

**DYNAMICS OF PRO- AND ANTI-INFLAMMATORY CYTOKINE LEVELS
IN THE BLOOD PLASMA OF EXPERIMENTAL ANIMALS FOLLOWING TOPICAL
APPLICATION OF HYDROGEL DRESSINGS**

Danylo Halytsky Lviv National Medical University (Lviv, Ukraine)

Jurmelnichuk@gmail.com

Various pro- and anti-inflammatory cytokines play crucial roles in the development of acute inflammatory processes. Depending on their effect on inflammatory processes, interleukins are divided into pro-inflammatory (IL-6) and anti-inflammatory (IL-10). The aim of the study was to analyze the dynamics of pro- and anti-inflammatory cytokines in the blood plasma of rats in an experiment using hydrogel dressings saturated with silver ions and an antioxidant drug for the local treatment of inflammatory processes. The experimental study was conducted on 80 sexually mature male rats. The healing of an experimental infected wound was studied using hydrogel dressings saturated with medicinal substances. The effectiveness of local therapy was assessed using biochemical methods. Analysis of the dynamics of the pro- and anti-inflammatory balance showed that the greatest manifestation of the inflammatory process and suppression of the body's compensatory reactions was observed on the third day. Indicative data on the relative ratio of the course of the inflammatory process were obtained on the seventh day. The highest result was in the control group – 2.719 ± 0.55 IU, which clearly reflected the general tendency towards the equalization of pro- and anti-inflammatory reactions in the animals' bodies. However, in the third experimental group, it was even lower (1.094 ± 0.23 IU) than the normal value, which indicates the predominance of anti-inflammatory reactions of the body to damage when using hydrogel dressings saturated with silver ions and an antioxidant preparation. On the 10th day, the body's anti-inflammatory defense mechanisms intensify, with parallel processes of inflammation subsiding. The results obtained on the 14th day of the experiment did not differ statistically significantly from the norm in all animal groups. The use of hydrogel dressings reduces the duration of treatment of the inflammatory process.

Key words: hydrogels, inflammation, cytokines, interleukin-6, interleukin-10.

Connection of the publication with planned research works.

This work is part of a comprehensive scientific topic entitled "Improvement and implementation of methods of reconstructive and restorative surgery and regenerative technologies in the maxillofacial region," state registration number 0120U002134, of the Department of Surgical Dentistry and Maxillofacial Surgery of the Faculty of Dentistry of the State Educational Institution "Danylo Halytsky Lviv National Medical University."

Introduction.

Various pro- and anti-inflammatory cytokines play crucial roles in the development of acute inflammatory processes. In particular, one of the well-known pro-inflammatory cytokines is interleukin-6, which activates target genes that regulate cell development, differentiation, apoptosis, and proliferation. In turn, interleukin-10 is the primary anti-inflammatory cytokine, which, even in minimal concentrations, contributes to the effective regulation of cellular homeostasis by suppressing pro-inflammatory cytokines.

Interleukins are cytokines that are polypeptides involved in regulating the body's defensive responses. Physiological functions are performed by specific receptor cells with high affinity. A few hours after exposure to pathogens, macrophages in the area of inflammation initiate the synthesis of cytokines, which activate the functions of immune cells. This triggers a cascade of reactions involving the release of low-molecular-weight inflammatory mediators [1, 2, 3].

Depending on their effect on inflammatory processes, interleukins are divided into pro-inflammatory and anti-inflammatory [4]. One of the pro-inflammatory interleukins is interleukin-6 (IL-6), and the main anti-inflammatory interleukin is interleukin-10 (IL-10).

Interleukin-6 is a (pleiotropic) pro-inflammatory cytokine with a molecular weight of 26 kDa, synthesized by immune and stromal cells, in particular macrophages, endothelial cells, fibroblasts, T and B lymphocytes, and dendritic cells. The activators of IL-6 synthesis are interleukin-1, interleukin-2, interferons, and colony-stimulating factors, while the inhibitors are interleukin-4, interleukin-10, and interleukin-13 [5, 6].

Interleukin-6 performs autocrine, paracrine, and "hormone-like" regulatory functions in various physiological and pathological processes, including the acute phase of inflammation [7].

Interleukin-10 is a major anti-inflammatory cytokine that performs its function by suppressing the synthesis of pro-inflammatory interleukins such as interleukin-1 β , interleukin-6, interleukin-8, interleukin-12, interferon- γ , and interferon- α . IL-10 synthesis occurs in T-helper-2 lymphocytes, B-lymphocytes, monocytes, macrophages, keratinocytes, mast cells, and thymocytes. Monocytes activated by lipopolysaccharides and interferons- γ are inhibitors of IL-10 production [8]. It suppresses the effector functions of macrophages, T-killers, neutrophils, and interferon- γ synthesis, stimulates B-cell proliferation and thymocyte maturation, and chemotaxis. IL-10 promotes the growth of mast cells and the secretion of immunoglobulins. In other words, the main function of interleukin-10 is to limit and suppress the inflammatory process [9].

The aim of the study.

Analysis of the dynamics of pro- and anti-inflammatory cytokines in the blood plasma of rats in an experiment using hydrogel dressings saturated with silver ions and an antioxidant preparation for the local treatment of inflammatory processes.

Object and research methods.

During this study, generally accepted international standards and rules for working with experimental animals were followed, in accordance with the "General Ethical Principles of Animal Experiments" approved by the III National Congress in Kyiv in 2007, and the Helsinki Declaration: "Rules for the Use of Experimental Animals in Experimental Research" 1964-2000.

The experimental study was conducted at the vivarium of the Danylo Halytsky Lviv National Medical University. All animals were kept in accordance with the Sanitary Rules for the Arrangement, Equipment, and Maintenance of Experimental Biological Clinics (vivarium), where they received a standard diet.

The experimental study was conducted on 80 sexually mature male Wistar rats weighing 150 to 200 grams.

The healing of experimental infected wounds in the test animals was studied using hydrogel dressings saturated with medicinal substances. For this purpose, white sexually mature male Wistar rats underwent depilation on the back in the interscapular region one day before surgery. After aseptic treatment, a 2x2 cm area of skin with subcutaneous fatty tissue was excised from the depilated area to the superficial fascia. After that, a gauze swab saturated with *Staphylococcus aureus* culture was inserted into the wound. The wound was left open. On the third day, the rats developed a full-fledged purulent wound with all signs of inflammation [10].

The distribution of experimental groups of animals in the study of the characteristics of the purulent wound process was as follows:

- 1) intact animals (10 male rats);
- 2) control group – the wounds of the animals in this group were washed with a 3% H₂O₂ solution and a sterile ointment dressing with Levomikol was applied on the third day after modeling (10 male rats);
- 3) experimental group 1 – on the third day after modeling, the wound was washed with H₂O₂ solution and a hydrogel dressing saturated with silver ions was applied (20 male rats);
- 4) experimental group 2 – on the third day after modeling, the wound was washed with H₂O₂ solution and a hydrogel bandage saturated with the antioxidant drug "Quercetin" was applied (20 male rats);
- 5) experimental group 3 – on the third day after modeling the infected wound, the animals in this group were treated with H₂O₂ solution and a hydrogel dressing saturated with silver ions and the antioxidant drug "Quercetin" was applied (20 male rats).

All hydrogels were fixed to the wounds on the animals' backs using gauze bandages to prevent them from shifting and being licked off by the animals.

The effectiveness of the proposed local therapy was assessed using biochemical methods. The indicators of intact animals that did not have a simulated infected wound were taken as the norm in the analysis of laboratory indicators. The animals were removed from the experiment on days 3, 7, 10, and 14. Blood was taken from the cervical vessels for biochemical studies.

To study the dynamics of interleukins (IL-6 and IL-10) in rats, blood was taken at the specified times and centrifuged at 3000 rpm for 10 minutes. The Rat IL-1B ELISA BMS630 and Rat IL-10 ELISA BMS629 (Bender MedSystems, Vienna, Austria) test systems with fixed antibodies (polyclonal for IL-6, monoclonal for IL-10) were

used. Incubation with biotin conjugate was carried out for two hours. The plates were washed from the biotin conjugate and streptavidin-HRP was added, followed by incubation for 1 hour. After that, the wells of the plate were washed and the contents of the wells were incubated for 10 minutes with tetramethylbidine solution, followed by staining. The concentration of interleukins was measured in pg/ml [11, 12].

The ratio between interleukin (IL-6 and IL-10) levels in rat blood plasma was determined by calculating the ratio of interleukin-6 to interleukin-10 levels in rat blood plasma at a given observation time point.

$$\text{Balance of pro- and anti-inflammatory reactivity of the body} = \frac{\text{IL-6}}{\text{IL-10}}$$

Mathematical and statistical processing of the research results was carried out using descriptive and analytical statistical methods. Considering that all the studied data were of the nature of variation series with normal (Gaussian) distribution, the arithmetic mean and its standard error ($M \pm m$) were used to describe the results. The comparison of mean values in different groups was performed using the unpaired Student's t-test, and in related groups – the paired Student's t-test. The indicators of proportions are presented with an average error ($P \pm m_p$, %), and the significance of the difference between them was determined using Pearson's criterion (χ^2). The difference between the compared groups was considered significant at $p < 0.05$.

Research results and their discussion.*Results of interleukin-6 content in rat blood plasma.*

Interleukin-6 belongs to the pro-inflammatory cytokines, which are directly involved in regulating the inflammatory process. Active release of IL-6 serves as a reliable and accurate marker of inflammatory processes in the body. Studying the dynamics of interleukin-6 content in the blood plasma of experimental animals allows us to evaluate the corrective effect of the type of treatment used. IL-6 is a decisive factor in stimulating inflammation, which manifests as an increase in the early stages of the pathological process.

Thus, analyzing the obtained data, it can be noted that on the *third day* of the experiment, the concentration of IL-6 in blood plasma significantly exceeded that of intact animals (7.8 ± 0.4 pg/ml) in all groups ($p < 0.05$) in which the inflammatory process was modeled (**table 1**). As expected, the largest increase was observed in animals of the control group (26.4 ± 2.2 pg/ml). No statistically significant difference was found between animals of the first and second experimental groups – 22.3 ± 1.7 pg/ml and 22.5 ± 2.1 pg/ml, respectively. The smallest increase in IL-6 content relative to intact animals and the control group was obtained in animals of the third experimental group, which received local treatment of purulent-inflammatory wounds with hydrogel dressings saturated with silver ions and an antioxidant drug – 18.3 ± 1.6 pg/ml.

When evaluating the results on the *seventh day* of the experiment, it was noted that in all groups of experimental animals there was a decrease in IL-6 content compared to the third day. The least noticeable dynamics among all animals with wounds was observed in the control group (17.4 ± 1.9 pg/ml). A statistically significant decrease in IL-6 levels compared to the previous study

Table 1 – Dynamics of interleukin-6 content in the blood plasma of experimental animals (M±m, pg/ml)

Research group	Research period, days			
	3rd	7th	10th	14th
Intact animals (n=10)	7,8±0,4			
Control group (n=10)	26,4±2,2*	17,4±1,9*	10,3±1,3	8,6±0,7
Research group 1 (n=20)	22,3±1,7*	14,3±0,9*	9,4±0,8	8,3±0,5
Research group 2 (n=20)	22,5±2,1*	14,8±1,2*	9,6±0,7*	8,4±0,7
Research group 3 (n=20)	18,3±1,6**	10,5±0,7**	8,1±0,8	7,9±0,5

Notes: * – there is a significant difference (p<0.05) between the interleukin-6 levels in the blood plasma of rats and intact animals; # – there is a significant difference (p<0.05) between the interleukin-6 levels in the blood plasma of rats and the control group.

and the control group was recorded in animals treated with hydrogels containing silver ions (experimental group No. 1) – 14.3±0.9 pg/ml and hydrogels saturated with an antioxidant preparation (experimental group No. 2) – 14.8±1.2 pg/ml (p<0.05). The greatest decrease in IL-6 was recorded in animals of the third experimental group – 10.5±0.7 pg/ml (p<0.05), which characterizes the positive complex effect of the components of hydrogel dressings used for local treatment of animals in this group.

On the 10th day of the experiment, a gradual decrease in IL-6 concentration in the blood plasma of rats continued to be observed. In the control group, it was 10.3±1.3 pg/ml, which, however, still did not correspond to the indicators of intact animals (7.8±0.8 pg/ml), i.e., the normal indicator. In experimental groups No. 1 and No. 2, a gradual approach to the indicators of intact animals was recorded, statistically lower than in the control group – 9.4±0.8 pg/ml and 9.6±0.7 pg/ml (p<0.05). The data in experimental group No. 3 were closest to the level of intact animals – 8.1±0.8 pg/ml.

The IL-6 content on the 14th day of the experiment in all groups of animals was close to the level of intact animals, which was taken as the norm – 7.5±0.3 pg/ml. Thus, in the control group, the indicators differed most from the norm (8.6±0.7 pg/ml), but without statistical error. In experimental group No. 1, the IL-6 level was 8.3±0.5 pg/ml, which is lower than in the control group and close to the values of intact animals. A similar situation was observed in experimental group No. 2 – 8.4±0.7 pg/ml. The IL-6 level in the third experimental group – 7.9±0.5 pg/ml – did not differ statistically significantly from the norm.

Results of interleukin-10 content in rat blood plasma.

Interleukin-10 performs its function by suppressing the synthesis of other pro-inflammatory cytokines. It is

Table 2 – Dynamics of interleukin-10 content in the blood plasma of experimental animals (M±m, pg/ml)

Research group	Research period, days			
	3rd	7th	10th	14th
Intact animals (n=10)	4,8±0,4			
Control group (n=10)	2,4±0,2*	6,4±0,3*	4,9±0,5	4,6±0,4
Research group 1 (n=20)	3,8±0,1**	8,0±0,5**	5,4±0,4	4,9±0,3
Research group 2 (n=20)	3,5±0,3**	7,8±0,6**	5,5±0,2	5,1±0,2
Research group 3 (n=20)	4,0±0,1#	9,6±0,2**	6,8±0,2**	5,1±0,1

Notes: * – there is a significant difference (p<0.05) between the interleukin-10 levels in the blood plasma of rats and intact animals; # – there is a significant difference (p<0.05) between the interleukin-10 levels in the blood plasma of rats and the control group.

the primary anti-inflammatory cytokine, whose activity determines the prevalence, manifestation, and duration of the inflammatory process. Depending on the dynamics of IL-10 content, it is possible to assess the state of the body's resistance and systemic response to the pathological process (table 2).

The normal level of interleukin-10 in the blood plasma of rats was taken from the results in the group of intact animals (4.8±0.4 pg/ml). On the third day of the experiment, the IL-10 level was below normal in all animals in which a purulent-inflammatory process in soft tissues was simulated. However, there were significant differences between the different experimental groups. The IL-10 level in the control group was almost two times lower (2.4±0.2 pg/ml) than in intact animals (p<0.05). A significant decrease was also noted in animals of the first experimental group (3.8±0.1 pg/ml) and animals of the second experimental group (3.5±0.3 pg/ml) (p<0.05). However, there was no statistically significant difference between the indicators of these groups. The least significant decrease in IL-10 content was recorded in the third experimental group – 4.0±0.1 pg/ml, which was not statistically significantly different from the norm. The results show that on the third day, inflammatory reactions are pronounced, and the compensatory anti-inflammatory response is suppressed.

The results on the seventh day of the experiment were significantly different from those obtained on the third day. A sharp increase in IL-10 content was observed in all animal groups. In the control group, a noticeable increase was found compared to the result of the third day – 6.4±0.3 pg/ml (p<0.05). In experimental group No. 1, there was also a statistically significant increase compared to the third day of the experiment – 8.0±0.5 pg/ml (p<0.05). In experimental group No. 2, the IL-10 content was also statistically significantly higher (7.8±0.6 pg/ml, p<0.05) than on the third day. Both results in experimental groups No. 1 and No. 2 are almost twice as high as in intact animals, in which the indicator on the 7th day was 4.8±0.4 pg/ml. The largest increase in IL-10 content was recorded in the third experimental group – 9.6±0.7 pg/ml. This result was statistically significantly higher (p<0.05) than in intact animals, the control group, and compared to the indicator on the third day. Thus, on the seventh day, the body initiates compensatory reactions through enhanced synthesis of anti-inflammatory mediators and inhibitors of pro-inflammatory cytokine production.

If on the seventh day of the inflammatory process, animals showed a sharp increase in IL-10 content, then on the tenth day, a gradual decrease was observed. Thus, in the control group, the IL-10 level was almost close to the normal level (4.9±0.5 pg/ml) and did not differ statistically from it (p>0.05). A similar pattern was observed in the first (5.4±0.4 pg/ml) and second (5.5±0.2 pg/ml) experimental groups. The results in these groups continued to exceed the norm, but did not differ statistically from it or from the control group. In the third experimental group, a decrease (6.8±0.2 pg/ml) in IL-10 content was also recorded compared to the seventh day, but it was statistically signifi-

cantly higher ($p < 0.05$) than in the control group. As can be seen from the results obtained, in all animals with an inflammatory process, the active release and production of anti-inflammatory cytokines continues, as evidenced by higher results than in intact animals; however, compared to previous results, a gradual decrease and approximation to the norm can be noted.

On the 14th day of the experiment, IL-10 levels decreased significantly and were almost normal in all experimental groups. In the control group, the IL-10 content was 4.6 ± 0.4 pg/ml, in experimental group No. 1 – 4.9 ± 0.3 pg/ml, and in experimental group No. 2 – 5.1 ± 0.2 pg/ml. The result was slightly higher in the group of animals that received local treatment of inflammatory wounds with hydrogel dressings saturated with silver ions and an antioxidant preparation (5.6 ± 0.1) pg/ml, but it did not differ statistically from the normal values and the control group. Therefore, it can be concluded that on the 14th day of the inflammatory process, IL-10 levels approach normal values and baseline homeostasis in all experimental animals.

Dynamics of the ratio between interleukin (IL-6 and IL-10) levels in rat blood plasma.

The task of determining the balance between pro- and anti-inflammatory reactivity of the body can be solved by applying the formula proposed by the author, the essence of which lies in the ratio of the pro-inflammatory cytokine interleukin-6 to the anti-inflammatory cytokine interleukin-10. With the help of this indicator, it is possible to clearly trace the phases of the inflammatory process, its peak, the period of subsidence, and the gradual return to normal. From the data obtained from intact animals, the ratio of IL-6 to IL-10 was calculated to be 1.625 IU. This result was taken as the norm for the pro-anti-inflammatory index in further research.

The results obtained on the third day of the study showed that pro-inflammatory reactions significantly prevailed in all experimental animal groups. The level of anti-inflammatory response was noticeably suppressed. At this stage of the experiment, the cytokine ratio was the highest ($p < 0.05$), although there were some significant differences between the groups. The indicator was particularly significant in the control group animals, which was 11 IU, which is 576.9% more than in intact animals, i.e., normal. Animals treated locally with hydrogel films also showed a significant predominance of pro-inflammatory processes – the indicators were almost identical in experimental groups 1 and 2: 5.868 ± 0.45 IU and 6.429 ± 0.60 IU, respectively. These indicators did not differ statistically significantly from each other. The lowest relative ratio of interleukins (IL-6 and IL-10) was in the third experimental group – 4.575 ± 0.43 IU, which is 181.5% higher than the norm ($p < 0.05$). The difference between this index and that of the control group animals is statistically significant: the prevalence of pro-inflammatory processes was 2.4 times higher than with the standard treatment regimen (table 3).

The most indicative data on the relative ratio of the inflammatory process were obtained on the seventh day of the study. A sharp decline was noted compared to the third day. The highest result was in the control group – 2.719 ± 0.55 IU, which clearly reflected the general ten-

Table 3 – Pro-anti-inflammatory index indicators in rat blood plasma ($M \pm m$, IU)

Research group	Research period, days			
	3rd	7th	10th	14th
Intact animals (n=10)	1,625±0,20			
Control group (n=10)	11,000±0,60*	2,719±0,55	2,102±0,45	1,870±0,28
Research group 1 (n=20)	5,868±0,45**	1,788±0,35	1,741±0,30	1,694±0,20
Research group 2 (n=20)	6,429±0,60**	1,897±0,45	1,745±0,23	1,647±0,23
Research group 3 (n=20)	4,575±0,43**	1,094±0,23*	1,191±0,25	1,549±0,15

Notes: * – there is a significant difference ($p < 0.05$) between the pro-anti-inflammatory index values in the blood plasma of rats and intact animals; ** – there is a significant difference ($p < 0.05$) between the pro-anti-inflammatory index values in the blood plasma of rats and the control group.

dency towards the equalization of pro- and anti-inflammatory reactions in the animals' bodies. The indicator in the control group exceeded that of intact animals by 67.3%, but differed significantly from the previous result – it was 4.05 times lower than on the third day. The results obtained in the first and second experimental groups did not differ statistically and were almost identical (1.788 ± 0.35 and 1.897 ± 0.45 IU). It is noteworthy that the indicators in these groups also hardly differed from those of intact animals, which indicates a positive result of the use of hydrogel dressings saturated with silver ions or an antioxidant preparation. However, if we calculate the pro- and anti-inflammatory balance in the third experimental group (1.094 ± 0.23 IU), it was even lower than normal on the seventh day, indicating a predominance of anti-inflammatory reactions in the body in response to damage. In other words, there was greater activation of the body's compensatory capabilities when using hydrogel dressings saturated with silver ions and an antioxidant preparation.

When evaluating the results of the ratio on the 10th day, there is a tendency towards its gradual decrease with equalization in all groups and to the normal value. In the control group (2.102 ± 0.45 IU), the first experimental group (1.741 ± 0.30 IU), and the second experimental group (1.745 ± 0.23 IU), a slight decrease was observed, which was not statistically significant compared to each other or to the indicator on the seventh day. The results indicate that, on the tenth day after the start of treatment, the body's anti-inflammatory defence mechanisms are strengthened, with parallel processes of inflammation subsiding. It should also be noted that in the test animals of the first and second groups, the cytokine pro-inflammatory ratio did not differ statistically significantly from the accepted norm in intact animals. From this, we can conclude that recovery in these animals occurred faster than in the control group animals. Upon analysing the results obtained in animals treated with hydrogel films saturated with a combination of silver ions and an antioxidant drug, we observe that the body's anti-inflammatory response prevails, as evidenced by a lower IL-6 to IL-10 ratio (1.191 ± 0.25 IU) compared to intact animals – 1.625 ± 0.20 IU.

The results obtained on the 14th day of the experiment did not differ statistically significantly from the norm in all groups of animals. In the control group, it was 1.870 ± 0.28 IU, in the first experimental group – 1.694 ± 0.20 IU, in the second experimental group – 1.647 ± 0.23 IU, and in the third – 1.549 ± 0.15 IU, respectively. That is, on day 14, we can state that the inflamma-

tory process in the experimental animals has completely subsided and the pro- and anti-inflammatory reactions at the cytokine level have been balanced.

The highest concentration of IL-6 was on the 3rd day of the inflammatory process. On the 7th and 10th days, a gradual decrease in the content of pro-inflammatory cytokine was recorded as the inflammatory reaction subsided, which correlates with the data of foreign authors [13, 14]. Regardless of the type of treatment, on the 14th day, the IL-6 level stabilized and approached normal in all groups of experimental animals. However, the use of hydrogel dressings saturated with silver and antioxidants, as proposed by the author, contributes to a decrease in pro-inflammatory interleukin to a level that is statistically indistinguishable from normal already on the 10th day. This confirms the results of foreign authors who studied the dynamics of IL-6 during the healing of inflammatory wounds [15, 16].

The IL-10 level on the third day was significantly lower than normal in all groups, with no significant differences between them. The smallest decrease in IL-10 content was recorded in the third experimental group – 4.0 ± 0.1 pg/ml, which was not statistically significantly different from normal. The results show that on the third day, inflammatory reactions are pronounced, and the compensatory anti-inflammatory response is suppressed. On the seventh day, the active launch of anti-inflammatory mechanisms and the compensatory anti-inflammatory response syndrome are induced. IL-10 begins to perform its function of suppressing the synthesis of other pro-inflammatory cytokines, which confirms data obtained from other sources [17]. A sharp increase in IL-10 content was observed in all animal groups. The largest increase in its content was recorded in the third experimental group – 9.6 ± 0.7 pg/ml. While on the 7th day of the inflammatory process, a sharp increase in IL-10 content was observed in animals, on the 10th and 14th days, a gradual decrease and approximation to normal values were noted. The result was slightly higher in the group of animals that received local treatment of inflammatory wounds with hydrogel dressings saturated with silver ions and an antioxidant preparation – 5.6 ± 0.1 pg/ml, but it did not differ statistically from the normal values and the control group.

Analysis of the dynamics of the pro- and anti-inflammatory balance showed that the most pronounced manifestation of the inflammatory process and suppression of the body's compensatory reactions was observed on the third day.

The most indicative data on the relative ratio of the inflammatory process were obtained on the seventh day

of the study. A sharp drop was noted compared to the third day. The highest result was in the control group – 2.719 ± 0.55 IU, which clearly reflected the general tendency towards the equalization of pro- and anti-inflammatory reactions in the animals' bodies. However, in the third experimental group, it was even lower (1.094 ± 0.23 IU) than the normal value, indicating a predominance of anti-inflammatory reactions of the body to damage when using hydrogel dressings saturated with silver ions and an antioxidant preparation.

On the 10th day, the body's anti-inflammatory defense mechanisms are strengthened, with parallel processes of inflammation subsiding. In the first (1.741 ± 0.30 IU), second (1.745 ± 0.23 IU), and third (1.191 ± 0.25 IU) experimental groups, the cytokine pro-inflammatory ratio did not differ statistically significantly from the accepted norm in intact animals. The results obtained on the 14th day of the experiment did not differ statistically significantly from the normal value in all experimental groups of animals and were consistent with the data presented in the works of other authors [17, 18]. That is, the recovery of animals treated with hydrogel films saturated with a combination of silver ions and an antioxidant drug was faster than in the control group animals.

Conclusions.

1. A sharp decrease in the pro-inflammatory cytokine response and activation of the compensatory anti-inflammatory response were observed on the seventh day of the inflammatory process. It should be noted that in rats treated with hydrogel films containing metal ions and an antioxidant drug, it was even lower than in intact animals under normal conditions. This indicates a significant positive effect on the activation of the anti-inflammatory response of the proposed films and a good therapeutic effect from their use.

2. The time to reach balance and approximation to normal anti-inflammatory processes is reduced in all animals treated with hydrogel films for local treatment, with a predominance of anti-inflammatory responses in animals of the third experimental group. This allows us to conclude that the local application of hydrogel dressings saturated with medicinal preparations reduces the duration of treatment of the inflammatory process.

Prospects for further research.

The results of the study can be used for further clinical research into the effectiveness of hydrogel dressings saturated with silver ions and antioxidant preparations for the local treatment of odontogenic abscesses and phlegmons.

DOI 10.29254/2077-4214-2025-3-178-202-213

УДК 616.155.3-097.37-07:615.262.1.454.1]-092.9

Огоновський Р. З., Мельничук Ю. М., Слободян Р. В.

АНАЛІЗ ДИНАМІКИ ВМІСТУ ПРО- ТА ПРОТИЗАПАЛЬНИХ ЦИТОКІНІВ У ПЛАЗМІ КРОВІ ПІДДОСЛІДНИХ ТВАРИН ПРИ МІСЦЕВОМУ ЗАСТОСУВАННІ ГІДРОГЕЛЕВИХ ПОВ'ЯЗОК

Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького (м. Львів, Україна)

Jurmelnichuk@gmail.com

Важливе місце у розвитку гострого запального процесу відіграють різні про- та протизапальні цитокіни. В залежності від впливу на запальні процеси інтерлейкіни поділяються на прозапальні (ІЛ-6) та протизапальні (ІЛ-10). Мета дослідження – аналіз динаміки про- та протизапальних цитокінів у

плазмі крові щурів в експерименті при застосуванні гідрогелевих пов'язок насичених іонами срібла та антиоксидантним препаратом для місцевого лікування запальних процесів. Експериментальне дослідження було проведено на 80 статевозрілих щурах-самцях. Вивчали загоєння експериментальної інфікованої рани при застосуванні гідрогелевих пов'язок насичених лікарськими речовинами. Визначення ефективності локальної терапії оцінювали за допомогою біохімічних методів. Аналіз динаміки про- та протизапального балансу показав, що найбільша маніфестація запального процесу та пригнічення компенсаторних реакцій організму спостерігається на 3-тю добу. Показовими дані відносного співвідношення перебігу запального процесу було отримані на 7-му добу. Найвищим був результат у групі контролю – $2,719 \pm 0,55$ у.о., що чітко відображав загальну тенденцію до вирівнювання про- та протизапальних реакцій в організмі тварин. Однак, у третій дослідній групі він був навіть менший ($1,094 \pm 0,23$ у.о.), ніж показник норми, що свідчить про переважання протизапальних реакцій організму на пошкодження при застосуванні гідрогелевих пов'язок, насичених іонами срібла та антиоксидантним препаратом. На 10-ту добу відбувається посилення протизапальних захисних механізмів організму з паралельними процесами стихання запальних явищ. Результати, отримані на 14-ту добу експерименту, статистично достовірно не відрізнялися від показника норми в усіх піддослідних групах тварин. Застосування гідрогелевих пов'язок дозволяє скоротити тривалість лікування запального процесу.

Ключові слова: гідрогелі, запальні процеси, цитокіни, інтерлейкін-6, інтерлейкін-10.

Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами.

Робота є фрагментом комплексної наукової теми «Удосконалення та впровадження методів реконструктивно-відновлювальних операцій та регенеративних технологій у щелепно-лицевій ділянці», номер державної реєстрації 0120U002134 кафедри хірургічної стоматології та щелепно-лицевої хірургії стоматологічного факультету ДНП «Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького».

Вступ.

Важливе місце у розвитку гострого запального процесу відіграють різні про- та протизапальні цитокіни. Зокрема, одним з відомих прозапальних цитокінів є інтерлейкін-6, який активує гени-мішені, що регулюють розвиток, диференціацію, апоптоз та проліферацію клітин. У свою чергу, інтерлейкін-10 є основним протизапальним цитокіном, який навіть у мінімальних концентраціях сприяє здійсненню ефектної регуляції клітинного гомеостазу шляхом пригнічення прозапальних цитокінів.

Інтерлейкіни – це цитокіни, які за своєю будовою є поліпептидами, що беруть участь у регулюванні захисних реакцій організму. Фізіологічні функції виконуються за рахунок специфічних клітин-рецепторів з високою афінністю. Через декілька годин після дії патогенів, макрофаги в ділянці вогнища запалення запускають синтез цитокінів, які активізують функції імунних клітин. При цьому відбувається каскад реакцій з вивільнення низькомолекулярних медіаторів запалення [1, 2, 3].

В залежності від впливу на запальні процеси інтерлейкіни поділяються на прозапальні та протизапальні [4]. Одним з прозапальних інтерлейкінів є інтерлейкін-6 (ІЛ-6), а основним протизапальним – інтерлейкін-10 (ІЛ-10).

Інтерлейкін-6 – (плейотропний) прозапальний цитокін з молекулярною масою 26 кДа, який синтезується імунними та стромальними клітинами, зокрема, макрофагами, ендотеліальними клітинами, фібробластами, Т- і В-лімфоцитами, дендритними клітинами. Активаторами синтезу ІЛ-6 є інтерлейкін-1, інтерлейкін-2, інтерферони та колоніестимулюючі фактори, а інгібіторами – інтерлейкін-4, інтерлейкін-10 і інтерлейкін-13 [5, 6].

Інтерлейкін-6 виконує аутокринну, паракринну і «гормоноподібну» регуляторну функцію різноманітних фізіологічних та патологічних процесів, зокрема і гострої фази запалення [7].

Інтерлейкін-10 є основним протизапальним цитокіном, який виконує свою функцію шляхом пригнічення синтезу прозапальних інтерлейкінів, таких як інтерлейкін-1 β , інтерлейкін-6, інтерлейкін-8, інтерлейкін-12, інтерферон- γ , інтерферон- α . Синтез ІЛ-10 відбувається Т-хелпер-2-лімфоцитами, В-лімфоцитами, моноцитами, макрофагами, кератиноцитами, опасистими клітинами, тимоцитами. Інгібіторами вироблення ІЛ-10 є моноцити, активовані ліпополісахаридами, а також інтерферони- γ . [8]. Він пригнічує ефекторні функції макрофагів, Т-кіллерів, нейтрофілів, синтез інтерферона- γ , стимулює В-клітинну проліферацію та дозрівання тимоцитів, хемотаксис. ІЛ-10 сприяє росту опасистих клітин, секреції імунoglobulinів. Тобто, головною функцією інтерлейкіну-10 є обмеження та пригнічення запального процесу [9].

Мета дослідження.

Аналіз динаміки про- та протизапальних цитокінів у плазмі крові щурів в експерименті при застосуванні гідрогелевих пов'язок насичених іонами срібла та антиоксидантним препаратом для місцевого лікування запальних процесів.

Об'єкт і методи дослідження.

Під час виконання цього дослідження дотримувались загальноприйнятих міжнародних норм і правил роботи з експериментальними тваринами, згідно з «Загальними етичними принципами експериментів на тваринах», схваленими III Національним конгресом у Києві 2007 р., та Гельсінкською декларацією: «Правила щодо використання експериментальних тварин у експериментальних дослідженнях» 1964-2000 рр.

Експериментальне дослідження проводили на базі віварію Львівського національного медичного університету імені Данила Галицького. Усіх тварин утримували згідно з Санітарними правилами по обслуштуванню, обладнанню та утриманню експериментально-біологічних клінік (віварію), де вони отримували стандартний харчовий раціон.

Експериментальне дослідження було проведено на 80 статевозрілих щурах-самцях лінії Вістар з масою від 150 до 200 грам.

Вивчали загоєння експериментальної інфікованої рани у піддослідних тварин при застосуванні гідрогелевих пов'язок насичених лікарськими речовинами. Для цього білим статевозрілим щурам-самцям лінії Вістар за добу до оперативного втручання проводили депіляцію на спині у міжлопатковій області. На депільованій ділянці після асептичної обробки висікалася ділянка шкіри з підшкірною жировою клітковиною розмірами 2×2 см до поверхневої фасції. Після цього в утворену рану вводили малеву паличку насичену культурою *Staphylococcus aureus*. Рану залишали відкритою. На третю добу у щурів формувалася повноцінна гнійна рана з усіма ознаками запалення [10].

Розподіл експериментальних груп тварин при вивченні особливостей перебігу гнійного ранового процесу був наступним:

- 1) інтактні тварини (10 щурів-самців);
- 2) контрольна група – тваринам вказаної групи рана промивалася 3% розчином H_2O_2 та накладалася стерильна мазева пов'язка з Левоміколем на третій день після її моделювання (10 щурів-самців);
- 3) дослідна група 1 – тваринам на третій день після моделювання рану промивали рану розчином H_2O_2 та накладали гідрогелеву пов'язку насичену іонами срібла (20 щурів-самців);
- 4) дослідна група 2 – тваринам на третій день після моделювання рану розчином H_2O_2 та накладали гідрогелеву пов'язку насичену препаратом антиоксидантної дії «Кверцетин» (20 щурів-самців);
- 5) дослідна група 3 – тваринам цієї групи, на третій після моделювання інфікованої рани проводили обробку рани розчином H_2O_2 та накладали гідрогелеву пов'язку насичену іонами срібла та препаратом антиоксидантної дії «Кверцетин» (20 щурів-самців).

Усі гідрогелі фіксували до ран на спині тварин за допомогою марлевого бинта для запобігання їх зміщення та злизуванню тваринами.

Визначення ефективності запропонованої локальної терапії оцінювали за допомогою біохімічних методів. В якості показника норми при аналізі лабораторних показників прийнято вважати показники інтактних тварин, яким не моделювали інфіковану рану. Виводили тварин з експерименту на 3, 7, 10, 14 добу. Для біохімічних досліджень брали кров із шийних судин.

Для вивчення динаміки інтерлейкінів (ІЛ-6 та ІЛ-10) у щурів забирали кров у вказані терміни та центрифугували при 3000 обертів на хвилину впродовж 10 хвилин. Використовували тестові системи Rat IL-1B ELISA BMS630 и Rat IL-10 ELISA BMS629 (Bender MedSystem, Vienna, Austria) з фіксованими антитілами (поліклональними – для ІЛ-6, моноклональними – для ІЛ-10). Проводили інкубацію впродовж двох годин з біотинконюгатом. Промивали планшети від біотинконюгату та додавали стрептовідин-HRP, після чого проводили інкубацію впродовж 1 години. Після цього промивали лунки планшету та інкубували 10 хвилин вміст лунок з розчином тетраметилбидина з подальшим фарбуванням. Концентрація інтерлейкінів вимірювалася в пг/мл [11, 12].

Співвідношення між вмістом інтерлейкінів (ІЛ-6 та ІЛ-10) у плазмі крові щурів визначали шляхом розрахунку відношення отриманих даних вмісту інтерлейкіну-6 щодо вмісту інтерлейкіну-10 у плазмі крові щурів у даний термін спостереження.

$$\text{Баланс про-протизапальної реактивності організму} = \frac{\text{ІЛ-6}}{\text{ІЛ-10}}$$

Математико-статистичну обробку отриманих результатів досліджень проводили методами описової та аналітичної статистики. Враховуючи те, що всі досліджувані дані носили характер варіаційних рядів із нормальним (гаусівським) розподілом, при описі результатів застосовували середнє арифметичне значення та його стандартну похибку ($M \pm m$). Порівняння середніх величин у різних групах здійснювали за допомогою непарного, у пов'язаних групах – парного *t*-критерію Стьюдента. Показники частот представлені із середньою похибкою ($P \pm m_p$, %), суттєвість різниці між ними визначали за критерієм Пірсона (χ^2). Різницю поміж порівнюваними групами вважали достовірною при $p < 0,05$.

Результати дослідження та їх обговорення.

Результати вмісту інтерлейкіну-6 у плазмі крові щурів.

Інтерлейкін-6 відноситься до прозапальних цитокінів, які беруть безпосередню участь у регуляції запального процесу. Активне вивільнення ІЛ-6 слугує надійним та достовірним маркером активності запальних процесів в організмі. Вивчення динаміки вмісту інтерлейкіну-6 у плазмі крові піддослідних тварин дозволяє оцінити корегуючий вплив застосовуваного виду лікування. ІЛ-6 є потужним фактором стимуляції запалення, що проявляється його зростанням на початкових етапах патологічного процесу.

Отож, аналізуючи отримані дані, можна відмітити, що на *третю* добу експерименту концентрація ІЛ-6 у плазмі крові значно перевищувала показник інтактних тварин ($7,8 \pm 0,4$ пг/мл) в усіх групах ($p < 0,05$), у яких був змодельований запальний процес (**табл 1**). Очікувано, найбільше зростання було відмічено у тварин контрольної групи ($26,4 \pm 2,2$ пг/мл). Статистично достовірної різниці не виявлено між тваринами першої та другої дослідних групи – $22,3 \pm 1,7$ пг/мл та $22,5 \pm 2,1$ пг/мл відповідно. Найменше зростання вмісту ІЛ-6 відносно інтактних тварин та групи контролю, було отримано у тварин третьої дослідної групи, яким для місцевого лікування гнійно-запальних ран використовували гідрогелеві пов'язки, насичені іонами срібла та препаратом антиоксидантної дії – $18,3 \pm 1,6$ пг/мл.

Оцінюючи результати на *сьому* добу експерименту, відмічали, що в усіх групах піддослідних тварин відбувалося зниження вмісту ІЛ-6 в порівнянні з показниками третьої доби. Найменш помітна динаміка серед усіх тварин з ранами спостерігалася у групі контролю ($17,4 \pm 1,9$ пг/мл). Статистично достовірне та значне зменшення вмісту ІЛ-6 відносно попереднього дослідження та показників групи контролю, фіксували у тварин, яким застосовували гідрогелі з іонами срібла (дослідна група № 1) – $14,3 \pm 0,9$ пг/мл та гідрогелі, насичені антиоксидантним препаратом (дослідна група № 2) – $14,8 \pm 1,2$ пг/мл ($p < 0,05$). Найбільш зниження ІЛ-6 фіксувалося у тварин третьої дослідної групи – $10,5 \pm 0,7$ пг/мл ($p < 0,05$), що характеризує позитивний комплексний вплив складових гідрогелевих пов'язок, якими проводилося місцеве лікування тварин даної групи.

На *10-ту* добу експерименту продовжували відмічати поступове зниження концентрації ІЛ-6 у плазмі

крові щурів. У контрольній групі – 10,3±1,3 пг/мл, що, однак, все одно не відповідає показникам інтактних тварин (7,8±0,8 пг/мл), тобто, показнику норми. У дослідних групах № 1 та № 2 фіксувалося поступове наближення до показників інтактних тварин, статистично нижче відносно групи контролю – 9,4±0,8 пг/мл та 9,6±0,7 пг/мл (p<0,05). Найбільш близькими до рівня інтактних тварин були дані у дослідній групі №3 – 8,1±0,8 пг/мл.

Значення вмісту ІЛ-6 на 14-ту добу експерименту в усіх групах тварин було близьким до рівня інтактних тварин, який був прийнятний за норму – 7,5±0,3 пг/мл. Так, у контрольній групі показники найбільш відрізнялися від норми (8,6±0,7 пг/мл), проте, без статистичної похибки. У дослідній групі № 1 рівень ІЛ-6 становив 8,3±0,5 пг/мл, що менше, ніж у контрольній групі та наближається до показників інтактних тварин. Схожа ситуація у дослідній групі № 2 – 8,4±0,7 пг/мл. Статистично достовірно не відрізнявся від показника норми рівень ІЛ-6 у третій дослідній групі – 7,9±0,5 пг/мл.

Результати вмісту інтерлейкіну-10 у плазмі крові щурів.

Інтерлейкін-10 виконує свою функцію шляхом пригнічення синтезу інших прозапальних цитокінів. Він є основним протизапальним цитокіном, від активності якого залежать поширеність, маніфестація та терміни запального процесу. В залежності від динаміки вмісту ІЛ-10, можна оцінити стан опірності організму та системної відповіді на патологічний процес (табл. 2).

За показник норми інтерлейкіну-10 у щурів у плазмі крові, було взято результати у групі інтактних тварин (4,8±0,4 пг/мл). На третю добу експерименту рівень ІЛ-10 був нижче норми в усіх тварин, у яких був змодельований гнійно-запальний процес у м'яких тканинах. Проте між різними експериментальними групами спостерігалися достовірні відмінності. Рівень ІЛ-10 у контрольній групі був майже у два рази нижчий (2,4±0,2 пг/мл), ніж у інтактних тварин (p<0,05). Також суттєве зниження відмічали у тварин першої дослідної групи (3,8±0,1 пг/мл) та тварин другої дослідної групи (3,5±0,3 пг/мл) (p<0,05). Проте статистично достовірної різниці між показниками цих груп не було. Найменш суттєве падіння вмісту ІЛ-10 фіксували у третій дослідній групі – 4,0±0,1 пг/мл, яке статистично недостовірно відрізнялося від норми. З отриманих результатів видно, що на третю добу запальні реакції яскраво виражені, а компенсаторна протизапальна відповідь пригнічена.

Результати на 7-му добу експерименту кардинально відрізнялися від попередніх, отриманих на третю добу. В усіх групах тварин фіксували різке зростання вмісту ІЛ-10. У групі контролю виявлено помітне зростання порівняно з результатом третьої доби – 6,4±0,3 пг/мл (p<0,05). У дослідній групі № 1 також статистично достовірне зростання в порівнянні з третьою добою експерименту – 8,0±0,5 пг/мл (p<0,05). У дослідній групі № 2 вміст ІЛ-10 також був статистично достовірно

Таблиця 1 – Динаміка вмісту інтерлейкіну-6 у плазмі крові експериментальних тварин (M±m, пг/мл)

Група дослідження	Термін дослідження, доба			
	3-тя	7-а	10-а	14-а
Інтактні тварини (n=10)	7,8±0,4			
Контрольна група (n=10)	26,4±2,2*	17,4±1,9*	10,3±1,3	8,6±0,7
Дослідна група 1 (n=20)	22,3±1,7*	14,3±0,9*	9,4±0,8	8,3±0,5
Дослідна група 2 (n=20)	22,5±2,1*	14,8±1,2*	9,6±0,7*	8,4±0,7
Дослідна група 3 (n=20)	18,3±1,6**	10,5±0,7**	8,1±0,8	7,9±0,5

Примітки: * – наявна достовірна різниця (p<0,05) між показниками вмісту інтерлейкіну-6 у плазмі крові щурів відносно інтактних тварин; ** – наявна достовірна різниця (p<0,05) між показниками вмісту інтерлейкіну-6 у плазмі крові щурів відносно контрольної групи.

більшим (7,8±0,6 пг/мл, p<0,05), ніж на третю добу. Обидва результати у дослідних групах № 1 та № 2 є майже у два рази вищими, ніж у інтактних тварин, у яких показник на 7-му добу становив 4,8±0,4 пг/мл. Найбільше зростання вмісту ІЛ-10 фіксували у третій дослідній групі – 9,6±0,7 пг/мл. Цей результат був статистично достовірно вищим (p<0,05), ніж у інтактних тварин, контрольної групи та порівняно з показником на третю добу. Отже, на сьому добу ініціюються компенсаторні реакції організму шляхом посиленого синтезу протизапальних медіаторів та інгібіторів синтезу прозапальних цитокінів.

Якщо на сьому добу запального процесу у тварин виявляли бурхливе зростання вмісту ІЛ-10, то на 10-ту добу відмічалось поступове його зниження. Так, у групі контролю показник ІЛ-10 майже наближався до показника норми (4,9±0,5 пг/мл) та статистично від нього не відрізнявся (p>0,05). Схожа картина спостерігала у першій (5,4±0,4 пг/мл) та другій (5,5±0,2 пг/мл) дослідних групах. Результати у цих групах продовжували перевищувати норму, проте статистично не відрізнялися від неї та від групи контролю. У третій дослідній групі також фіксували зниження (6,8±0,2 пг/мл) вмісту ІЛ-10 у порівнянні з сьомою добою, проте, статистично достовірне вище значення (p<0,05), ніж у групі контролю. Як видно з отриманих результатів, в усіх тварин із запальним процесом продовжується активне вивільнення та продукція протизапальних цитокінів, про що свідчать вищі результати, ніж у інтактних тварин, проте, в порівнянні з попередніми результатами можна відмітити поступове зниження та наближення до норми.

На 14-ту добу експерименту показники ІЛ-10 значно знизилися та майже не відрізнялися від норми в усіх дослідних групах. У контрольній групі вміст ІЛ-10 становив 4,6±0,4 пг/мл, у дослідній групі

Таблиця 2 – Динаміка вмісту інтерлейкіну-10 у плазмі крові експериментальних тварин (M±m, пг/мл)

Група дослідження	Термін дослідження, доба			
	3-тя	7-а	10-а	14-а
Інтактні тварини (n=10)	4,8±0,4			
Контрольна група (n=10)	2,4±0,2*	6,4±0,3*	4,9±0,5	4,6±0,4
Дослідна група 1 (n=20)	3,8±0,1**	8,0±0,5**	5,4±0,4	4,9±0,3
Дослідна група 2 (n=20)	3,5±0,3**	7,8±0,6**	5,5±0,2	5,1±0,2
Дослідна група 3 (n=20)	4,0±0,1*	9,6±0,2**	6,8±0,2**	5,1±0,1

Примітки: * – наявна достовірна різниця (p<0,05) між показниками вмісту інтерлейкіну-10 у плазмі крові щурів відносно інтактних тварин; ** – наявна достовірна різниця (p<0,05) між показниками вмісту інтерлейкіну-10 у плазмі крові щурів відносно контрольної групи.

Таблиця 3 – Показники про-протизапального індексу у плазмі крові щурів (M±m, у.о.)

Група дослідження	Термін дослідження, доба			
	3-тя	7-а	10-а	14-а
Інтактні тварини (n=10)	1,625±0,20			
Контрольна група (n=10)	11,000±0,60*	2,719±0,55	2,102±0,45	1,870±0,28
Дослідна група 1 (n=20)	5,868±0,45**	1,788±0,35	1,741±0,30	1,694±0,20
Дослідна група 2 (n=20)	6,429±0,60**	1,897±0,45	1,745±0,23	1,647±0,23
Дослідна група 3 (n=20)	4,575±0,43**	1,094±0,23#	1,191±0,25	1,549±0,15

Примітки: * – наявна достовірна різниця (p<0,05) між показниками про-протизапального індексу у плазмі крові щурів відносно інтактних тварин; # – наявна достовірна різниця (p<0,05) між показниками про-протизапального індексу у плазмі крові щурів відносно контрольної групи.

№ 1 – 4,9±0,3 пг/мл, дослідній групі №2 – 5,1±0,2 пг/мл. Дещо вищим був результат у групі тварин, яким для місцевого лікування запальних ран застосовували гідрогелеві пов'язки, насичені іонами срібла та антиоксидантним препаратом (5,6±0,1) пг/мл, проте він статистично не відрізнявся від показників норми та групи контролю. Отож, можна зробити висновок, що на 14-ту добу розвитку запального процесу показники ІЛ-10 наближаються до показників норми та вихідного гомеостазу в усіх піддослідних тварин.

Динаміка співвідношення між вмістом інтерлейкінів (ІЛ-6 та –ІЛ-10) у плазмі крові щурів.

Завдання визначення балансу між про- та проти-запальною реактивністю організму можна вирішити, застосувавши запропоновану автором формулу, суть якої полягає у співвідношенні показника прозапального цитокіну – інтерлейкіну-6 до протизапального – інтерлейкіну-10. За допомогою вказаного показника можна чітко прослідкувати фазовість запального процесу, його пік, період стихання та поступове повернення до норми. З отриманих даних інтактних тварин виведено результат співвідношення ІЛ-6 до ІЛ-10, який становив 1,625 у.о. Цей результат було взято за норму про- протизапального індексу у подальшому дослідженні.

Отримані результати на *третьо* добу дослідження показали, що в усіх групах піддослідних тварин значно переважали прозапальні реакції. Рівень протизапального реагування був помітно пригнічений. На цьому етапі експерименту показник цитокінового співвідношення був найбільшим (p<0,05), проте з певними суттєвими відмінностями між групами. Особливо значним був показник у тварин групи контролю, який становив 11 у.о., що на 576,9% більше, ніж у інтактних тварин, тобто в нормі. У тварин, яким для місцевого лікування використовували гідрогелеві плівки, також відмічалось значне переважання прозапальних процесів – майже однакові показники були у дослідній групі № 1 та № 2: 5,868±0,45 у.о. та 6,429±0,60 у.о. відповідно. Між собою ці показники статистично достовірно не відрізнялися. Найменшим показник відносного співвідношення інтерлейкінів -(ІЛ-6 та –ІЛ-10) був у третій дослідній групі – 4,575±0,43 у.о., що на 181,5% більше, ніж у показника, прийнятого за норму (p<0,05). Статистично достовірною є різниця при порівнянні вказаного індексу з тваринами групи контролю – у 2,4 рази більшим було виражено переважання прозапальних процесів, ніж при лікуванні загальноприйнятною схемою лікування (табл. 3).

Найбільш показовими дані відносно-го співвідношення перебігу запального процесу було отримано на *сьому* добу дослідження. Відмічено різке падіння порівняно з третьою добою. Найвищим був результат у групі контролю – 2,719±0,55 у.о., що чітко відображав загальну тенденцію до вирівнювання прота протизапальних реакцій в організмі тварин. Показник у групі контролю перевершував показник інтактних тварин на 67,3%, проте дуже суттєво відрізнявся від результату попереднього – у 4,05 рази менший, ніж на третю добу. Результати, отримані у першій та другій дослідних групах, статистичної різниці між собою не мали та майже не відрізнялися (1,788±0,35 та 1,897±0,45 у.о.). Характерно, що показники в цих групах також майже не відрізнялися від показників інтактних тварин, що свідчить про позитивний результат застосування гідрогелевих пов'язок, насичених іонами срібла або антиоксидантним препаратом. Однак, якщо вираховувати про- та протизапальний баланс у третій дослідній групі (1,094±0,23 у.о.), то він на *сьому* добу був навіть менший, ніж показник норми, що свідчить про переважання протизапальних реакцій організму на пошкодження. Тобто, відбувалася більша активація компенсаторних можливостей організму при застосуванні гідрогелевих пов'язок, насичених іонами срібла, і антиоксидантним препаратом.

При оцінці результатів співвідношення на *10-ту* добу, то прослідковується тенденція до поступового його зниження з вирівнюванням в усіх групах та до значення норми. У контрольній групі (2,102±0,45 у.о.), у першій дослідній групі (1,741±0,30 у.о.), другій дослідній групі (1,745±0,23 у.о.) фіксувалося незначне зниження, яке статистично не відрізнялося між собою та в порівнянні з показником на *сьому* добу. Отримані показники свідчать про те, що на *десяту* добу після початку лікування запального процесу відбувається посилення протизапальних захисних механізмів організму з паралельними процесами стихання запальних явищ. Також слід зауважити, що у піддослідних тварин першої та другої групи цитокінове про- протизапальне співвідношення статистично достовірно не відрізнялося від прийнятого показника норми у інтактних тварин. З цього можна зробити висновок, що видужання у цих тварин наставало швидше, ніж у тварин групи контролю. Якщо аналізувати результати, отримані у тварин, яким застосовували гідрогелеві плівки, насичені комбінацією з іонів срібла та антиоксидантним препаратом, то отримано навіть переважання показника протизапальної реакції організму, що проявляється у нижчому співвідношенні ІЛ-6 до ІЛ-10 (1,191±0,25 у.о.) ніж у інтактних тварин – 1,625±0,20 у.о.

Результати, одержані на *14-ту* добу експерименту статистично достовірно не відрізнялися від показника норми в усіх піддослідних групах тварин. У тварин групи контролю він становив 1,870±0,28 у.о., у першій дослідній групі – 1,694±0,20 у.о., у другій дослідній групі – 1,647±0,23 у.о., у третій – 1,549±0,15 у.о. відповідно. Тобто, на *14-* добу можна констатувати повне стихання запального процесу у піддослід-

них тварин та вирівнювання про- та протизапальних реакцій на цитокиновому рівні.

Найвищою концентрація ІЛ-6 була на 3-тю добу запального процесу. На 7-му та 10-ту доби фіксувалося поступове зниження вмісту прозапального цитокину по мірі затихання запальної реакції, що корелюється з даними досліджень закордонних авторів [13, 14] Незалежно від виду лікування на 14-ту добу рівень ІЛ-6 стабілізувався та наблизився до норми в усіх групах піддослідних тварин. Проте застосування запропонованих автором гідрогелевих пов'язок, насичених сріблом та антиоксидантом, сприяє зниженню прозапального інтерлейкіну до показника, що статистично не відрізняється від норми вже на 10-ту добу. Це підтверджує результати закордонних авторів, які вивчали динаміку ІЛ-6 впродовж загоєння ран запального характеру [15, 16].

Рівень ІЛ-10 на третю добу був значно нижчий від показника норми в усіх групах без суттєвих відмінностей між собою. Найменше падіння вмісту ІЛ-10 фіксували у третій дослідній групі – $4,0 \pm 0,1$ пг/мл, яке статистично недостовірно відрізнялося від норми. З отриманих результатів видно, що на 3-тю добу запальної реакції яскраво виражені, а компенсаторна протизапальна відповідь пригнічена. На 7-му добу індукується активний запуск протизапальних механізмів та синдром компенсаторної протизапальної відповіді. ІЛ-10 починає виконувати свою функцію пригнічення синтезу інших прозапальних цитокинів, що підтверджує отримані з інших джерел дані [17]. В усіх групах тварин фіксували різке зростання вмісту ІЛ-10. Найбільше зростання його вмісту фіксували у третій дослідній групі – $9,6 \pm 0,7$ пг/мл. Якщо на 7-му добу запального процесу у тварин відмічали бурхливе зростання вмісту ІЛ-10, то на 10-ту та 14-ту добу відмічалось поступове його зниження та наближення до норми. Дещо вищим був результат у групі тварин, яким для місцевого лікування запальних ран застосовували гідрогелеві пов'язки, насичені іонами срібла та антиоксидантним препаратом – $5,6 \pm 0,1$ пг/мл, проте, він статистично не відрізнявся від показників норми та групи контролю.

Аналіз динаміки про- та протизапального балансу показав, що найбільша маніфестація запального процесу та пригнічення компенсаторних реакцій організму спостерігається на 3-тю добу.

Найбільш показовими дані відносного співвідношення перебігу запального процесу було отримані на 7-му добу дослідження. Відмічено різке падіння порівняно з 3-ю добою. Найвищим був результат у групі контролю – $2,719 \pm 0,55$ у.о., що чітко відображав

загальну тенденцію до вирівнювання про- та протизапальних реакцій в організмі тварин. Однак, у третій дослідній групі він був навіть менший ($1,094 \pm 0,23$ у.о.), ніж показник норми, що свідчить про переважання протизапальних реакцій організму на пошкодження при застосуванні гідрогелевих пов'язок, насичених іонами срібла та антиоксидантним препаратом.

На 10-ту добу відбувається посилення протизапальних захисних механізмів організму з паралельними процесами стихання запальних явищ. У першій ($1,741 \pm 0,30$ у.о.), другій ($1,745 \pm 0,23$ у.о.) та третій ($1,191 \pm 0,25$ у.о) дослідних групах цитокинове про- протизапальне співвідношення статистично достовірно не відрізнялося від прийнятого показника норми у інтактних тварин. Результати, отримані на 14-ту добу експерименту, статистично достовірно не відрізнялися від показника норми в усіх піддослідних групах тварин, а також узгоджувалися з даними, наведеними у працях інших авторів [17, 18]. Тобто, вивчення тварин, яким застосовували гідрогелеві плівки, насичені комбінацією іонів срібла з антиоксидантним препаратом, наступало швидше, ніж у тварин групи контролю.

Висновки.

1. Різке зниження прозапальної цитокинової реакції та активація компенсаторної протизапальної відповіді відмічалися на сьому добу запального процесу. Слід зауважити, що у щурів, яким застосовували гідрогелеві плівки з іонами металу та препаратом антиоксидантної дії, був, навіть, меншим, ніж у інтактних тварин в нормі. Це свідчить про значний позитивний вплив на активацію протизапальної реакції запропонованих плівок та хороший терапевтичний ефект від їх застосування.

2. Термін настання балансу та наближення до норми про- протизапальних процесів скорочується в усіх тварин, яким застосовували для місцевого лікування гідрогелеві плівки, з переважанням протизапальних відповідей у тварин третьої дослідної групи. Це дозволяє зробити висновок, що місцеве застосування гідрогелевих пов'язок, насичених лікарськими препаратами, дозволяє скоротити тривалість лікування запального процесу.

Перспективи подальших досліджень.

Результати дослідження можуть бути використані для подальшого клінічного вивчення ефективності застосування гідрогелевих пов'язок насичених іонами срібла та антиоксидантним препаратом для місцевого лікування одонтогенних абсцесів та флегмон.

References / Література

- Lau SY, Guild SJ, Barrett CJ, Chen Q, McCowan L, Jordan V, et al. Tumor necrosis factor-alpha, interleukin-6, and interleukin-10 levels are altered in preeclampsia: a systematic review and meta-analysis. *Am J Reprod Immunol.* 2013;70(5):412-27. DOI: [10.1111/aji.12138](https://doi.org/10.1111/aji.12138).
- Wei H, Li B, Sun A, Guo F. Interleukin-10 Family Cytokines Immunobiology and Structure. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1172:79-96. DOI: [10.1007/978-981-13-9367-9_4](https://doi.org/10.1007/978-981-13-9367-9_4).
- Weston LL, Jiang Sh, Chisholm D, Jantzie LL, Bhaskar K. Interleukin-10 deficiency exacerbates inflammation-induced tau pathology. *J Neuroinflammation.* 2021;18(1):161. DOI: [10.1186/s12974-021-02211-1](https://doi.org/10.1186/s12974-021-02211-1).
- Ananieva M, Chumak Yu, Loban H, Faustova M. Doslidzhennia protymikrobnoi dii dekasanu khlorheksydynu ta iodoformu na standartni shtamy mikroorhanizmiv. *Aktualni probl. suchasnoi medytsyny.* 2021;21(3):190-5. [in Ukrainian].
- Kang S, Narazaki M, Metwally H, Kishimoto T. Historical overview of the interleukin-6 family cytokine. *J Exp Med.* 2020;217(5):e20190347. DOI: [10.1084/jem.20190347](https://doi.org/10.1084/jem.20190347).
- Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014;6(10):a016295. DOI: [10.1101/cshperspect.a016295](https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016295).
- Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta.* 2011;1813(5):878-88. DOI: [10.1016/j.bbamcr.2011.01.034](https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.01.034).

8. Renner V, Joraschky P, Kirschbaum C, Schellong J, Petrowski K. Pro- and anti-inflammatory cytokines Interleukin-6 and Interleukin-10 predict therapy outcome of female patients with posttraumatic stress disorder. *Transl Psychiatry*. 2022;12(1):472. DOI: [10.1038/s41398-022-02230-3](https://doi.org/10.1038/s41398-022-02230-3).
9. Tkachenko PI, Vesnina LE, Dobroskok VO, Mykytiuk MV. Riven prozapalnykh i protyzapalnykh interleukiniv u syrovattsi krovi pry hostromu hniinomu limfadeniti ta hostromu odontohennomu osteomieliiti nyzhnioi schelepy u ditei. *Ukr. Stomatol. Alm*. 2013;2:83-5. [in Ukrainian].
10. Huliuk AH, Pedchenko DM. Osoblyvosti diahnostryky ta perynnoi khirurhichnoi obrobky rany u postrazhdalykh z vohnepalnymy poranennyamy schelepno-lytsovoi dilanky. *Visnyk stomatolohii*. 2022;4((121)46):41-46. [in Ukrainian].
11. García-Juárez M, Camacho-Morales A. Defining the Role of Anti- and Pro-inflammatory Outcomes of Interleukin-6 in Mental Health. *Neuroscience*. 2022;492:32-46. DOI: [10.1016/j.neuroscience.2022.03.020](https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2022.03.020).
12. Ma L, Nidadavolu LS, Yang H, Langdon J, Westbrook R, Tsui BMW, et al. Targeted Deletion of Interleukin-6 in a Mouse Model of Chronic Inflammation Demonstrates Opposing Roles in Aging: Benefit and Harm. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2021;76(2):211-5. DOI: [10.1093/gerona/glaa156](https://doi.org/10.1093/gerona/glaa156).
13. Xu MX, Liu G, Cao LJ, Bai XF, Kang L, Zhao X, et al. Association of non-thyroidal illness syndrome with interleukin-6 and interleukin-10 in critically ill children with sepsis. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi*. 2020;22(11):1215-20. DOI: [10.7499/j.issn.1008-8830.2004137](https://doi.org/10.7499/j.issn.1008-8830.2004137).
14. De Barros AGC, Cristante AF, dos Santos GB, Natalino RJM, Ferreira RJR, de Barros-Filho TEP. Evaluation of the effects of erythropoietin and interleukin-6 in rats submitted to acute spinal cord injury. *Clinics (Sao Paulo)*. 2019;74:e674. DOI: [10.6061/clinics/2019/e674.2019;74:e674](https://doi.org/10.6061/clinics/2019/e674.2019;74:e674).
15. Ertá M, Quintana A, Hidalgo J. Interleukin-6, a major cytokine in the central nervous system. *Int J Biol Sci* 2012;8(9):1254-66. DOI: [10.7150/ijbs.4679](https://doi.org/10.7150/ijbs.4679).
16. Harsono AD, Prasetyono ThOH, Dilogo IH. The Role of Interleukin 10 in Keloid Therapy: A Literature Review. *Ann Plast Surg*. 2022;88(6):617-21. DOI: [10.1097/SAP.0000000000003044](https://doi.org/10.1097/SAP.0000000000003044).
17. Stanjek-Cichoracka A, Woźniak-Grygiel E, Łaszewska A, Staćel T, Perć K, Zembala M, et al. Interleukin 6 and Interleukin 10 in Patients Before and After Lung Transplantation. *Transplant Proc*. 2020;52(7):2098-100. DOI: [10.1016/j.transproceed.2020.02.090](https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2020.02.090).
18. Wiener CD, Moreira FP, Portela LV, Strogulski NR, Lara DR, da Silva RA, et al. Interleukin-6 and Interleukin-10 in mood disorders: A population-based study. *Psychiatry Res*. 2019;273:685-9. DOI: [10.1016/j.psychres.2019.01.100](https://doi.org/10.1016/j.psychres.2019.01.100).

АНАЛІЗ ДИНАМІКИ ВМІСТУ ПРО- ТА ПРОТИЗАПАЛЬНИХ ЦИТОКІНІВ У ПЛАЗМІ КРОВІ ПІДДОСЛІДНИХ ТВАРИН ПРИ МІСЦЕВОМУ ЗАСТОСУВАННІ ГІДРОГЕЛЕВИХ ПОВ'ЯЗОК

Огоновський Р. З., Мельничук Ю. М., Слободян Р. В.

Резюме. Інтерлейкін-6, активує гени-мішені, що регулюють розвиток, диференціацію, апоптоз та проліферацію клітин. Інтерлейкін-10 є основним протизапальним цитокіном, який здійснює ефективну регуляцію клітинного гомеостазу шляхом пригнічення прозапальних цитокінів.

Мета дослідження. Аналіз динаміки про- та протизапальних цитокінів у плазмі крові щурів в експерименті при застосуванні гідрогелевих пов'язок насичених іонами срібла та антиоксидантним препаратом для місцевого лікування запальних процесів.

Об'єкт і методи дослідження. Експериментальне дослідження було проведено на 80 статевозрілих щурах-самцях лінії Вістар з масою від 150 до 200 грам. Для цього визначали вміст інтерлейкінів -6 і -10.

Результати. Отримані результати на третю добу дослідження показали, що в усіх групах піддослідних тварин значно переважали прозапальні реакції. У тварин, яким для місцевого лікування використовували гідрогелеві плівки, також відмічалось значне переважання прозапальних процесів – майже однакові показники були у дослідній групі № 1 та № 2: $5,868 \pm 0,45$ у.о. та $6,429 \pm 0,60$ у.о. відповідно. Між собою ці показники статистично достовірно не відрізнялися. Найменшим показник відносного співвідношення інтерлейкінів – (ІЛ-6 та –ІЛ-10) був у третій дослідній групі – $4,575 \pm 0,43$ у.о. На сьому добу дослідження відмічено різке падіння порівняно з третьою добою. При оцінці результатів співвідношення на 10-ту добу, то прослідковується тенденція до поступового його зниження з вирівнюванням в усіх групах та до значення норми. У контрольній групі ($2,102 \pm 0,45$ у.о.), у першій дослідній групі ($1,741 \pm 0,30$ у.о.), другій дослідній групі ($1,745 \pm 0,23$ у.о.). Результати, одержані на 14-ту добу експерименту статистично достовірно не відрізнялися від показника норми в усіх піддослідних групах.

Висновки. Термін настання балансу та наближення до норми про- протизапальних процесів скорочується у тварин, яким застосовували для місцевого лікування гідрогелеві плівки. Це дозволяє зробити висновок, що їх місцеве застосування дозволяє скоротити тривалість лікування запального процесу.

Ключові слова: гідрогелі, запальні процеси, цитокіни, інтерлейкін-6, інтерлейкін-10.

DYNAMICS OF PRO- AND ANTI-INFLAMMATORY CYTOKINE LEVELS IN THE BLOOD PLASMA OF EXPERIMENTAL ANIMALS FOLLOWING TOPICAL APPLICATION OF HYDROGEL DRESSINGS

Ogonovskiy R. Z., Melnychuk Yu. M., Slobodian R. V.

Abstract. Interleukin-6 (IL-6) plays a central role in activating target genes that regulate cell proliferation, differentiation, apoptosis, and survival. Interleukin-10 (IL-10) is a key anti-inflammatory cytokine that maintains cellular homeostasis primarily by suppressing pro-inflammatory mediators.

The aim of the study. To evaluate the temporal dynamics of pro- and anti-inflammatory cytokines in rat plasma following experimental application of hydrogel dressings enriched with silver ions and an antioxidant agent for local management of inflammatory processes.

Object and research methods. An experimental study was conducted in 80 adult male Wistar rats (150-200 g). Animals were divided into experimental and control groups. Plasma concentrations of IL-6 and IL-10 were quantified on days 3, 7, 10, and 14.

Results. On day 3, pro-inflammatory responses predominated across all groups. Rats treated with hydrogel films demonstrated marked pro-inflammatory activity, with comparable IL-6/IL-10 ratios in experimental groups 1 and 2 (5.868 ± 0.45 a.u. and 6.429 ± 0.60 a.u., respectively; $p > 0.05$). The lowest ratio was observed in group 3 (4.575 ± 0.43 a.u.). By day 7, a sharp decline in the IL-6/IL-10 ratio was observed relative to day 3. On day 10, a gradual normalization was noted across all groups, with values approaching physiological levels: control group – 2.102 ± 0.45 a.u., group

1 – 1.741±0.30 a.u., group 2 – 1.745±0.23 a.u. By day 14, cytokine levels did not differ significantly from baseline physiological values in any of the experimental groups.

Conclusions. Local application of hydrogel films accelerated normalization of the IL-6/IL-10 balance, suggesting their therapeutic potential in reducing the duration of inflammatory processes and promoting faster recovery.

Key words: hydrogels, inflammation, cytokines, interleukin-6, interleukin-10.

ORCID and contributionship / ORCID кожного автора та його внесок до статті:

Ogonovskiy R. Z.: <https://orcid.org/0000-0003-0959-0863>^{AEF}

Melnichuk Yu. M.: <https://orcid.org/0000-0002-8434-3419>^{ACDE}

Slobodian R. V.: <https://orcid.org/0000-0002-8496-7782>^{BCD}

Conflict of interest / Конфлікт інтересів:

The authors confirm that there is no conflict of interest. / Автори підтверджують відсутність конфлікту інтересів

Corresponding author / Адреса для кореспонденції:

Melnichuk Yurii Mykolaiovych / Мельничук Юрій Миколайович

Danylo Halytsky Lviv National Medical University / Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького

Ukraine, 79010, Lviv, 69 Pekarska str. / Адреса: Україна, 79010, м. Львів, вул. Пекарська 69

Tel.: +380934692637 / Тел.: +380934692637

E-mail: Jurmelnichuk@gmail.com

A – Work concept and design, B – Data collection and analysis, C – Responsibility for statistical analysis, D – Writing the article, E – Critical review, F – Final approval of the article. / A – концепція роботи та дизайн, B – збір та аналіз даних, C – відповідальність за статичний аналіз, D – написання статті, E – критичний огляд, F – остаточне затвердження статті.

Received 29.04.2025 / Стаття надійшла 29.04.2025 року

Accepted 13.08.2025 / Стаття прийнята до друку 13.08.2025 року

DOI 10.29254/2077-4214-2025-3-178-213-220

UDC 612.015.3:616-092.9-008.6:577.17](083.1)

Poladych I. V.

FIBROBLAST GROWTH FACTOR 23 IN PREGNANT RATS WITH DIFFERENT VITAMIN D3 STATUS

Bogomolets National Medical University (Kyiv, Ukraine)

iren.poladich@gmail.com

Vitamin D₃ deficiency during pregnancy is associated with impaired calcium-phosphorus homeostasis and the development of gestational complications. Fibroblast growth factor 23 (FGF23), a peptide hormone that regulates phosphate metabolism and active vitamin D₃ synthesis, may play a critical role in these processes. However, its systemic and placental activity during pregnancy remains poorly understood.

The aim is to investigate FGF23 levels in the serum and placenta of pregnant rats with different vitamin D₃ statuses and to analyze its associations with key biomarkers of mineral metabolism.

This study included 36 pregnant Wistar rats divided into three groups: control, vitamin D₃-deficient, and D₃-corrected with cholecalciferol. Serum and placental levels of 25(OH)D₃ and FGF23 were measured using ELISA. Statistical analysis was performed with ANOVA and correlation tests.

In rats with vitamin D₃ deficiency, serum FGF23 levels were significantly increased (471.7 ± 20.4 pg/mL) compared to the control group (211.5 ± 15.82 pg/mL; p<0.001). Correction with cholecalciferol reduced the level to 173.4 ± 12.5 pg/mL (p<0.001). Placental FGF23 showed a slight increase in the deficiency group, though differences were not statistically significant. FGF23 levels negatively correlated with 25(OH)D₃ (r= -0.75) and positively with PTH (r=0.62).

FGF23 responds to vitamin D₃ deficiency by increasing systemic levels and may contribute to mineral imbalance during pregnancy. Its normalization after D₃ correction suggests potential as a biomarker of gestational disturbances linked to mineral metabolism.

Key words: pregnancy, rats, FGF23, vitamin D₃, phosphate metabolism, placenta, obstetric complications.

Connection of the publication with planned research works.

The study is performed like a part of a science program of department of obstetrics and gynecology №1 Bohomolets National Medical University “Preservation and restoration of women’s reproductive health in con-

ditions of rapid medical and social changes”, state registration number 0123U100920.

Introduction.

Pregnancy involves profound physiological and metabolic transformations that ensure the development and growth of the fetus, maternal adaptation to the new conditions, and the formation of a fully functional