

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ ТА ЦИТОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ЗАГОЄННЯ ЗА УМОВ ЛУЖНОГО ОПІКУ СТРАВОХОДУ ТА ЗА ВВЕДЕННЯ МЕЛАНІНУ

Н.М. ЧОРНЕНЬКА, Я.Б. РАЄЦЬКА, А.С. ДРАНИЦИНА, О.О. КАЛМИКОВА, Т.В. БЕРЕГОВА,
М.Е. ДЗЕРЖИНСЬКИЙ, О.М. САВЧУК, Л.І. ОСТАПЧЕНКО

Навчально-науковий центр «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка
Адреса: 01601, м. Київ, вул. Володимирська 64/13.

E-mail: nata.chornenka24@gmail.com

Нами було показано зниження рівня експресії гена, залученого до синтезу колагену Col2a1 у крові та тканинах стравоходу за умов лужного опіку стравоходу 2 ступеня (ЛОС 2). При введенні меланіну підвищувався рівень експресії гена Col2a1 у крові та тканинах стравоходу порівняно з показниками при ЛОС 2. У ході гістологічного дослідження нами було визначено інтенсивність депонування колагенових волокон, а також виміряно індекс стенозу стравоходу та оцінено вплив меланіну на дані процеси, а саме: менш виражене утворення колагенових волокон в ушкоджених тканинах стравоходу. Було виявлено, що при ЛОС 2 у сироватці крові та слизовій оболонці стравоходу підвищувався вміст прозапального цитокіну ІЛ-6 та знижувався рівень протизапального цитокіну ІЛ-10. При застосуванні меланіну відзначалася нормалізація вмісту цитокінів порівняно з показниками при ЛОС 2, що вказує на протизапальні та антифіброзні властивості цієї речовини та свідчить про перспективність використання меланіну як речовини, що сприяє загоєнню хімічного опіку стравоходу без утворення патологічного рубця.

Ключові слова: лужний опік стравоходу, фіброз, експресія генів Col2a1, цитокіни, меланін.

Вступ. Щороку в Україні опіки отримують понад 12 тисяч дітей, найбільш вразлива група — це діти віком від 1-го до 5-ти років. Число постраждалих дітей продовжує неухильно зростати у зв'язку з доступністю та різноманітністю великої кількості хімічних речовин, які випадково можуть бути спожиті дитиною [1, 2]. Загоєння опікової рани — це природний процес, що активується у відповідь на отримання травми. На ранній стадії загоєння переважає запалення, переходячи далі до відновлення та реконструкції ушкоджених тканин. Існує три

загальні фази в процесі загоєння опіку: запалення, проліферація та реконструкція [3]. Стадія запалення передбачає вивільнення цитокінів і факторів росту, надходження нейтрофілів і макрофагів та створення початкового матричного каркасу [4]. Фаза проліферації характеризується ангіогенезом, синтезом колагену, реепітелізацією та скороченням рани. Ендотеліальні клітини ініціюють ангіогенез, а фібробласти синтезують колаген та фібронектин, щоб утворити нову позаклітинну матрицю в ураженій тканині [5, 6]. Остання фаза — це матрична реконструкція, яка характеризується синтезом та осадженням колагену фібробластами та утворення нової відновленої тканини [7].

Відкладення фібронектину створює в рані каркас, до якого мігрують фібробласти. Фібронектин продукується в перші 24–48 год після травми. Популяція фібробластів стає домінуючою серед усіх клітин в рані, після того як фаза запалення йде на спад. У період фібробластичної проліферації продукується колаген. Кількість колагену постійно зростає впродовж приблизно 3 тижнів, досягаючи стабільного рівня у період, коли інтенсивність колагенового синтезу стає рівним інтенсивності колагенового лізису [8, 9].

Незважаючи на первинне закриття рани, можливі відхилення від нормального процесу загоєння в сторону його хронізації, що обумовлено фібро-проліферативними розладами. У деяких дослідженнях було показано залучення гена Col2A1 до патологічних змін у шкірі при розвитку певних патологічних синдромів (наприклад, синдром Стиклера); та його роль (зміна його експресії) під час фібрилогенезу [10, 11]. Ці відхилення характеризуються надмірним відкладенням колагену або надмірною продукцією колагену, протеогліканів і фібронек-

© Н.М. ЧОРНЕНЬКА, Я.Б. РАЄЦЬКА,
А.С. ДРАНИЦИНА, О.О. КАЛМИКОВА,
Т.В. БЕРЕГОВА, М.Е. ДЗЕРЖИНСЬКИЙ,
О.М. САВЧУК, Л.І. ОСТАПЧЕНКО, 2020

тину, а також порушенням процесу деградації екстрацелюлярного матриксу. Є дві форми фібро-проліферативних розладів, які викликають особливий інтерес, — це гіпертрофічні рубцювання та утворення келоїдних рубців [12, 13].

Основною метою лікування хімічного опіку стравоходу є запобігання утворенню рубцевої стриктури, зниження запального процесу та бактеріальної транслокації в тканини стравоходу. На сьогодні, на фармацевтичному ринку препарати для лікування опіків мають вузьконаправлену дію, більшість з яких володіють тільки антимікробною активністю, але не впливають на процес загоєння, ефективного лікування для попередження утворення рубцевих звужень стравоходу не існує.

Аналіз сучасної літератури дозволяє стверджувати, що можливими перспективними засобами нормалізації процесу загоєння при лужному опіку стравоходу є речовини природного походження на основі поліфенольних сполук. У зв'язку з цим великий інтерес викликає можливість використання при хімічних опіках меланіну. Він є одним із найпотужніших антиоксидантів, який запобігає деградації колагенових білків та посилює мікроциркуляцію в тканинах [14, 15]. До того ж, меланін характеризується антиоксидантними [16–18], імуномодулюючими [19, 20], антиканцерогенними [21, 22], гастро- та стрес-протекторними [15] властивостями.

Тому, метою цієї роботи було проведення гістологічного аналізу та визначення рівня експресії гена *Col2a1*, який може вказувати на надмірне депонування колагенових волокон на різних стадіях експериментальної опікової хвороби та за введення меланіну.

Матеріали та методи. Моделювання опіку. У роботі дотримувались загальних етичних принципів експериментів на тваринах, ухвалених Першим національним конгресом України з біоетики (вересень 2001 р.) та з дотриманням міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей, інших міжнародних угод і національного законодавства в цій галузі. Досліди проводили на білих нелінійних статевонезрілих щурах (1-місячних) масою 90–110 г (що відповідає 1–4-річному віку дітей). Опік моделювали 20 %

розчином NaOH, що відповідає 2 ступеню опіку. Для цього вводили зонд у стравохід запаяним торцем і отвором на відстані 2 мм від нього. Зонд вводили на глибину 4 см від верхніх різців щура та повільно вводили 0,2 мл 20 % NaOH, таким чином відтворюючи 2 ступінь опіку. Контрольним щурам одноразово перорально вводили відповідний об'єм води для ін'єкцій [23]. Тварин утримували на стандартному раціоні віварію.

Формування груп. Дослідних тварин поділяли на групи: група 1 — контрольна, здорові щури (контроль, $n = 15$); група 2 — щури, яким моделювали лужний опік стравоходу другого ступеня (ЛОС 2), та вводили фізіологічний розчин у відповідній дозі та терміни замість меланіну (опік-контроль, $n = 45$); група 3 — щури з ЛОС 2 ступеня, яким вводили перорально меланін, починаючи з 2-ї доби експерименту, у дозі 1 мг/кг, протягом 14 днів ($n = 45$).

Отримання меланіну. Продуцентом меланіну, використаного в нашому дослідженні, були дріжджеподібні гриби *Nadsoniella nigra* штам X1, висіяні із зразків вертикальних скель о. Галіндез [24]. Сухий екстракт меланіну розчиняли в дистильованій воді, у концентрації 1 мг/кг тварини.

Отримання біологічного матеріалу. Методом виведення тварин із досліду була цервікальна дислокація. Цільну кров та тканини стравоходу для експериментів отримували на 7, 15 та 21 добу.

Гістохімічне виявлення колагенових волокон. Стравоходи виділяли цілими, розділяли на 3 частини (початок, середина, кінець) та фіксували в 4%-ному розчині параформальдегіду на 0,1 М фосфатному буферному розчині впродовж 72 год, після чого зневоднювали та заливали в парафін у вертикальній орієнтації. З парафінових блоків на мікротомі виготовляли зрізи товщиною 5 мкм. Виявлення колагенових волокон проводили за допомогою гістохімічного трихромного забарвлення за Ван Гізоном із дозабарвленням ядер клітин гематоксиліном Бемера [25]. Для кількісного визначення вмісту колагенових волокон мікрофотографії виготовляли за допомогою об'єктива з кратністю збільшення 10. Для кожної наступної мікрофотографії поле зору переміщували вправо, зберігаючи 20 % попереднього поля, доки не бу-

ло відфотографовано весь зріз стравоходу. Для створення одного великого композитного зображення використовувалася алгоритм виготовлення панорами програмного забезпечення «Adobe Photoshop CS6» («Adobe Systems», США). З кожного зображення розраховували площу забарвленої ділянки червоним (колагенові волокна) і виражали у відсотках від загальної площі поперечного перерізу стравоходу. Подальше дослідження препаратів проводили за допомогою світлового мікроскопа BX41 («Olympus», Японія). Мікрофотографії отримували з використанням цифрової камери «DP20» («Olympus», Японія) та програмного забезпечення «QuickPHOTO MICRO» («Promica», Чехія).

Як критерії морфо-функціональних змін стравоходу використовували індекс стенозу (ІС), який рахували за стандартною формулою $IS = (\text{товщина стінки стравоходу} / \text{діаметр просвіту})$ [26]. Результати включали вимірювання товщини стінки та діаметру просвіту стравоходу в чотирьох окремих місцях. Усі параметри отримували з використанням програми «ImageJ» («National Institutes of Health», США).

Кількісна ЗТ-ПЛР. РНК отримували за методом Chomczynski; Синтез кДНК та кількісну полімеразну ланцюгову реакцію в реальному часі (Real-time PCR, кПЛР) за допомогою комерційного набору «Thermo Scientific Verso SYBR Green 1-Step qRT-PCR ROX Mix» («Thermo Scientific», Литва), використовуючи по 0,4 мкмоль/л кожного праймера, проводили за таких, рекомендованих фірмою-виробником, температурних умов: синтез кДНК 50 °С – 30 хв; ініціююча денатурація 95 °С – 15 хв; далі 40 циклів: денатурація ДНК 95 °С – 15 с; гібридизація праймерів 50 – 53 °С – 35 с; добування ланцюга 72° С – 30 с; елонгація ампліфікатів 72 °С – 5 хв.

У реакціях було використано такі послідовності праймерів: для *Col2a1* – прямий – TGTCTCTGGTCCCATTGGTC та зворотний – AATCCACGAGCACCTGAG; для *Actb* (ген β-актину, що використовується в якості внутрішнього контролю реакції завдяки конститутивній експресії) – прямий – TGGGACGATATGGAGAAGAT та зворотний – ATTGCCGATAGTGATGACCT. Відтворюваність результатів ампліфікації було перевірено в паралельних експериментах шляхом повторення кПЛР на

зразках РНК усіх тварин, із кожним праймером не менше трьох разів. Після кожного циклу ампліфікації зчитувалась флуоресценція барвника SYBR Green I, а по закінченні реакції будувалась крива плавлення для контролю утворення димерів праймерів та специфічності реакції. Початкову кількість мРНК обраховували за порівняльним C_T методом « $\Delta\Delta C_T$ Method», ефективність ПЛР реакцій була однаковою ($E_x = (10^{-1/\text{slope}}) - 1$), $\text{slope} < 0,1$. Відносну кількість мРНК зазначених генів нормалізували до мРНК *Actb*.

Імуноферментний аналіз. Для визначення вмісту цитокінів використовували метод імуноферментного аналізу, який проводили відповідно до стандартного протоколу з певними модифікаціями [27]. Досліджувані зразки: 10 мкг гомогенату слизової оболонки стравоходу розводили в 1 мл буферного розчину (50 мМ трис-НСІ (рН 7,4)), відбирали 100 мкл, які інкубували в лунках 96-лункового планшету впродовж ночі при 4 °С. Для блокування неспецифічних ділянок зв'язування після відмивання інкубували з 5%-ним знежиреним молоком впродовж 1 год, при +37 °С. Наступний етап – двічі відмивали буферним розчином наступного складу: 0,05 М трис-НСІ із 0,1 % твін-20. Потім додавали первинні антитіла певної специфічності та інкубували 1 год при 37 °С. Після цього проводили інкубування з відповідними вторинними антитілами. Після кожного із зазначених етапів двічі проводилось відмивання 0,05 М трис-НСІ із 0,1 % твін-20. Як субстрат пероксидазної реакції у роботі використовували о-фенілендіамін/пероксид водню («Sigma», США). Вимірювання проводили при довжині хвилі 492 нм.

Статистична обробка результатів досліджень. Отримані дані тестували на нормальне розподілення за допомогою тесту Шапіро-Вілка з використанням програмного пакету «GraphPad Prism 5.04» («GraphPad Software Inc.», США). Подальший обрахунок результатів відбувався за допомогою двофакторного дисперсійного аналізу (two-way ANOVA) із пост тестом Бонфероні. Отримані результати наведені у вигляді середнього арифметичного ± середньоквадратичне відхилення (дисперсія) – SD. Результати вважали значущими, коли $p \leq 0,05$.

Результати досліджень та їх обговорення. Ми вирішили розпочати своє дослідження саме з

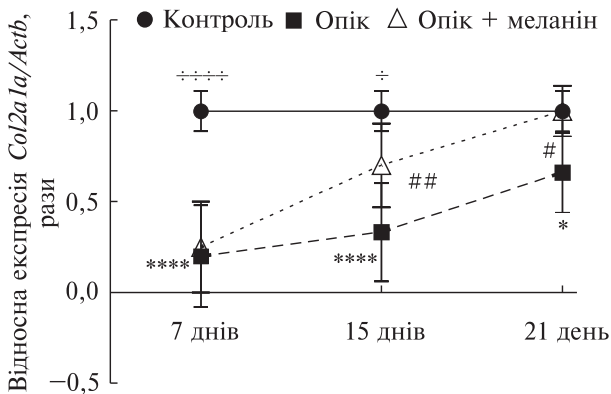


Рис. 1. Рівень експресії мРНК гена *Col2a1* у тканинах стравоходу при ЛОС 2 та при введенні меланіну в дозі 1 мг/кг. 1 – контроль; 2 – ЛОС 2; 3 – ЛОС 2 + меланін; **** – $p \leq 0,0001$, * – $p \leq 0,05$ ЛОС 2 відносно контролю; ## – $p \leq 0,01$, # – $p \leq 0,05$ ЛОС 2 + меланін відносно ЛОС 2; +++++ – $p \leq 0,0001$, +- – $p \leq 0,05$ ЛОС 2 + меланін порівняно з контролем

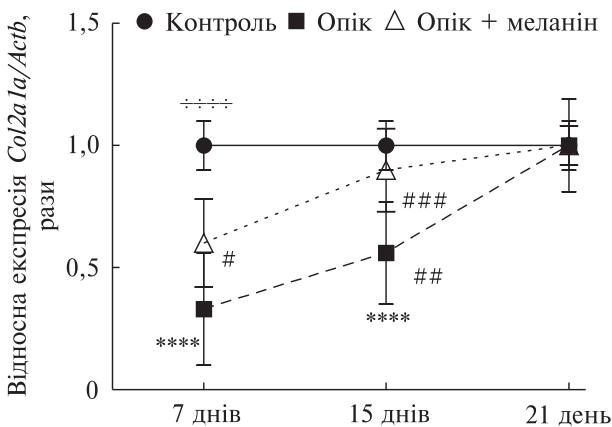


Рис. 2. Рівень експресії мРНК гена *Col2a1* у крові при ЛОС 2 та при введенні меланіну в дозі 1 мг/кг. 1 – контроль; 2 – ЛОС 2; 3 – ЛОС 2 + меланін; **** – $p \leq 0,0001$, * – $p \leq 0,05$ ЛОС 2 відносно контролю; ## – $p \leq 0,01$, # – $p \leq 0,05$ ЛОС 2 + меланін відносно ЛОС 2; +++++ – $p \leq 0,0001$, +- – $p \leq 0,05$ ЛОС 2 + меланін порівняно з контролем

гену *Col2A1*, так як він відповідає за синтез колагену, який знаходиться в сполучній тканині, хрящовій та кістковій тканині. Ген *Col2A1* відповідає за синтез мРНК для побудови одного з компонентів для колагену II типу – ланцюга про-альфа 1 (II). Щоб побудувати колаген типу II, три ланцюги про-альфа 1 (II) взаємодіють разом, утворюючи триланцюгову молекулу про-колагена. Колаген типу II відповідає за пруж-

ність та міцність сполучних тканин, які підтримують м'язи, суглоби, органи та шкіру [10, 11].

Рівень експресії гена *Col2a1* у тканинах стравоходу в групі тварин з ЛОС 2 був нижчим у 5, 3 ($p \leq 0,0001$) і 1,5 рази ($p \leq 0,05$) на 7, 15 добу загоєння відповідно в порівнянні з контролем (рис. 1).

У щурів, які вживали меланін, цей показник був в 2,1 рази ($p \leq 0,01$) вищим на 15 добу відповідно, ніж у тварин групи ЛОС 2 (на 21 добу рівень мРНК зазначеного гена був на рівні контрольних значень), та виявився менш зниженим відносно контролю: у 4 ($p \leq 0,0001$) та 1,4 рази ($p \leq 0,05$) на 7 і 15 добу загоєння відповідно.

Рівень експресії гена *Col2a1* у крові в групі тварин з ЛОС 2 був нижчим у 3, 1,8 ($p \leq 0,0001$) на 7, 15 добу загоєння відповідно в порівнянні з контролем (рис. 2). На 21 добу зазначений показник повертався до контрольних значень.

У щурів, які вживали меланін, цей показник був в 1,8 рази ($p \leq 0,05$) вищим на 7 добу, ніж у тварин другої групи та виявився менш зниженим відносно контролю: у 1,7 рази ($p \leq 0,0001$). На 15 добу рівень мРНК зазначеного гена був на рівні контрольних значень.

Таким чином, на початку експерименту було встановлено, що опік призводив до зниження рівня експресії мРНК гена *Col2a1*, але вже станом на 15 добу відбувалося поступове підвищення рівня досліджуваного гена, як в крові так, і в тканинах стравоходу, порівняно з 7 добою експерименту. Станом на 21 добу рівень *Col2a1* продовжував зростати і наближався до рівню контрольних значень.

Оскільки *Col2a1* відповідає за пружність та міцність сполучної тканини, то припускаємо, що на 7 добу може відбуватися руйнування тканин стравоходу і лише станом на 21 добу відбувається незначне відновлення клітин сполучної тканини за умов хімічного опіку 2 ступеня. При введенні меланіну рівень експресії гена *Col2a1* зростав в порівнянні з групою ЛОС2, що може вказувати на більш швидку регенерацію клітин сполучної тканини [28, 29].

При гістохімічному виявленні колагенових волокон за методом Ван Гізона вони забарвлювалися в червоний колір. Значна їх кількість розташовувалися в другій оболонці стравоходу підслизовій основі, що утворена сполучною тканиною, разом із власними залозами стра-

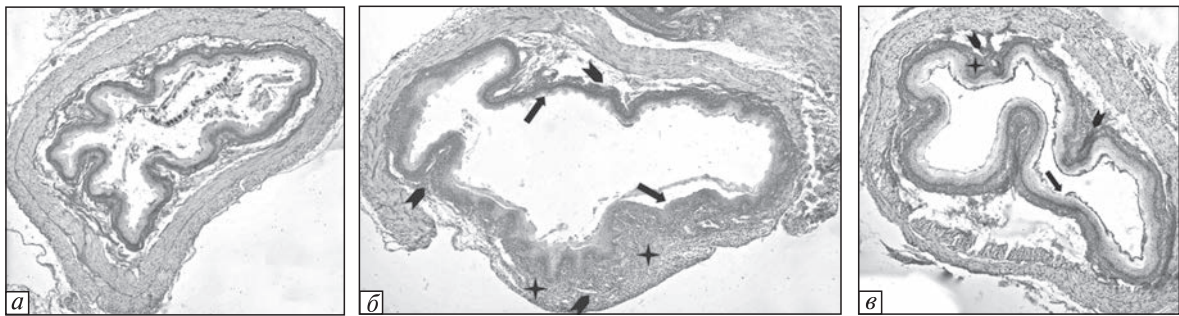


Рис. 3. Мікрофотографії зрізів стравоходу на 7 добу експерименту: контрольна (а), група ЛОС 2 (б), ЛОС 2 + меланін (в). Гістохімічне забарвлення за Ван Гізоном на виявлення колагенових волокон (червоні), ок. 10 × об.10, панорамне зображення. Позначення: зірочки – інфільтрація лейкоцитами, стрілочки – руйнування епітелію слизової оболонки, маркер – розростання сполучної тканини

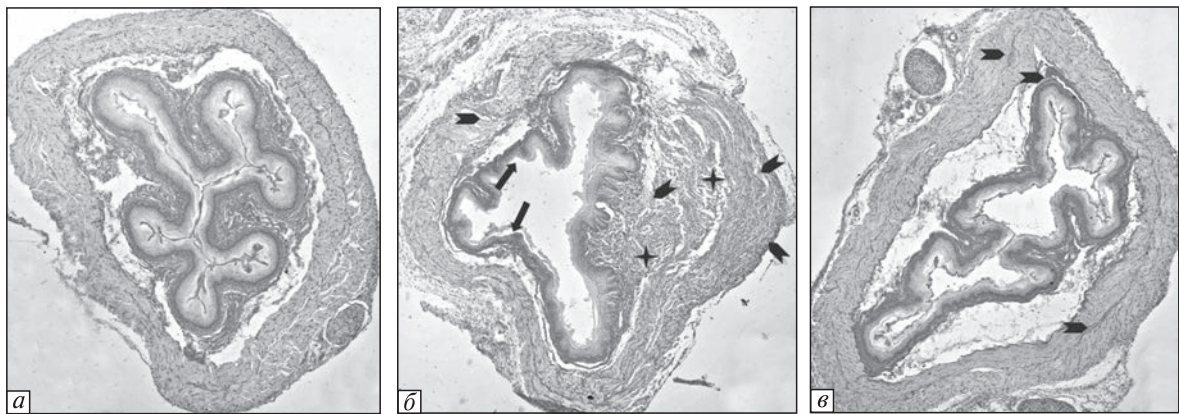


Рис. 4. Мікрофотографії зрізів стравоходу на 15 добу експерименту: контрольна (а), група ЛОС 2 (б), ЛОС 2 + меланін (в). Гістохімічне забарвлення за Ван Гізоном на виявлення колагенових волокон (червоні), ок. 10 × об.10, панорамне зображення. Позначення: зірочки – інфільтрація лейкоцитами, стрілочки – руйнування епітелію слизової оболонки, маркер – розростання сполучної тканини

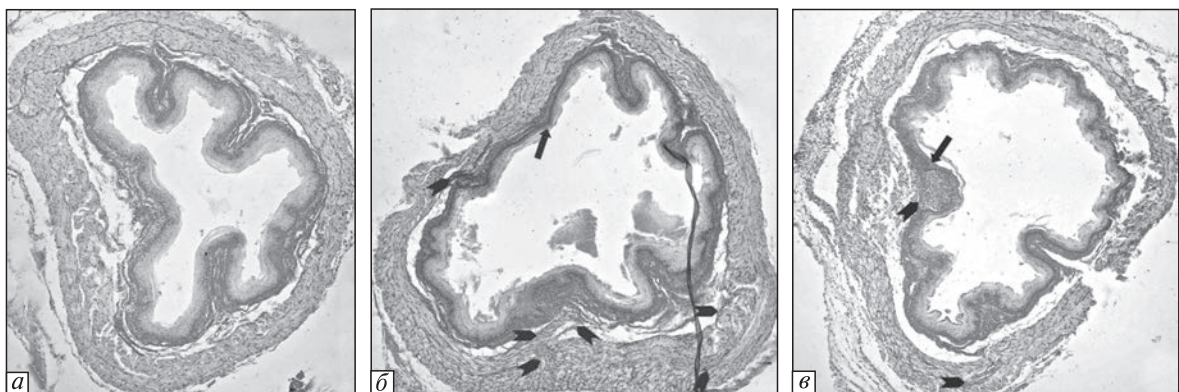


Рис. 5. Мікрофотографії зрізів стравоходу на 21 добу експерименту: контрольна (а), група ЛОС (б), ЛОС + меланін (в). Гістохімічне забарвлення за Ван Гізоном на виявлення колагенових волокон (червоні), ок. 10 × об.10, панорамне зображення. Позначення: стрілочки – руйнування епітелію слизової оболонки, маркер – розростання сполучної тканини

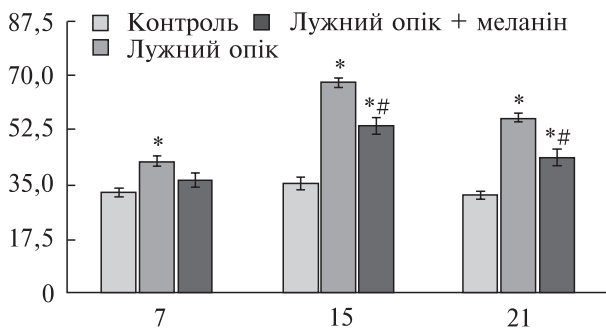


Рис. 6. Дані морфометричного аналізу відносного вмісту колагенових волокон у тканинах стравоходу за умов ЛОС 2 та при введенні меланіну в дозі 1 мг/кг, ($M \pm m, n = 8$), * – $p \leq 0,05$ ЛОС 2 в порівнянні з контрольною групою; # – $p \leq 0,05$ ЛОС 2 + меланін відносно ЛОС 2; по вертикалі – площа, гістохімічно забарвлених колагенових волокон по відношенню до площі поперечного перерізу стравоходу, %; по горизонталі – дні

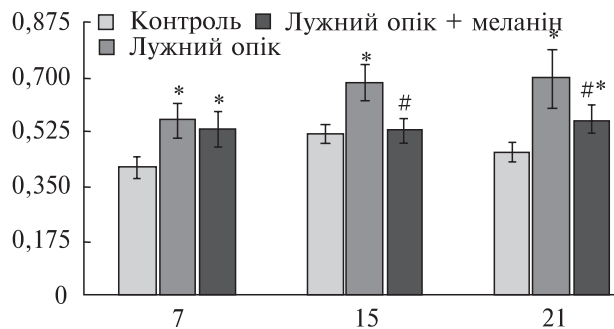


Рис. 7. Дані морфометричного аналізу індексу стенозу стравоходу за умов ЛОС 2 та при введенні меланіну в дозі 1 мг/кг, ($M \pm m, n = 8$), * – $p \leq 0,05$ ЛОС 2 порівняно з контрольною групою; # – $p \leq 0,05$ ЛОС 2 + меланін в порівнянні з групою ЛОС 2; по горизонталі – дні

воходу, які забарвлювалися в жовтий колір (рис. 3, а). Після моделювання ЛОС на 7 добу відбувався набряк підслизової основи (рис. 3, б), та інфільтрація лейкоцитами. Крім цього, було показано руйнування та розшаровування слизової оболонки стравоходу. Таким чином, описані зміни стравоходу відповідали другому ступеню опіку [30]. При застосуванні меланіну за умов ЛОС 2 набряк підслизової основи та лейкоцитарна інфільтрація були менш вираженими (рис. 3, в).

На 15 добу експерименту у групі з ЛОС 2 продовжувалась лейкоцитарна інфільтрація

(рис. 4). Набряк зменшувався, проте ділянки запалення починали заміщуватись на власне сполучну тканину з високим вмістом колагенових волокон, розташування яких поширювалася як в підслизовій, так і в м'язовій оболонці. За умов введення меланіну лейкоцитарна інфільтрація знижувалася. Така дія меланіну може бути пов'язана зі швидким зниженням надмірного запалення, яке може стимулювати фібробласти до надмірного синтезу колагенових волокон та, як наслідок, до фіброзу та утворення рубця [31].

На 21 добу у щурів з ЛОС 2 було виявлено розростання колагенових волокон в усій товщі підслизової оболонки та частково в м'язовій, не тільки поміж циркулярним та поздовжнім шарами, але і між окремими міоцитами (рис. 5). При використанні меланіну в м'язовій оболонці майже не було зафіксовано депонування колагенових волокон. У той же час, у підслизовій оболонці надмірне відкладання колагенових волокон відбувалося не по всій її частині, а лише в ділянках ушкодження стравоходу.

За даними гістохімічного аналізу (рис. 6) відносного вмісту колагенових волокон на 7 добу після моделювання лужного опіку стравоходу в групі ЛОС 2 збільшувалась на 30 % площа, яку займали колагенові волокна, в порівнянні з контрольною групою.

На 15 добу в групі ЛОС 2 відносний вміст колагенових волокон зростав на 91 %, що пов'язано з гіперактивацією фібробластів внаслідок надмірного запалення та лейкоцитарної інфільтрації [32]. За умов введення меланіну площа, яку займали колагенові волокна, зменшилась на 21 % в порівнянні з групою ЛОС 2. На 21 добу отримали схожі результати: група ЛОС 2 мала підвищений відносний вміст колагенових волокон (на 78 %) порівняно з контролем; за умов застосування меланіну вміст колагенових волокон знижувався на 23 % порівняно з ЛОС 2.

Крім відносного вмісту колагенових волокон, про загальний стан стравоходу після лужного опіку та процес утворення сполучнотканинного рубця свідчить індекс стенозу, оскільки порушення в регуляції синтезу та накопичення колагенових волокон провокує утворення сполучнотканинних рубців, що веде до звуження

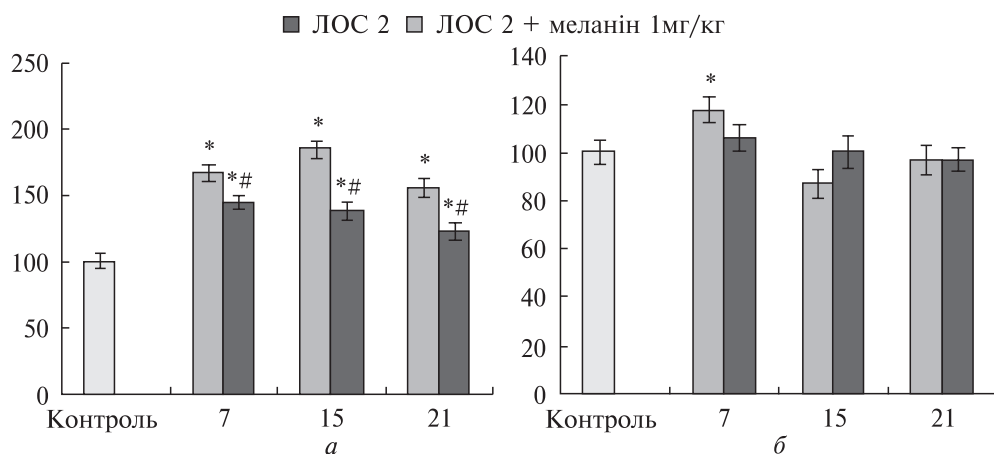


Рис. 8. Рівень прозапального цитокіну ІЛ-6 в слизовій оболонці стравоходу (а) та сироватці крові (б) шурів за умов ЛОС 2 та при введенні меланіну в дозі 1 мг/кг, ($M \pm m$, $n = 8$), * – $p \leq 0,05$ ЛОС 2 порівняно з контролем; # – $p \leq 0,05$ ЛОС 2 + меланін порівняно з групою ЛОС 2; по вертикалі – %; по горизонталі – доба

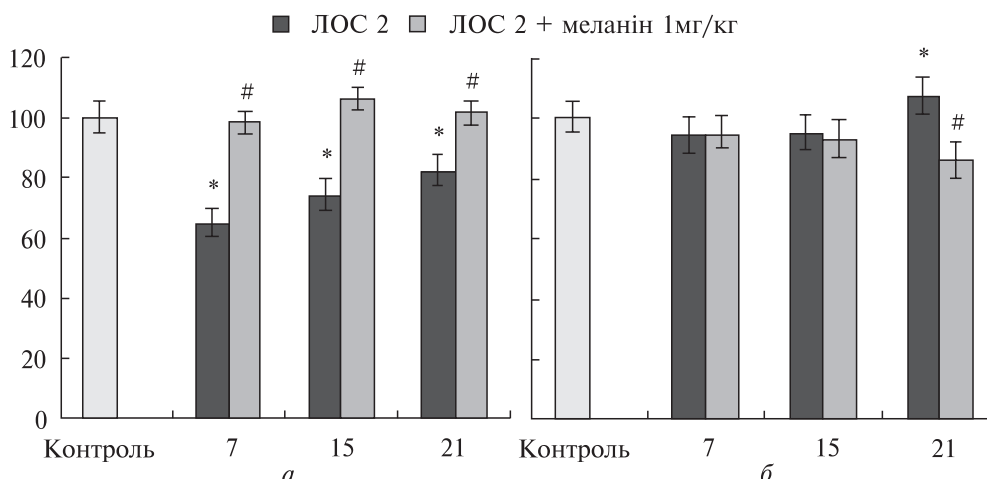


Рис. 9. Рівень протизапального цитокіна ІЛ-10 в слизовій оболонці стравоходу (а) та сироватці крові (б) шурів за умов ЛОС 2 та при введенні меланіну в дозі 1 мг/кг, ($M \pm m$, $n = 8$), * – $p \leq 0,05$ ЛОС 2 порівняно з контролем; # – $p \leq 0,05$ ЛОС 2 + меланін порівняно з групою ЛОС 2; по вертикалі – %, по горизонталі – доба

просвіту стравоходу [33, 34]. На 7 добу індекс стенозу зростав як в групі ЛОС 2 (на 37 %), так і при застосуванні меланіну (на 30 %) у порівнянні з контролем, що обумовлено розвитком запального процесу та набряком.

Проте, на 15 добу на фоні збільшеного індексу стенозу у ЛОС 2 (на 31 %), при введенні меланіну розміри просвіту стравоходу поверталися до контрольних значень. На 21 добу індекс стенозу набув проміжного значення при застосуванні меланіну за ЛОС 2 і був нижче на 20 % порівняно з групою ЛОС 2, в той час у

групі ЛОС 2 індекс стенозу був на 52 % вищий за контроль.

Цитокіни впливають практично на всі клітини, що беруть участь у розвитку запалення, включаючи гранулоцити, макрофаги, фібробласти, клітини ендотелію й епітелію, Т- і В-лімфоцити [35]. При опіковій травмі значення цитокінів важко переоцінити на місцевому та системному рівнях. При тяжкому запаленні цитокіни потрапляють у кров, що призводить до гострої запальної відповіді на рівні всього організму, а як відомо, довготривале запален-

ня може призводити до утворення рубців та стенозів.

Деякі дослідники включають у критерії несприятливого результату при загоєнні опіків підвищення концентрації ІЛ-6 [36, 37]. У ході наших досліджень було показано підвищення рівню ІЛ-6, за умов ЛОС 2. У слизовій оболонці стравоходу спостерігалось підвищення рівня досліджуваного цитокіну на 7 добу на 67 %, на 15 добу на 84 % та на 21 добу на 56 % порівняно з контрольними значеннями. У сироватці крові рівень ІЛ-6 підвищувався на 7 добу на 17 % порівняно з контролем. При введенні меланіну спостерігали зниження рівню ІЛ-6 в тканинах стравоходу на 7, 15 та 21 добу на 13, 25 та 21 % відповідно, порівняно з контрольними значеннями. У сироватці крові рівень ІЛ-6 за умов введення меланіну знижувався на 7 добу на 10 % порівняно з групою ЛОС 2. Отримані дані можуть свідчити про те, що введення меланіну знижує ризик розвитку патологічного процесу при загоєнні опіків [38].

ІЛ-10 являє собою цитокін з множинними, плейотропними, ефектами при імунорегуляції та запаленні. ІЛ-10 здатний інгібувати синтез прозапальних цитокінів, таких як ІФ- γ , ІЛ-2, ІЛ-3, ФНП- α , які синтезуються клітинами, такими як макрофаги та Т-клітини. Він також проявляє потужну здатність пригнічувати антиген-презентаційну здатність клітин; однак, він також активує певні Т-клітини (Th2) та тучні клітини, а також стимулює дозрівання В-клітин і продукування антитіл [38, 39].

За визначення рівня прозапального цитокіну ІЛ-10 за умов опіку було показано зниження його вмісту за умов ЛОС 2. У тканинах стравоходу концентрація ІЛ-10 знижувалась на 7 добу на 35 %, на 15 добу на 26 % та на 21 добу на 18 % порівняно з контролем. При введенні меланіну концентрація ІЛ-10 підвищувалась на 7 добу на 50 %, на 15 добу на 43 % порівняно з показниками за ЛОС 2. При визначенні вмісту ІЛ-10 у сироватці крові було показано недостовірні зміни порівняно з контрольними значеннями (рис. 9).

Висновки. Показано зниження рівня експресії гена, залученого до синтезу колагену *Col2a1* у крові та тканинах стравоходу за умов ЛОС 2. Визначено інтенсивність депонування

колагенових волокон, а також виміряно індекс стенозу стравоходу. Виявлено, що при ЛОС 2 у сироватці крові та слизовій оболонці стравоходу підвищувався вміст прозапального цитокіну ІЛ-6 та знижувався рівень протизапального цитокіну ІЛ-10. При введенні меланіну підвищувався рівень експресії гену *Col2a1* у крові та тканинах стравоходу порівняно з показниками при ЛОС 2. Оцінено вплив меланіну на процеси загоєння: менш виражене утворення колагенових волокон в ушкоджених тканинах стравоходу. При застосуванні меланіну відзначалась нормалізація вмісту цитокінів порівняно з показниками при ЛОС 2, що вказує на протизапальні та антифіброзні властивості цієї речовини та свідчить про перспективність використання меланіну як речовини, що сприяє загоєнню хімічного опіку стравоходу без утворення патологічного рубця.

Дотримання етичних стандартів. Усі процедури, виконані в дослідженні за участю людей, відповідають етичним стандартам національного Комітету з дослідницької етики та Гельсінської декларації 1964 р. і її подальших змін або відповідним нормам етики. Від кожного, з включених в дослідження учасників, було отримано інформовану добровільну згоду.
Конфлікт інтересів. Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Фінансування. Це дослідження не отримувало будь-якого конкретного гранту від фінансуючих установ в державному, комерційному або некомерційному секторах.

MOLECULAR, GENETIC AND CYTOLOGICAL SPECIFICITIES OF HEALING UNDER ALKALINE ESOPHAGEAL BURNS AND AT THE ADMINISTRATION OF MELANIN

N.M. Chornenka, Ya.B. Raetska, A.S. Dranitsina, O.O. Kaltukova, T.V. Beregova, M.E. Dzerzhynsky, O.M. Savchuk, L.I. Ostapchenko

Educational and Scientific Center «Institute of Biology and Medicine», Taras Shevchenko National University of Kyiv, 01601, Kyiv, Volodymyrska street 64/13

We have shown decreased expression of the gene involved in the synthesis of collagen *Col2a1* in the blood and esophageal mucus in the alkaline esophageal burn of the 2nd degree (AEB 2). When melanin was administered, the level of expression of the *Col2a1* gene in the blood and esophagus tissues increased as compared

to those in AEB 2. During the histological study, we have determined the intensity of deposition of collagen fibers, and also have measured the index of stenosis of the esophagus and assessed the effect of melanin on the healing processes: less pronounced formation of collagen fibers in damaged esophagus tissues. It was found that in the serum of blood and esophageal mucosa, the level of pro-inflammatory cytokine IL-6 was increased and the level of anti-inflammatory cytokine IL-10 was decreased. After the administration of melanin, the normalization of the content of cytokines was noted in comparison with the indicators at AEB 2, indicating the anti-inflammatory and anti-fibrotic properties of this substance and demonstrating the prospect of the use of melanin as a substance contributing to the healing of chemical burn of the esophagus without the formation of a pathological scar.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Digtyar, V.A., Barsuk, O.M., Kaminska, M.O., Gladkyi, O.P., and Galagan, A.A., Treatment of chemical burns of the esophagus in children, *Paediatric Surgery*, 2017, vol. 3(56), no. 3, pp. 54–6. doi: 10.1016/j.legalmed.2013.10.002 10.15574/PS.2017.56.54.
2. Dash, S., Bhojani, J., and Sharma, S., A Rare Case of Anal and Perianal Chemical Burn in a Child due to Potassium Permanganate Crystals Drug, *Saf. Case Rep.*, 2018, vol. 5, pp. 10–5. doi: 10.1016/j.legalmed.2013.10.002: 10.1007/s40800-018-0072-5.
3. Nakajima, Y., Nakano, Y., Fuwano, S., Hayashi, N., Hiratoko, Y., Kinoshita, A., Miyahara, M., Mochizuki, T., Nishino, K., Tsuruhara, Y., Yokokawa, Y., Iuchi, T., Kon, Y., Mukai, K., Kitayama, Y., Murakado, N., Okuwa, M., and Nakatani, T., Effects of three types of Japanese honey on full-thickness wound in mice, *Evid.-Based Complement. Alternat. Med.*, 2013, vol. 2013, pp. 504537. doi: 10.1155/2013/504537.
4. Neub, A., Houdek, P., Ohnemus, U., Moll, I., and Brandner, J.M., Biphasic regulation of AP-1 subunits during human epidermal wound healing, *J. Invest. Dermatol.*, 2007, vol. 127, no. 10, pp. 2453–62.
5. Al-Waili, N.S., Salom, K., and Al-Ghamdi, A.A., Honey for wound healing, ulcers, and burns; data supporting its use in clinical practice, *Sci. World J.*, 2011, vol. 11, pp. 766–87. doi: 10.1016/j.legalmed.2013.10.002: 10.1100/tsw.2011.78.
6. Nayak, B.S., Pinto Pereira, L.M., *Catharanthus roseus* flower extract has wound-healing activity in Sprague Dawley rats, *BMC Complem. Altern. Med.*, 2006, vol. 6, pp. 41. doi: 10.1186/1472-6882-6-41.
7. Rawat, S., Gupta, A., Development and study of wound healing activity of an ayurvedic formulation, *Asian J. Pharmac. Sci.*, 2011, vol. 1, no. 1, pp. 26–8.
8. Reinke, J.M., Sorg, H., Wound repair and regeneration, *Eur. Surg. Res.*, 2012, vol. 49, pp. 35–43. doi: 10.1159/000339613.
9. Werner, S., Krieg, T., and Smola, H., Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing. *J. Invest. Dermatol.*, 2007, vol. 127, pp. 998–1008. doi: 10.1038/sj.jid.5700786.
10. Lin, Zhou, Xueshan, Xiao, Shiqiang, Li, Xiaoyun, Jia, Panfeng, Wang, Wenmin, Sun, Fengsheng, Zhang, Jiazhang, Li, Tuo, Li, and Qingjiong, Zhang, Phenotypic characterization of patients with early-onset high myopia due to mutations in *COL2A1* or *COL11A1*: Why not Stickler syndrome?, *Mol. Vis.*, 2018, vol. 24, pp. 560–73. PMID: 30181686.
11. Dikaiakou, E., Vlachopapadopoulou, E.A., and Manolakos, E., Identification of an Autosomal Dominant Mutation in the *COL2A1* Gene Leading to Spondyloepiphyseal Dysplasia Congenita in a Greek Family, *Mol. Syndromol.*, 2019, vol. 9, no. 5, pp. 241–6. doi: 10.1159/000492190.
12. Abaev, Yu.K., The Biology of Healing Acute and Chronic Wounds Medical News, 2003, vol. 6, pp. 3–10.
13. Widgerow, A.D., Cellular/extracellular matrix cross talk in scar evolution and control. *Wound Repair. Regen.*, 2011, vol. 19, no. 2, pp. 117–33. doi: 10.1111/j.1524-475X.2010.00662.x
14. Salih, E., Afaf, K., and Mohamed Anwar, K., Pharmacological Properties of Melanin and its Function in Health, *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, 2017, vol. 120, no. 6, pp. 515–22. doi: 10.1111/bcpt.12748.
15. Kunwar, A., Adhikary, B., Jayakumar, S., and Barik, A., Melanin, a promising radioprotector: Mechanisms of actions in a mice model, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2012, vol. 264, pp. 202–11. doi: 10.1016/j.taap.2012.08.002.
16. Brenner, M., Hearnling, V.G., The protective role of melanin against UV damage in human skin, *Photochem. Photobiol.*, 2008, vol. 84, no. 3, pp. 539–49. doi: 10.1111/j.1751-1097.2007.00226.x.
17. Zeng-Yu, Y., Jian-Hua, Q., Comparison of Antioxidant Activities of Melanin Fractions from Chestnut Shell, *Mol.*, 2016, vol. 21, pp. 487. doi: 10.3390/molecules21040487.
18. Keypour, S., Riahi, H., Moradali, M., and Rafati, H., Investigation of the antibacterial activity of a chloroform extract of Ling Zhi or Reishi medicinal mushroom, *Ganoderma lucidum* (W. Curt.: Fr.) P. Karst. (*Aphyllphoromycetidae*), from Iran, *Int. J. Med. Mushrooms*, 2008, vol. 10, no. 4, pp. 345–9. doi: 10.1615/IntJMedMushr.v10.i4.70.
19. Racca, S., Spaccamiglio, A., Esculapio, P., Abdadessa, G., Cangemi, L., DiCarlo F., et al. Effects of swim stress and alpha-MSH acute pre-treatment on brain 5-HT transporter and corticosterone receptor,

- Pharmacol. Biochem. Behav.*, 2005, vol. 81, no. 4, pp. 894–900. doi: 10.1016/j.pbb.2005.06.014.
20. Chornenka, N.M., Raetska, Ya.B., Savchuk, O.M., Kompanets, I.V., Beregova, T.V., and Ostapchenko, L.I., Effect of different doses of melanin in the blood protein changes in rats under alkaline esophageal burns, *Research Journal of Pharmaceutical, Biol. Chem. Sci. (RJPBCS)*, 2017, vol. 8, no. 1, pp. 261.
 21. Seniuk, O., Gorovoj, L., and Kovalev, V., Anticancerogenic properties of melaninglucan complex from higher fungi, *Proc. 5th Internat. Med. Mushroom Con. Nantong*, 2009, pp. 142–9. doi: 10.1615/IntJMedMushr.v13.i1.20.
 22. Carletti, G., Nervo, G., and Cattivelli, L., Flavonoids and Melanins: a common strategy across two kingdoms. *Int. J. Biol. Sci.*, 2014, vol. 10, no. 10, pp. 1159–70. doi: 10.7150/ijbs.9672.
 23. Raetska, Ya.B., Ishchuk, T.V., Savchuk, O.M., and Ostapchenko, L.I., Experimental modeling of first-degree chemically-induced esophageal burns in rats, *Med. Chem.*; 2013, vol. 15, no. 4, pp. 30–4.
 24. Chyzhanska, N.V., Tsyryuk, O.I., and Beregova, T.V., The level of cortisol in the blood of rats before and after stress action against the background of melanin, *Visn. Problem. Boil. Med.*, 2007, vol. 1, pp. 40–4.
 25. Mishra, N.S., Wanjari, S.P., Parwani, R.N., Wanjari, P.V., and Kaothalker, S.P., Assessment of collagen and elastic fibres in various stages of oral submucous fibrosis using Masson's trichrome, Verhoeff van Gieson and picosirius staining under light and polarizing microscopy, *J. Dent. Special.*, 2015, vol. 3, no. 2, pp. 170–5. doi: 10.5958/2393-9834.2015.00009.1.
 26. Cerit, K.K., Halofuginone improves caustic-induced oxidative injury of esophagus in rats, *Esophagus*, 2018, vol. 15, no. 2, pp. 59–68. doi: 10.1007/s 10388-017-0594-4.
 27. Crowther, J.R., *The ELISA Guidebook* / Crowther: Humana Press Inc. 2001. doi: 10.1007/978-1-60327-254-4.
 28. Ozog, D.M., Liu, A., and Chaffins, M.L., Evaluation of Clinical Results, Histological Architecture, and Collagen Expression Following Treatment of Mature Burn Scars with a Fractional Carbon Dioxide Laser, *JAMA Dermatol.*, 2013, vol. 149, no. 1, pp. 50–7. doi:10.1001/2013.
 29. Shawn, Tejiram, Jenny, Zhang, Taryn, E. Travis. Compression Therapy Affects Collagen Type Balance in Hypertrophic Scar, *J. Surg. Res.*, 2016, vol. 201, no. 2, pp. 299–305. doi: 10.1016/j.jss.2015.10.040.
 30. Ryu, H.H., Caustic injury: can CT grading system enable prediction of esophageal stricture?, *Clin. Toxicol.*, 2010, vol. 48, no. 2, pp. 137–42. doi: 10.3109/15563650903585929.
 31. Bozza, M.T., The Role of MIF on Eosinophil Biology and Eosinophilic Inflammation, *Clin. Rev. Allerg. Immunol.*, 2019, pp. 1–10. doi: 10.1007/s12016-019-08726-z.
 32. Muir A. B., Wang J. X., Nakagawa H. Epithelial-stromal crosstalk and fibrosis in eosinophilic esophagitis, *J. Gastroenterol.*, 2019, pp. 1-9. doi: 10.1007/s00535-018-1498-3
 33. Keane, T.J., Horejs, C.M., Stevens, M.M., Scarring vs. functional healing: Matrix-based strategies to regulate tissue repair, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2018, vol. 129, pp. 407–19. doi: 10.1016/j.addr.2018.02.002.
 34. Komaki, Y., Hepatocyte Growth Factor Facilitates Esophageal Mucosal Repair and Inhibits the Submucosal Fibrosis in a Rat Model of Esophageal Ulcer, *Digestion*, 2018, pp. 1–12. doi: 10.1159/000491876.
 35. Belardelli, F., Role of interferons and other cytokines in the regulation of the immune response, *APMIS*, 1995, vol. 103, no. 3, pp. 161–79.
 36. Zhou, J., Tu, J.J., Huangetal, Y., Changes in serum contents of interleukin-6 and interleukin-10 and their relation with occurrence of sepsis and prognosis of severely burned patients, *Zhonghua Shao Shang Za Zhi*, 2012, vol. 28, no. 2, pp. 111–5.
 37. Pileri, D., Palombo, A.A., D'Amelio, L., D'Arpa, N., Amato, G., Masellis, A., Cataldo, V., Mogavero, R., Napoli, B., Lombardo, C., and Conte, C., Concentrations of cytokines IL-6 and IL-10 in plasma of burn patients: their relationship to sepsis and outcome, *Ann. Burns Fire Disasters.*, 2008, vol. 21, no. 4, pp. 182–5.
 38. Chornenka, N.M., Raetska, Ya.B., Savchuk, O.M., Koval, T.V., Beregova, T.V., and Ostapchenko, L.I., Cytokine profile indicators in rat blood serum in a model of esophagus burn induced by antioxidant chemical preparation, *Biomed. Res. Ther.*, 2017, vol. 4, no. 9, pp. 1591–606. doi: 10.15419/bmrat.v4i9.367.
 39. Kubo, H., Hayashi, T., Ago, K., Ago, M., Kanekura, T., and Ogata, M., Temporal expression of wound healing-related genes in skin burn injury, *Leg. Med. (Tokyo)*, 2014, vol. 16, no. 1, pp. 8–13. doi: 10.1016/j.legalmed.2013.10.002.

Надійшла в редакцію 16.04.19

Після доопрацювання 01.10.19

Прийнята до друку 18.07.20