V., Kosiachenko K., Sotnykova K. DEVELOPMENT OF A METHOD FOR OBTAINING THE COMPLEX “CASEIN POLYPHENOLIC COMPOUNDS” ENRICHED WITH CHLOROGENIC ACID // *Grail of Science*. 2024. № 38. С. 131-137. doi: <https://doi.org/10.36074/grail-of-science.12.04.2024.020>
3. Erickson J. R., Echeverri K. Learning from regeneration research organisms: The circuitous road to scar free wound healing // *Developmental Biology*. 2018. Т. 433, № 2. С. 144-154. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2017.09.025>
4. Gethin G. Understanding the inflammatory process in wound healing // *British Journal of Community Nursing*. 2012. Т. 17, Suppl. 3. С. S17-S22. doi: <https://doi.org/10.12968/bjcn.2012.17.Sup3.S17>
5. Kim H. S., Sun X., Lee J. H., Kim H. W., Fu X., Leong K. W. Advanced drug delivery systems and artificial skin grafts for skin wound healing // *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2019. Т. 146. С. 209-239. doi: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.12.014>
6. Usui M. L., Underwood R. A., Mansbridge J. N., Muffley L. A., Carter W. G., Olerud J. E. Morphological evidence for the role of suprabasal keratinocytes in wound reepithelialization // *Wound Repair and Regeneration*. 2005. Т. 13, № 5. С. 468-479. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1067-1927.2005.00067.x>
7. Reinke J. M., Sorg H. Wound repair and regeneration // *European Surgical Research*. 2012. Т. 49, № 1. С. 35-43. doi: <https://doi.org/10.1159/000339613>

8. Hinz B. Formation and function of the myofibroblast during tissue repair // *Journal of Investigative Dermatology*. 2007. T. 127, № 3. C. 526-537. doi: <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700613>
9. Lazarus G., Cooper D., Knighton D., Margolis D., Percoraro R., Rodeheaver G., Robson M. Definitions and guidelines for assessment of wounds and evaluation in healing // *Wound Repair and Regeneration*. 1994. T. 2, № 3. C. 165-170. doi: <https://doi.org/10.1046/j.1524-475X.1994.20305.x>
10. Mustoe T. Understanding chronic wounds: a unifying hypothesis on their pathogenesis and implications for therapy // *The American Journal of Surgery*. 2004. T. 187, № 5. C. S65-S70. doi: [https://doi.org/10.1016/S0002-9610\(03\)00306-4](https://doi.org/10.1016/S0002-9610(03)00306-4)
11. McCarty S. M., Percival S. L. Proteases and delayed wound healing // *Advances in Wound Care*. 2013. T. 2, № 8. C. 438-447. doi: <https://doi.org/10.1089/wound.2012.0370>
12. Widgerow A. D., King K., Tocco-Tussardi I., Banyard D. A., Chiang R., Awad A., Evans G. R. The burn wound exudate—An under-utilized resource // *Burns*. 2015. T. 41, № 1. C. 11-17. doi: <https://doi.org/10.1016/j.burns.2014.06.002>
13. Khalid K. A., Nawi A. F. M., Zulkifli N., Barkat M. A., Hadi H. Aging and wound healing of the skin: A review of clinical and pathophysiological hallmarks // *Life*. 2022. T. 12, № 12. C. 2142. doi: <https://doi.org/10.3390/life12122142>
14. Wang P. H., Huang B. S., Horng H. C., Yeh C. C., Chen Y. J. Wound healing // *Journal of the Chinese Medical Association*. 2018. T. 81. C. 94-101. doi: [10.1016/j.jcma.2017.11.002](https://doi.org/10.1016/j.jcma.2017.11.002)
15. Sgonc R., Gruber J. Age-related aspects of cutaneous wound healing: a mini-review // *Gerontology*. 2013. T. 59, № 2. C. 159-164. doi: <https://doi.org/10.1159/000342344>
16. Vu R., Jin S., Sun P., Haensel D., Nguyen Q. H., Dragan M., Dai X. Wound healing in aged skin exhibits systems-level alterations in cellular

composition and cell-cell communication // *Cell Reports*. 2022. T. 40, № 5. doi: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.111155>

17. Sanchez M. C., Lancel S., Boulanger E., Neviere R. Targeting oxidative stress and mitochondrial dysfunction in the treatment of impaired wound healing: a systematic review // *Antioxidants*. 2018. T. 7, № 8. doi: <https://doi.org/10.3390/antiox7080098>

18. Makrantonaki E., Wlaschek M., Scharffetter-Kochanek K. Pathogenese von Wundheilungsstörungen bei älteren Patienten // *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*. 2017. T. 15, № 3. C. 255-278. doi: https://doi.org/10.1111/ddg.13199_g

19. Zouboulis C. C., Makrantonaki E., Nikolakis G. When the skin is in the center of interest: An aging issue // *Clinics in Dermatology*. 2019. T. 37, № 4. C. 296-305. doi: <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2019.04.004>

20. Zouboulis C. C., Makrantonaki E. Clinical and laboratory skin biomarkers of organ-specific diseases. *Mechanisms of Ageing and Development*. 2019. Vol. 177. P. 144–149. URL: <https://doi.org/10.1016/j.mad.2018.08.003>

21. Micale N., Citarella A., Molonia M. S., Speciale A., Cimino F., Saija A., Cristani M. Hydrogels for the delivery of plant-derived (poly) phenols // *Molecules*. 2020. T. 25, № 14. C. 3254. doi: <https://doi.org/10.3390/molecules25143254>

22. Roik O., Nikitina O. ОБГРУНТУВАННЯ СКЛАДУ ТА ТЕХНОЛОГІЇ ГЕЛІЮ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ РАН ТА ОПІКІВ З ШАВЛІЇ ЛІКАРСЬКОЇ ЕКСТРАКТОМ // *Technologies and Engineering*. 2022. № 6. C. 89-103. doi: <https://doi.org/10.30857/2786-5371.2022.6.9>

23. Li Z., Chen Z., Chen H., Chen K., Tao W., Ouyang X. K., Zeng X. Polyphenol-based hydrogels: Pyramid evolution from crosslinked structures to biomedical applications and the reverse design // *Bioactive Materials*. 2022. T. 17. C. 49-70. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2022.01.038>

24. Guan X., Avci-Adali M., Alarcin E., Cheng H., Kashaf S. S., Li Y., Khademhosseini A. Development of hydrogels for regenerative engineering //

Biotechnology Journal. 2017. T. 12, № 5. C. 1600394. doi: <https://doi.org/10.1002/biot.201600394>

25. Abdollahiyan P., Oroojalian F., Mokhtarzadeh A., de la Guardia M. Hydrogel-based 3D bioprinting for bone and cartilage tissue engineering // Biotechnology Journal. 2020. T. 15, № 12. C. 2000095. doi: <https://doi.org/10.1002/biot.202000095>

26. Schmidt U., Jorsch C., Guenther M., Gerlach G. Biochemical piezoresistive sensors based on hydrogels for biotechnology and medical applications // Journal of Sensors and Sensor Systems. 2016. T. 5, № 2. C. 409-417. doi: <https://doi.org/10.5194/jsss-5-409-2016>

27. Stern D., Cui H. Crafting polymeric and peptidic hydrogels for improved wound healing // Advanced Healthcare Materials. 2019. T. 8, № 9. C. 1900104. doi: <https://doi.org/10.1002/adhm.201900104>

28. Rahim M. A., Kristufek S. L., Pan S., Richardson J. J., Caruso F. Phenolic building blocks for the assembly of functional materials // Angewandte Chemie International Edition. 2019. T. 58, № 7. C. 1904-1927. doi: <https://doi.org/10.1002/anie.201807804>

29. Song L., Yang H., Liang D., Chu D., Yang L., Li M., Guo J. A chlorogenic acid-loaded hyaluronic acid-based hydrogel facilitates anti-inflammatory and pro-healing effects for diabetic wounds // Journal of Drug Delivery Science and Technology. 2022. T. 70. C. 103232. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2022.103232>

30. Huang H., Chen L., Hou Y., He W., Wang X., Zhang D., Hu J. Self-assembly of chlorogenic acid into hydrogel for accelerating wound healing // Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2023. T. 228. C. 113440. doi: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2023.113440>

31. Guo Z., Xie W., Lu J., Guo X., Xu J., Xu W., Zhao L. Tannic acid-based metal phenolic networks for bio-applications: a review // Journal of Materials Chemistry B. 2021. T. 9, № 20. C. 4098-4110. doi: <https://doi.org/10.1039/D1TB00383F>

32. Lin F., Wang Z., Shen Y., Tang L., Zhang P., Wang Y., Cai K. Engineering a self-healing metal-polyphenol network hydrogel with anti-inflammatory activity for enhancing wound healing // *Acta Biomaterialia*. 2022. T. 145. C. 56-68. doi:
33. A Hydrogen-Bonded Extracellular Matrix-Mimicking Bactericidal Hydrogel with Radical Scavenging and Hemostatic Function for pH-Responsive Wound Healing Acceleration / Z. Ahmadian et al. *Advanced Healthcare Materials*. 2020. P. 2001122. URL: <https://doi.org/10.1002/adhm.202001122>
34. Multifaceted role of phyto-derived polyphenols in nanodrug delivery systems / Z. Chen et al. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2021. Vol. 176. P. 113870. URL: <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.113870>
35. Targeted Therapy against Metastatic Melanoma Based on Self-Assembled Metal-Phenolic Nanocomplexes Comprised of Green Tea Catechin / K. Li et al. *Advanced Science*. 2019. Vol. 6, no. 5. P. 1801688. URL: <https://doi.org/10.1002/advs.201801688>
36. Mussel-inspired hydrogels: from design principles to promising applications / C. Zhang et al. *Chemical Society Reviews*. 2020. Vol. 49, no. 11. P. 3605–3637. URL: <https://doi.org/10.1039/c9cs00849g>
37. Sugiarto S., Leow Y., Tan C. L., Wang G., Kai D. How far is Lignin from being a biomedical material? // *Bioactive Materials*. 2022. T. 8. C. 71-94. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.06.023>
38. Gan D., Xing W., Jiang L., Fang J., Zhao C., Ren F., Lu X. Plant-inspired adhesive and tough hydrogel based on Ag-Lignin nanoparticles-triggered dynamic redox catechol chemistry // *Nature Communications*. 2019. T. 10, № 1. C. 1487. doi: <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09351-2>
39. Sun D., Li N., Rao J., Jia S., Su Z., Hao X., Peng F. Ultrafast fabrication of organohydrogels with UV-blocking, anti-freezing, anti-drying, and skin epidermal sensing properties using lignin–Cu²⁺ plant catechol chemistry // *Journal of Materials Chemistry A*. 2021. T. 9, № 25. C. 14381-14391. doi: <https://doi.org/10.1039/D1TA02139G>

40. Liu C., Goel P., Kaeser P. S. Spatial and temporal scales of dopamine transmission // *Nature Reviews Neuroscience*. 2021. T. 22, № 6. C. 345-358. doi: <https://doi.org/10.1038/s41583-021-00455-7>
41. Cheng W., Zeng X., Chen H., Li Z., Zeng W., Mei L., Zhao Y. Versatile polydopamine platforms: synthesis and promising applications for surface modification and advanced nanomedicine // *ACS Nano*. 2019. T. 13, № 8. C. 8537-8565. doi: <https://doi.org/10.1021/acsnano.9b04436>
42. Huang Z., Delparastan P., Burch P., Cheng J., Cao Y., Messersmith P. B. Injectable dynamic covalent hydrogels of boronic acid polymers cross-linked by bioactive plant-derived polyphenols // *Biomaterials Science*. 2018. T. 6, № 9. C. 2487-2495. doi: [10.1039/C8BM00453F](https://doi.org/10.1039/C8BM00453F)
43. Rizzo C., Marullo S., Dintcheva N. T., Gambarotti C., Billeci F., D'Anna F. Ionic liquid gels and antioxidant carbon nanotubes: Hybrid soft materials with improved radical scavenging activity // *Journal of Colloid and Interface Science*. 2019. T. 556. C. 628-639. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2019.08.108>
44. Pan X., Wang Q., He P., Liu K., Ni Y., Ouyang X., Tan Y. Mussel-inspired nanocomposite hydrogel-based electrodes with reusable and injectable properties for human electrophysiological signals detection // *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. 2019. T. 7, № 8. C. 7918-7925. doi: <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.9b00579>
45. Lee H. A., Park E., Lee H. Polydopamine and its derivative surface chemistry in material science: a focused review for studies at KAIST // *Advanced Materials*. 2020. T. 32, № 35. C. 1907505. doi: <https://doi.org/10.1002/adma.201907505>
46. Hong S., Yang K., Kang B., Lee C., Song I. T., Byun E., Lee H. Hyaluronic acid catechol: a biopolymer exhibiting a pH-dependent adhesive or cohesive property for human neural stem cell engineering // *Advanced Functional Materials*. 2013. T. 23, № 14. C. 1774-1780. doi: <https://doi.org/10.1002/adfm.201202365>

47. Liang S., Zhang Y., Wang H., Xu Z., Chen J., Bao R., Liu W. Paintable and rapidly bondable conductive hydrogels as therapeutic cardiac patches // *Advanced Materials*. 2018. T. 30, № 23. C. 1704235. doi: <https://doi.org/10.1002/adma.201704235>
48. Tian Y., Cao Y., Wang Y., Yang W., Feng J. Realizing ultrahigh modulus and high strength of macroscopic graphene oxide papers through crosslinking of mussel-inspired polymers // *Advanced Materials*. 2013. T. 25, № 21. C. 2980-2983. doi: <https://doi.org/10.1002/adma.201300118>
49. Han L., Yan L., Wang K., Fang L., Zhang H., Tang Y., Lu X. Tough, self-healable and tissue-adhesive hydrogel with tunable multifunctionality // *NPG Asia Materials*. 2017. T. 9, № 4. C. e372-e372. doi: <https://doi.org/10.1038/am.2017.33>
50. Yang Y., Gao P., Wang J., Tu Q., Bai L., Xiong K., Yang Z. Endothelium-mimicking multifunctional coating modified cardiovascular stents via a stepwise metal-catechol-(amine) surface engineering strategy // *Research*. 2020. doi: [10.34133/2020/9203906](https://doi.org/10.34133/2020/9203906)
51. Xiang Y., Mao C., Liu X., Cui Z., Jing D., Yang X., Wu S. Rapid and superior bacteria killing of carbon quantum dots/ZnO decorated injectable folic acid-conjugated PDA hydrogel through dual-light triggered ROS and membrane permeability // *Small*. 2019. T. 15, № 22. C. 1900322. doi: <https://doi.org/10.1002/sml.201900322>
52. Cheng X., Li M., Wang H., Cheng Y. All-small-molecule dynamic covalent gels with antibacterial activity by boronate-tannic acid gelation // *Chinese Chemical Letters*. 2020. T. 31, № 3. C. 869-874. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cclet.2019.07.013>
53. Narkar A. R., Barker B., Clisch M., Jiang J., Lee B. P. pH responsive and oxidation resistant wet adhesive based on reversible catechol–boronate complexation // *Chemistry of Materials*. 2016. T. 28, № 15. C. 5432-5439. doi: <https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.6b01851>

54. Narkar A. R., Lee B. P. Incorporation of anionic monomer to tune the reversible catechol–boronate complex for pH-responsive, reversible adhesion // *Langmuir*. 2018. Т. 34, № 32. С. 9410-9417. doi: <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.8b00373>
55. Wang W., Zhang Y., Liu W. Bioinspired fabrication of high strength hydrogels from non-covalent interactions // *Progress in Polymer Science*. 2017. Т. 71. С. 1-25. doi: <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2017.04.001>
56. Zhang W., Wang R., Sun Z., Zhu X., Zhao Q., Zhang T., Lee B. P. Catechol-functionalized hydrogels: biomimetic design, adhesion mechanism, and biomedical applications // *Chemical Society Reviews*. 2020. Т. 49, № 2. С. 433-464. doi: <https://doi.org/10.1039/C9CS00285E>
57. Grimme S. Do special noncovalent π – π stacking interactions really exist? // *Angewandte Chemie International Edition*. 2008. Т. 47, № 18. С. 3430-3434. doi: <https://doi.org/10.1002/anie.200705157>
58. Chang G., Yang L., Yang J., Stoykovich M. P., Deng X., Cui J., Wang D. High-performance pH-switchable supramolecular thermosets via cation– π interactions // *Advanced Materials*. 2018. Т. 30, № 7. С. 1704234. doi: [10.1002/adma.201704234](https://doi.org/10.1002/adma.201704234)
59. Maier G. P., Rapp M. V., Waite J. H., Israelachvili J. N., Butler A. Adaptive synergy between catechol and lysine promotes wet adhesion by surface salt displacement // *Science*. 2015. Т. 349, № 6248. С. 628-632. doi: <https://doi.org/10.1126/science.1267100>
60. Martínez-Force E., Dunford N. T., Salas J. J. Sunflower: Chemistry, Production, Processing, and Utilization. 2015. С. 93.
61. Нетребчук М., Года М. Виділення та ідентифікація протеїнів казеїнового комплексу // Збірник тез VIII всеукраїнської студентської науково-технічної конференції „Природничі та гуманітарні науки. Актуальні питання“. 2015. С. 288-288.
62. Holland J. W., Boland M. J. Post-translational modifications of caseins // *Milk Proteins*. Academic Press, 2014. С. 141-168. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405171-3.00005-2>

63. Li T., Li X., Dai T., Hu P., Niu X., Liu C., Chen J. Binding mechanism and antioxidant capacity of selected phenolic acid- β -casein complexes // Food Research International. 2020. T. 129. C. 108802. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108802>

64. Ćorković I., Pichler A., Šimunović J., Kopjar M. Hydrogels: Characteristics and application as delivery systems of phenolic and aroma compounds // Foods. 2021. T. 10, № 6. C. 1252. doi: <https://doi.org/10.3390/foods10061252>

ДОДАТКИ

Додаток 1

Маси вологих осадів сухих речовин у казеїнових осадах після осадження та промивок («Зенітка»)

Маса вологого осаду, г				
Варіант	1	2	3	4
Осадження	27	150	138	119
Промивка 1	0	65,8	76,9	87,9
Промивка 2	0	52,3	57,7	59,7

Додаток 2

Концентрації сухих речовин в надосадових рідинах після осадження та промивок («Зенітка»)

Вміст сухих речовин в надосадовій рідині, г/л				
Варіант	1	2	3	4
Осадження	101,1	79,1	83,6	97,7
Промивка 1	0	37	41,5	47,1
Промивка 2	0	8,7	13,3	16,3

Додаток 3

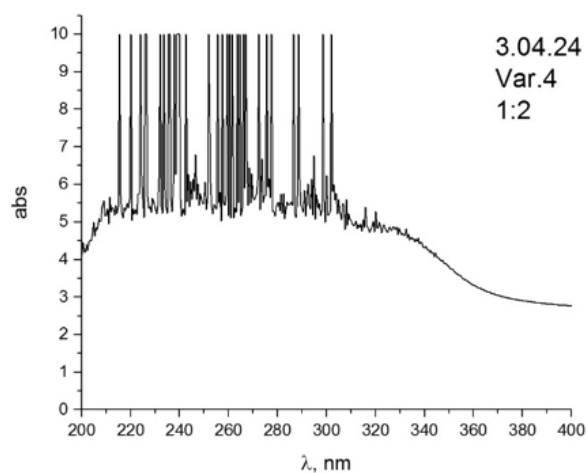
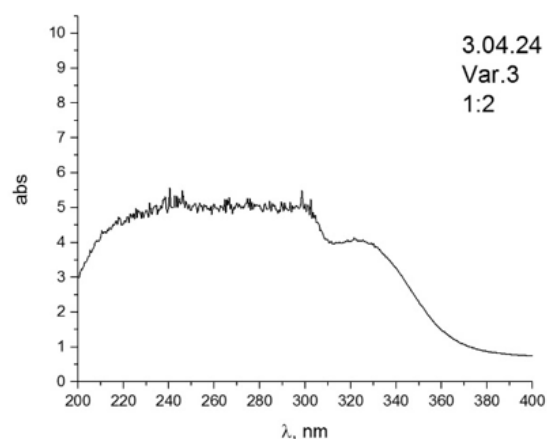
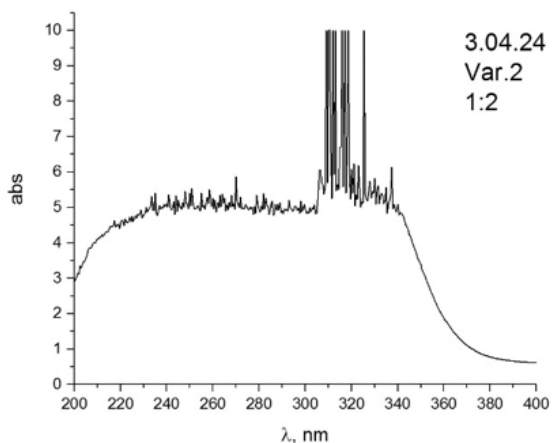
Маси вологих осадів сухих речовин у казеїнових осадах після осадження та промивок («Чіта»)

Маса вологого осаду, г				
Варіант	1	2	3	4
Осадження	130	131	122	112
Промивка 1	86	79	81	76
Промивка 2	66	62	63	62

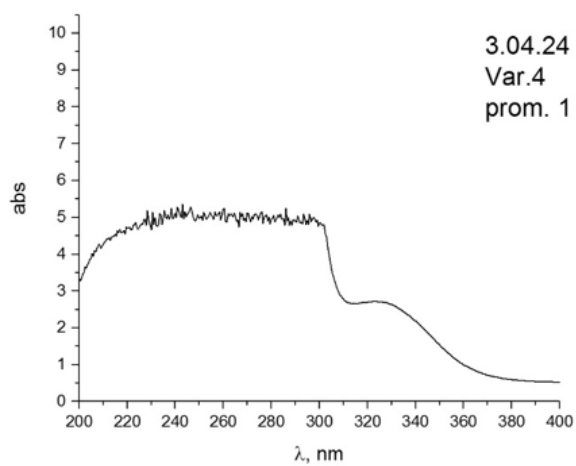
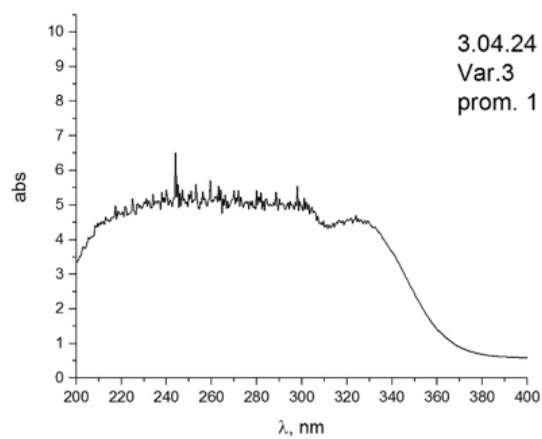
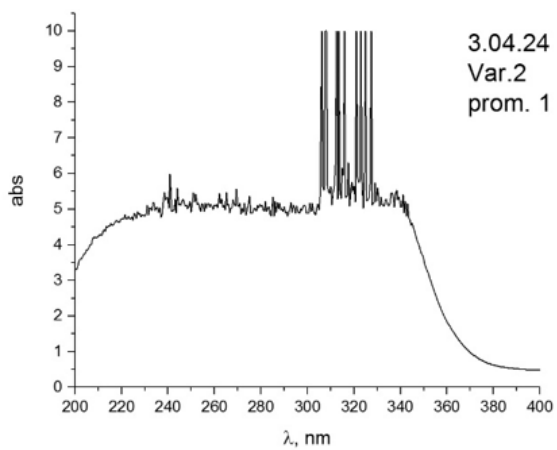
Концентрації сухих речовин в надосадових рідинах після осадження та промивок («Чіта»)

Вміст сухих речовин в надосадовій рідині, г/л				
Варіант	1	2	3	4
Осадження	86,3	90,9	90,5	85
Промивка 1	30,2	20,3	31,6	23,5
Промивка 2	23,5	15,2	11,6	13,2

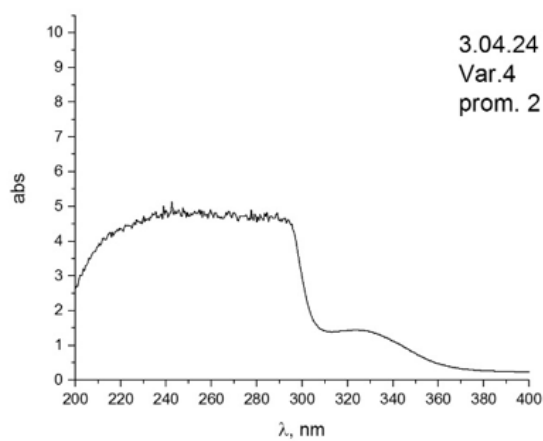
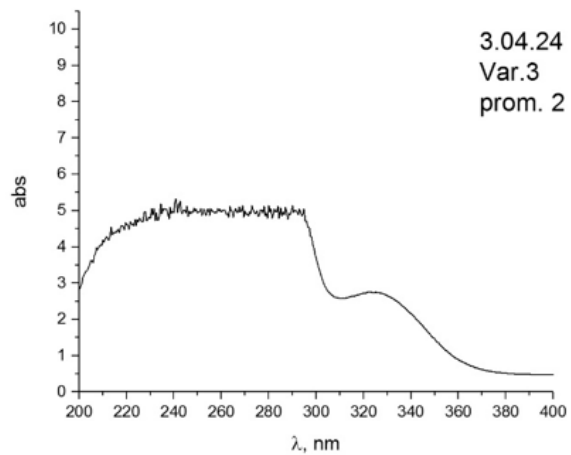
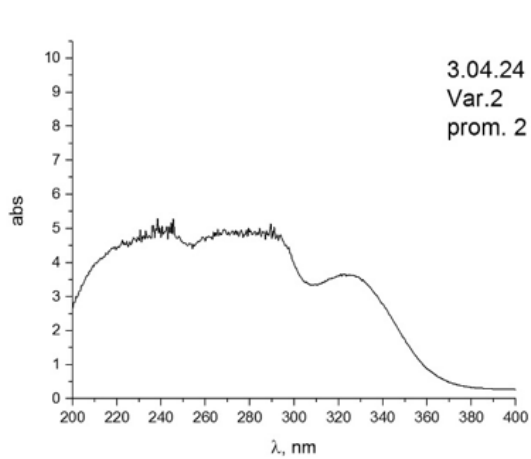
Спектри поглинання розведених в 2 рази надосадових рідини після осадження казеїну («Зенітка»).



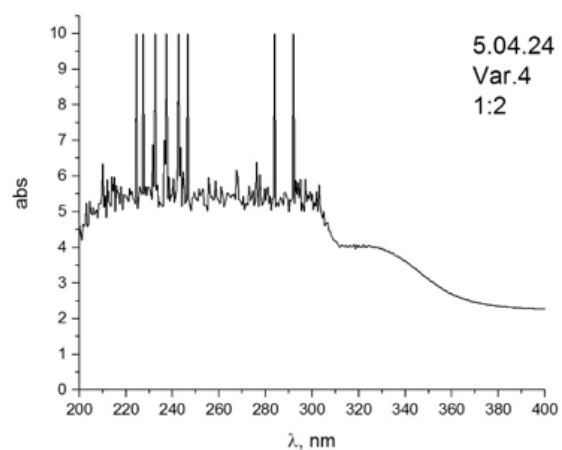
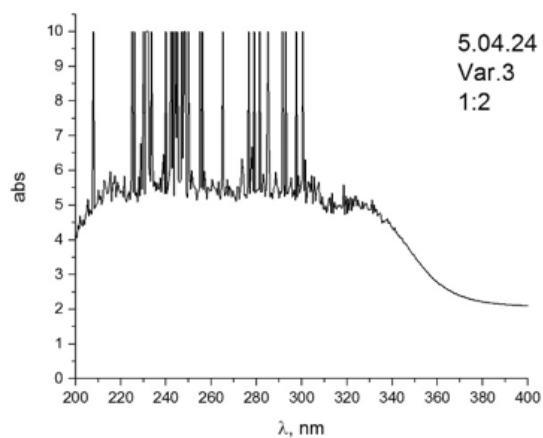
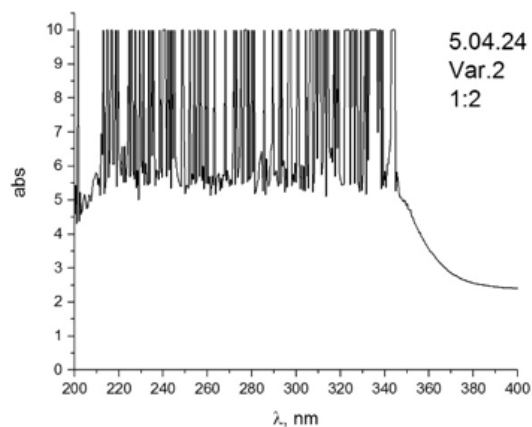
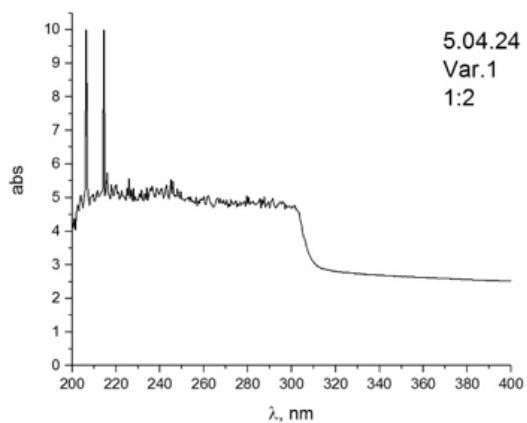
Спектри поглинання надосадових рідин після першої промивки осаду («Зенітка»)



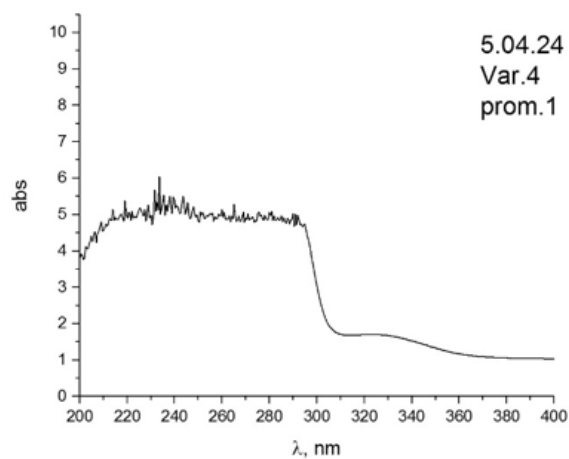
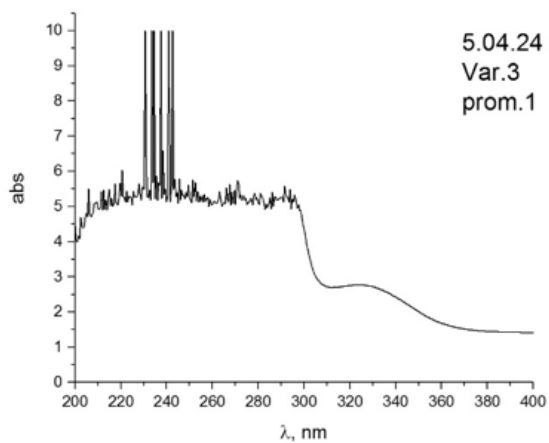
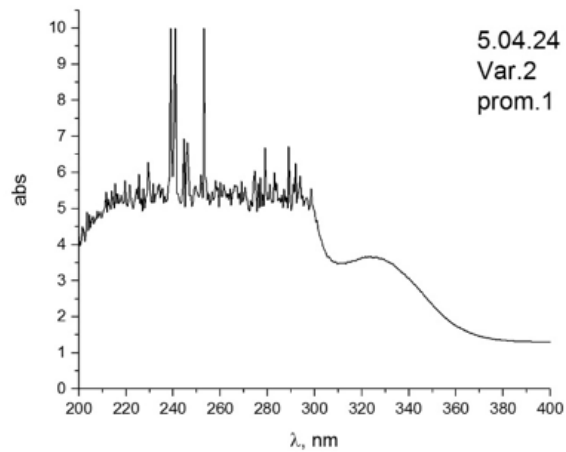
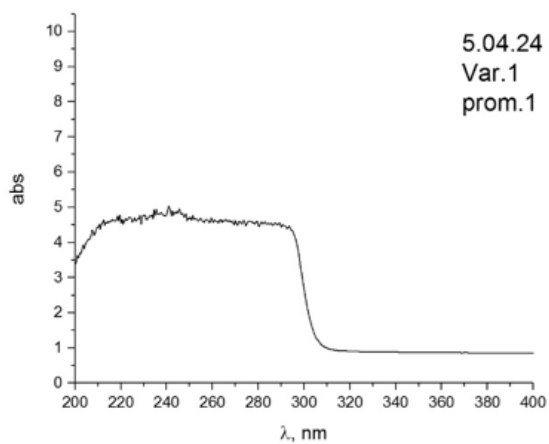
Спектри поглинання надосадових рідин після другої промивки осаду («Зенітка»)



Спектри поглинання розведених в 2 рази надосадових рідин після осадження казеїну («Чіта»)



Спектри поглинання надсадових рідин після першої промивки осаду («Чіта»)



Спектри поглинання надосадових рідин після другої промивки осаду («Чіта»)

