

ЕКСПРЕСІЯ ГЕНІВ *TLR2* ТА *TJP1* ПІД ЧАС ВІДНОВЛЕННЯ ЦІЛІСНОСТІ ШКІРИ

А.С. ЮЕТ, К.О. ДВОРЩЕНКО, Д.М. ГРЕБІНИК, О.В. ТАБУРЕЦЬ, Т.В. БЕРЕГОВА, Л.І. ОСТАПЧЕНКО

Навчально-науковий центр «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка

Адреса: 01601, г. Київ, ул. Володимирська 64/13

E-mail: alevtina.dranitsina@gmail.com

*Показано зниження рівня експресії гена *Tjp1* при загоюванні повношарових вирізаних площинних ран шкіри щурів на тлі активування вільнорадикальних процесів (зростання вмісту супероксидного аніон-радикалу). Відновлення рівня експресії цього гена може бути опосередковано зростанням рівня експресії гена *Tlr2*. При застосуванні меланіну за тих самих умов рівень експресії *Tjp1*, як і вміст супероксидного аніон-радикалу, швидше наближався до контрольних значень за відсутності гіперекспресії гена *Tlr2*, під час відновлення цілісності шкіри.*

Ключові слова: експресія генів *Tjp1*, *Tlr2*, повношарові вирізани площинні рани шкіри, меланін.

Вступ. Тимчасові порушення бар'єрних властивостей шкіри виникають внаслідок подряпин, порізів, опіків, дії органічних розчинників, ендогенних чи екзогенних протеаз мікроорганізмів [1]. У здорових особин механізми відновлення цілісності шкіри зазвичай намагаються запобігти або звести до мінімуму дію потенційних патогенів і розвиток імунної відповіді [1, 2].

Основним механізмом активації вільнорадикальних процесів, складової ланки метаболічної активності клітин, є збільшення утворення активних форм кисню (АФК). Окрім фізіологічних ефектів (регуляція клітинної проліферації та тонусу судин, індукція транскрипції окремих генів тощо) АФК можуть проявляти й виразну токсичну дію на структури клітин. Їх пошкоджуюча дія в основному обумовлена подальшою стимуляцією процесів вільнорадикального окиснення, що призводить до розвитку окисного стресу, який проявляється накопиченням токсичних продуктів, ушкодженням молекул, мембран клітин, тканин, зниженням репаративних процесів у рані [3–6].

Toll-подібні рецептори (англ. Toll-like receptors) — клас клітинних рецепторів, які відіграють одну з ключових ролей у природженому

імунитеті та, як нещодавно було показано, регулюють бар'єрну функцію шкіри [7, 8]. Ген *Tlr2* (кодує Toll-подібний рецептор 2) експресується в клітинах неспецифічного імунітету (макрофаги, мастоцити тощо), кератиноцитах, сальних залозах тощо. Продукт цього гена — TLR2 відіграє ключову роль у розпізнаванні компонентів клітинної стінки грам-позитивних бактерій (наприклад, (*Staphylococcus aureus*)), активуванні проти них клітинної гілки імунітету та підтриманні толерантності до власної мікрофлори [2, 9]. Показано зниження рівня експресії та функції TLR2 на моноцитах і макрофагах при atopічному дерматиті, як у людини, так і у тварин [2, 10–12]. Також було виявлено, що TLR2 сигналізація підвищувала цілісність щільних контактів у людини та мишей, що було частково опосередковано посиленою експресією генів білків щільних контактів [2].

Щільні контакти (англ. Tight junctions) — замикаючі міжклітинні контакти, властиві клітинам хребетних тварин, поширені в епітеліальних тканинах, де складають найбільш апікальну частину (лат. Zonula occludens). Вони забезпечують різноманітні функції: контроль за переміщенням іонів, води та молекул через міжклітинні контакти для забезпечення фізичного ущільнення епітелію та клітинної полярності, регулювання сигнальної трансдукції, транскрипції, клітинної проліферації й диференціації тощо [2, 13, 14]. Білок цитоплазматичної пластинки — ZO-1 (Zonula occludens-1, кодується геном *Tjp1*) разом із своїм партнером — оклюдином формує один із відповідних комплексів білок-асоційованих щільних контактів (ZO). Якщо ці білки щільних контактів руйнуються під впливом патогенів, фізичних пошкоджень або за рахунок нестачі кальцію, відбувається порушення бар'єрної функції шкіри, що, у свою чергу, може привести до розвитку ряду патологій шкіри [14–16].

© А.С. ЮЕТ, К.О. ДВОРЩЕНКО, Д.М. ГРЕБІНИК, О.В. ТАБУРЕЦЬ, Т.В. БЕРЕГОВА, Л.І. ОСТАПЧЕНКО 2020

Найпоширенішими методами лікування відкритих ран є використання мазей, гелей, пов'язок, антибіотиків. Проте висока вартість і недостатня ефективність існуючих препаратів спонукає шукати нові терапевтичні речовини, які були б здатними активувати регенеративні процеси як за рахунок стимулювання проліферації відповідних клітинних ліній і складових позаклітинного матриксу, так і шляхом модулювання експресії генів певних трансформуючих факторів росту, специфічних рецепторів і маркерів [1, 5, 6].

Меланіни – пігменти шкіри, волосся, радужки, чорної субстанції мозку тощо належать до поліфенольних сполук. Відомо, що ці сполуки виявляють репаративну, антиоксидантну, протизапальну, ранозагоючу, імуномодулюючу та протипухлинну властивості [17, 18]. Раніше нами було показано, що меланін, продуцентом якого є антарктичні чорні дріжджеподібні гриби *Nadsoniella nigra*, штам Х1-М, висіяні із зразків вертикальних скель острова Галіндез (Українська антарктична станція «Академік Вернадський»), володіє вираженою цитопротекторною дією, і може бути запропонований в якості нового дерматотропного препарату [19].

З огляду на вищезазначене метою роботи було проаналізувати інтенсивність вільнорадикальних процесів та експресію генів *Tlr2*, *Tjp1* під час відновлення цілісності шкіри та при введенні меланіну.

Матеріали і методи. *Експериментальна модель.* Дослідження проведені на білих нелінійних лабораторних щурах-самках масою 200–250 г, $n = 48$, які були розділені на 4 групи. Перед початком експерименту щурів витримували на карантині та маркували нанесенням надсічок на вушні раковини. В якості контролю (перша група) використовували щурів без експериментальних ран. Повношарові вирізані площинні рани відтворювали на попередньо депільованій ділянці шкіри міжлопаткової зони в наркотизованих за допомогою тіопенталу натрію (доза – 50 мг/кг («BiochemieGmbH», Австрія)) щурів. Для цього шкіру вирізали за допомогою хірургічних скальпеля та пінцету, розміром 1×1 см². Загоєння ран у тварин цієї групи (друга група) відбувалося самостійно шляхом епітелізації. Одразу після відтворення ран і до повного загоєння поранення [20, 21] щурів третьої гру-

пи обробляли двічі на добу 0,5%-вим карбополлом (універсальний розчинник препаратів, що являє собою карбоксиакрилові чи карбоксивінілові полімери, для надання їм гелеподібної консистенції («Carborol 980»)) за допомогою металевого шпателя, який перед кожним використанням фламбували. Тваринам четвертої групи впродовж усього експерименту на рани наносили отриману нами мікробіологічним шляхом фармакологічну композицію на основі меланіну (продуцентом якого є антарктичні чорні дріжджеподібні гриби *Nadsoniella nigra*, штам Х1-М), 0,1 % концентрації, розчинену в 0,5 % карбополі.

Так як при виконанні роботи аналізувався характер перебігу експериментального ранового процесу м'яких тканин, термінами спостереження було обрано ключові етапи загоєння – 3, 6, 9, 14 доби та день епітелізації рани, коли послідовно змінюється фаза гострих запальних явищ із вираженою гідратацією, фазами деградації та некролізу, початком розвитку грануляцій, повним заповненням поверхні рани грануляційною тканиною, початком крайової епітелізації та закриттям дефекту рани шкірою [22].

Визначення інтенсивності продукування супероксидного аніон-радикалу. Інтенсивність генерації супероксидного аніон-радикалу в гомогенатах визначали за накопиченням ХТТ-формази [23]. Принцип методу полягає в здатності супероксидних аніонів взаємодіяти із 2,3-біс(2-метокси-4-нітро-5-сульфофеніл)-2Н-тетразолій-5-карбоксианлідом (ХТТ) з утворенням розчинного забарвленого комплексу ХТТ-формази, що має пік поглинання при 470 нм. Вміст білка вимірювали за методом Лоурі [24].

Кількісна 3Т-ПЛР у реальному часі. РНК отримували за методом Chomczynski [25]; 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 °С – 35 с; добування ланцюга 72 °С – 30 с; елонгація ампліфікатів 72 °С – 5 хв.

У реакціях було використано такі послідовності праймерів: для *Tlr2* – прямий – TGGT-AGTTGTGGGTTGAAGC та зворотний – GACAGAGAAGCCTGATTGGAG; *Tjp1* – прямий – CCATCTTTGGACCGATTGCTG та зворотний – TAATGCCCGAGCTCCGATG; для *Actb* (ген β-актину, що використовується в якості внутрішнього контролю реакції завдяки конститутивній експресії) – прямий – TGGGAC-GATATGGAGAAGAT та зворотний – ATTGCSGATAGTGATGACCT. Відтворюваність результатів ампліфікації було перевірено в паралельних експериментах шляхом повторення кПЛР на зразках РНК усіх тварин, із кожним праймером не менше трьох разів ($n = 9$). 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. Відносну кількість мРНК обраховували за порівняльним C_T методом « $\Delta\Delta C_T$ Method» [26], ефективність ПЛР реакцій була однаковою ($E_x = (10^{-1/\text{slope}}) - 1$), $\text{slope} < 0,1$. Відносний рівень експресії зазначених генів нормалізували до мРНК *Actb*.

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 Бонферонні. Отримані результати наведені у вигляді середнього арифметичного \pm середньоквадратичне відхилення (дисперсія) – SD. Результати вважали значущими, коли $p \leq 0,05$.

Результати. Інтенсивність накопичення супероксидного аніон-радикалу. У результаті проведених нами експериментальних досліджень було показано, що вміст супероксидного аніону в групі тварин із різними ранами був вищим у 2; 2,3; 2,1 ($p \leq 0,0001$) і 1,6 рази ($p \leq 0,05$) на 3, 6, 9 і 14 добу загоєння відповідно в порівнянні з контролем (табл. 1). Зазначений показник у другій та третій групі щурів достовірно не відрізнявся.

Однак у щурів, яким на рани наносили меланін, цей показник був в 1,4 ($p \leq 0,05$), 1,7 ($p \leq 0,001$) і 1,6 рази ($p \leq 0,05$) нижчим на 6, 9 і 14 добу відповідно, ніж у тварин, рани яких не обробляли меланіном, та був менш підвищеним відносно контролю: в 1,9 і 1,7 рази ($p \leq 0,0001$) на 3 і 6 добу загоєння відповідно, і вже на 9 добу повертався до контрольних значень.

У попередніх дослідженнях, нами було показано, що повне закриття рани на моделі повношарових вирізаних площинних ран шкіри у тварин шляхом самостійної епітелізації відбувалося на $23,2 \pm 1,0$ день, у той же час у щурів, рани котрих обробляли меланіном, раніше – на $21,0 \pm 0,5$ день [5].

Рівень експресії генів *Tlr2* і *Tjp1*. Нами було виявлено, що рівень експресії гена *Tlr2* в групі тварин із різними ранами був вищим у 3,8;

Накопичення супероксидного радикалу під час відновлення цілісності шкіри та при введенні меланіну ($M \pm SD, n = 7$)

Час, доба	нмоль ХТТ-формазау × мг білка ⁻¹
<i>Контроль</i>	
–	27,3 ± 1,91
<i>Рана</i>	
3	54,6 ± 4,91****
6	62,8 ± 6,15****
9	57,3 ± 4,52****
14	45,0 ± 3,94*
Повна епітелізація	28,5 ± 2,90
<i>Рана + карбопол</i>	
3	56,6 ± 5,91****
6	65,8 ± 6,15****
9	55,3 ± 4,52****
14	48,7 ± 3,94**
Повна епітелізація	29,5 ± 2,90
<i>Рана + карбопол і меланін</i>	
3	50,9 ± 4,87***
6	45,1 ± 3,71*/#
9	33,7 ± 3,24###
14	28,0 ± 2,34#
Повна епітелізація	27,0 ± 2,51

Примітки: **** – $p \leq 0,0001$, *** – $p \leq 0,001$, ** – $p \leq 0,01$, * – $p \leq 0,05$ відносно контролю; ### – $p \leq 0,001$, # – $p \leq 0,05$ рани з нанесеним меланіном відносно тварин із ранами.

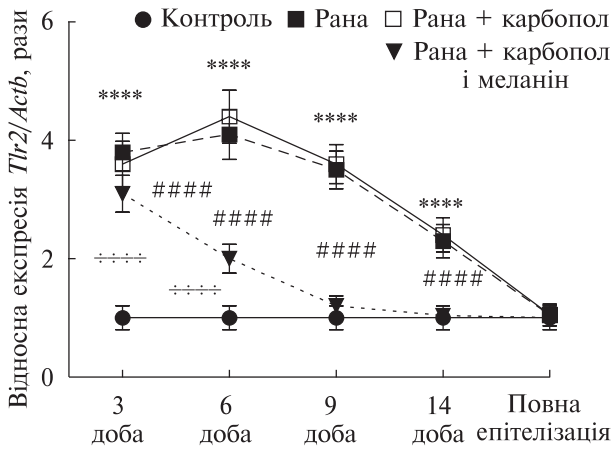


Рис. 1. Рівень експресії мРНК гена *Tlr2* під час відновлення цілісності шкіри та при введенні меланіну. 1 – контроль; 2 – рана; 3 – рана + карбопол; 4 – рана + карбопол і меланін; **** – $p \leq 0,0001$ рани відносно контролю; #### – $p \leq 0,0001$ рани з нанесеним меланіном відносно тварин із ранами; +++++ – $p \leq 0,0001$ рани з нанесеним меланіном порівняно з контролем

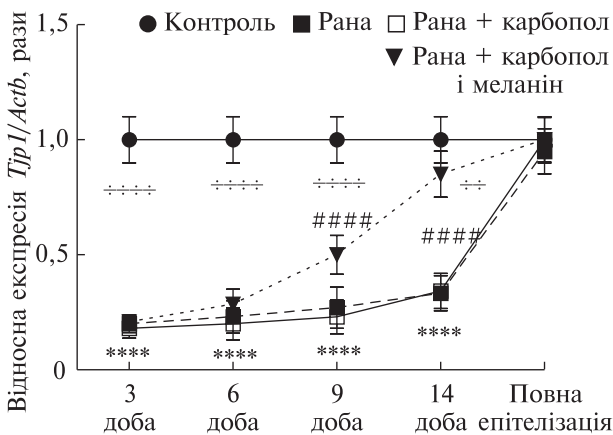


Рис. 2. Рівень експресії мРНК гена *Tlr1* під час відновлення цілісності шкіри та при введенні меланіну. 1 – контроль; 2 – рана; 3 – рана + карбопол; 4 – рана + карбопол і меланін; **** – $p \leq 0,0001$ рани відносно контролю; #### – $p \leq 0,0001$ рани з нанесеним меланіном відносно тварин із ранами; +++++ – $p \leq 0,0001$, ++ – $p \leq 0,01$ рани з нанесеним меланіном порівняно з контролем

4,1; 3,5 і 2,3 раза ($p \leq 0,0001$) на 3, 6, 9 і 14 добу загоєння відповідно в порівнянні з контролем (рис. 1). Рівні експресії цього гена у другій та третій групі щурів достовірно не відрізнялися.

У той же час, у щурів, яким на рани наносили меланін, цей показник був в 1,2 ($p \leq 0,05$), 2,1; 2,9 і 2,2 раза ($p \leq 0,0001$) нижчим на 3, 6, 9 і 14 добу відповідно, ніж у тварин другої групи, та був менш підвищеним відносно контролю: у 3,1 і 2 раза ($p \leq 0,0001$) на 3 і 6 добу загоєння відповідно, і вже на 9 добу повертався до контроль-них значень. Рівень мРНК зазначеного гена був на рівні контролю у другій, третій та четвертій групах тварин при повному закритті рани.

У результаті подальших експериментальних досліджень було показано, що рівень експресії гена *Tlr1* в групі тварин із різаними ранами був нижчим у 5; 4,4; 3,7 і 3 раза ($p \leq 0,0001$) на 3, 6, 9 і 14 добу загоєння відповідно в порівнянні з контролем (рис. 2). Рівні експресії цього гена у другій та третій групі щурів достовірно не відрізнялися.

Проте в щурів, яким на рани наносили меланін, цей показник був в 1,9 ($p \leq 0,0001$) і 2,6 раза ($p \leq 0,0001$) вищим на 9 і 14 добу відповідно, ніж у тварин другої групи, та менше знижувався відносно контролю: у 4,8, 3,5, 2 ($p \leq 0,0001$) і 1,2 раза ($p \leq 0,01$) на 3, 6, 9 і 14 добу загоєння відповідно. Рівень мРНК зазначеного гена був на рівні контролю у другій, третій та четвертій групах тварин при повній епітелізації рани.

Обговорення. Відновлення цілісності шкіри являє собою динамічний процес, з одного боку якого – надмірний запальний процес, з іншого – не загоювання пошкоджень або хронічна рана [1, 2, 5, 6]. Супероксидний аніон-радикал бере безпосередню участь в ініціації вільнорадикальних процесів. Його генерація є пусковою ланкою каскаду реакцій, які призводять до виникнення інших АФК. Зростання вмісту супероксидного аніон-радикалу за умов загоюванні як повношарових площинних вирізаних ран, так і гнійно-некротичних ранових поверхонь після опіків, викликаних розчином кальцієвої солі відбувається за рахунок його генерації у мітохондріальних та мікосомальних електронтранспортних ланцюгах клітин епітелію. Окрім того, додатковим джерелом супероксиду може бути ксантиноксидазна реакція, під час якої в якості побічного продукту продукується $\cdot O_2^-$ радикал [3, 27]. Більше того, масована генерація супероксид-

ного радикалу може відбуватися за рахунок ферменту НАДФН-оксидази, що каталізує одноелектронне відновлення молекулярного кисню за рахунок окиснення НАДФН [28]. Відомо, що найвища експресія НАДФН-оксидаз характерна для запальних клітин, таких як нейтрофіли та макрофаги, які рекрутуються до пошкоджених клітин шкіри та різних органів під час запальних і запалення. Внаслідок так званого «дихального вибуху» запальних клітин відбувається потужне продукування супероксидного-аніону під дією фагоцитарної ізоформи НАДФН-оксидази. Нині вважається, що саме запальні клітини є основним джерелом генерації радикалу $\cdot\text{O}_2^-$. Окрім того, до утворення супероксидного аніону також можуть залучатися нелейкоцитарні ізоформи НАДФН-оксидаз, а також НАДФН-оксидази ендотелію мікросудин шкіри внаслідок підвищення рівня прозапальних цитокінів (зокрема, ФНП- α), які, у свою чергу, є індукторами експресії НАДФН-оксидаз судинного ендотелію [27, 28].

Відомо, що продукування супероксидного аніон-радикалу значно підвищується при ускладненому перебігу травм шкіри та корелює з інтенсивністю запальної фази ранового процесу. Деструктивна роль перебігу ранового процесу та поглиблення вільнорадикальних процесів у тканинах призводять до первинної та вторинної альтерації (загибелі клітин). За рахунок цього помітно ускладнюється епітелізація рани, поширюється некроз тканин та гальмується початок репаративних процесів [5]. Отже, при різних патологічних процесах в організмі, хронічних захворюваннях тощо та за умов не ефективного лікування, дисфункції у відновленні бар'єрних властивостей шкіри можуть призвести до посилення й більш тривалої чутливості до алергенів, мікробної колонізації та/або інфекції на доданок до збільшення втрати трансепідермальної води [4]. Що, у свою чергу, може призвести до ускладнень у зоні розташування рани: гіпертрофічних і келоїдних рубців, трофічних виразок, хронічних ран та інколи пухлин [1, 5, 6].

Епідермальні щільні контакти, які складаються з трансмембранних білків, — це динамічні структури, що зменшують чи збільшують щільність у відповідь як на ендогенні сигнали з епітеліальних і субепітеліальних компартмен-

тів, так і на дію екзогенних агентів: бактерій та алергенів. Зміни в експресії будь-якого гена, що кодує білок щільних контактів, мають значний вплив на цілісність щільних контактів в цілому [2, 29]. У нашому дослідженні було виявлено зниження рівня мРНК гена *Tjp1*, що кодує білок цитоплазматичної пластинки ZO-1 при різаних ранах щурів. Подібні результати було отримано в пацієнтів з atopічним дерматитом, на тваринних моделях повношарових вирізаних площинних ран і в культурі неонатальних первинних кератиноцитів людини [2, 30]. Так, було показано, що відновлення щільних контактів у кератиноцитах було індуковано впливом рецептора вродженого імунітету TLR2. Наприклад, миші, нокаутні за геном *Tlr2* (*Tlr2*^{-/-}), при експериментальних моделях поранень мали уповільнене й неповне відновлення бар'єрної функції шкіри [2]. При цьому, на механічній епідермальній моделі поранень у людини (зняття верхнього шару шкіри на липку стрічку (англ. tape-stripping)) було показано, що деякі білки теплового шоку та гіалуронова кислота були лігандами рецептора TLR2 [2, 31]. Також експресія *Tlr2* була активована синантропними бактеріями мишей. І під дією агоністів TLR2 відбулося відновлення синтезу білків щільних контактів [2]. Нами було продемонстровано підвищення рівня мРНК гена *Tlr2* при різаних ранах шкіри щурів.

TLR давня та еволюційно консервативна родина рецепторів, які відіграють критичну роль у вродженому імунітеті та запальних процесах [32]. TLR розпізнають консервативні патоген-асоційовані молекулярні патерни (PAMPs), які властиві великій групі мікроорганізмів, і відіграють роль у індукції вродженої та набутої імунної відповіді [32, 33]. На сьогодні, уже встановлений зв'язок між TLR і PPAR γ -шляхами. Взаємодія ліпополісахаридів клітинних оболонок бактерій із TLR-рецепторами спричинює активацію внутрішньоклітинного сигнального каскаду, опосередкованого ядерними рецепторами PPAR γ , протизапальна роль яких показана численними дослідженнями [34].

Отже, на основі отриманих результатів і літературних даних ми можемо припустити, що підвищена експресія *Tlr2* в сусідніх клітках епідермісу (у клітинному шарі нижче щільних контактів) при руйнуванні шкірного бар'єру

[2, 35] є необхідною для виконання наступних функцій. По-перше, це швидке реагування на патогенні мікроорганізми, що проліферують у місці дефекту рани. Друга функція полягає в сприянні ранньому формуванню щільних контактів у кератиноцитах, які утворюють моношар над дермальною основою рани. Раннє утворення таких щільних контактів запобігає подальшому витоку сироватки і тим самим обмежує кількість поживних речовин і молекул адгезії, які сприятимуть надмірному росту мікроорганізмів. І, крім того, це також зведе до мінімуму втрату води, попереджаючи зневоднення рани [2]. У свою чергу, синтез відповідних щільних контактів також буде необхідним для пригнічення TLR2 – опосередкованого запалення, котре може бути шкідливим на пізніх стадіях загоєння ран. Потрібні подальші дослідження для виявлення механізмів, за допомогою яких TLR2 сприяє відновленню бар'єрної функції щільних контактів. Запропоновано, що інтерлейкін 1 та ФНП- α можуть бути важливими медіаторами при TLR2-опосередкованій репарації шкірного бар'єру. Тоді як деякі мікроРНК навпаки пригнічують синтез TLR2, як, ймовірно, і його функцію [2, 36, 37].

Раніше нами було встановлено, що швидке відновлення цілісності шкіри, опосередковане ранами різної етіології, при застосуванні меланіну відбувалося на початковій фазі регенерації шкіри, що свідчило про доцільність у застосовуванні цієї речовини для лікування як різаних ран, так й інфекційних гнійно-запальних процесів [5, 6]. У роботі ми спостерігали менше зниження рівня експресії гена *Tjp1*, відсутність гіперекспресії гена *Tlr2* на тлі пригнічення накопичення супероксидного радикалу при відновленні цілісності шкіри саме за умов застосування меланіну. Так, зменшення експресії *Tlr2* за умов використання цієї речовини можна пояснити потужною бактерицидною дією меланіну на патологічну мікрофлору: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, виявлену в наших попередніх дослідженнях [5]. Це свідчить про те, що репаративна активність TLR2 задля прискорення відновлення епідермального бар'єру та обмеження росту патогенних мікроорганізмів може бути на меншому рівні при

загоюванні ран різної етіології саме за умов використання меланіну.

Як було зазначено, меланін захищає організм від ультрафіолетового та рентгенівського опромінення, володіє радіопротекторною, стресопротекторною, цитопротекторною, антиоксидантною та протизапальною дією [5, 17–19]. Продуктом меланіну, задіяному в нашому дослідженні, є дріжджеподібні гриби, що живуть в екстремальних умовах Антарктичного півострову та використовують меланін для захисту від шкідливого ультрафіолетового випромінювання, перетворюючи енергію на безпечну кількість тепла. Завдяки цій властивості меланін поглинає до 99,9 % ультрафіолету, попереджає утворення вільних радикалів на мінімальному рівні і може бути сильнішим радіопротектором, антиоксидантом тощо в порівнянні з іншими меланінами [5, 17].

Щодо можливих механізмів впливу меланіну як поліфенольної сполуки на експресію проаналізованих генів під час відновлення цілісності шкіри, перш за все, слід зазначити його виражену цитопротекторну дію: він знижує активність процесів перекисного окиснення ліпідів, збільшує активність ферментів антиоксидантної системи, запобігаючи пошкодженню ДНК; впливає на продукцію цитокинів: TNF- α , IL-6, VEGF тощо за рахунок, наприклад, впливу на експресію ядерних рецепторів PPAR [38]; посилює експресію eNOS та виділення протизапальних цитокинів для зниження інтенсивності запалення при ранозагоєнні [5, 6, 17–19]. Отже, отримані нами результати можуть свідчити про доцільність застосовування меланіну для лікування гнійно-запальних процесів при пораненнях шкіри.

Висновки. Молекулярно-генетичний аналіз виявив зниження рівня експресії гена *Tjp1* при загоюванні повношарових вирізаних площинних ран шкіри щурів на тлі зростання вмісту супероксидного аніон-радикалу. Відновлення рівня експресії цього гена може бути опосередковано зростанням рівня експресії гена *Tlr2*. При застосуванні меланіну за тих самих умов рівень експресії *Tjp1*, як і вміст супероксидного аніон-радикалу, швидше наближався до контрольних значень за відсутності гіперекспресії гена *Tlr2*, під час відновлення цілісності шкіри.

Дотримання етичних стандартів. Позитивний висновок біоетичної комісії отримано на засіданні біоетичної комісії ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету ім. Тараса Шевченка від 29 листопада 2017 р. У роботі дотримувалися міжнародних рекомендацій стосовно проведення медико-біологічних досліджень із використанням тварин згідно Європейської конвенції (European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes), а також Закону України № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» від 21 лютого 2006 р.

Конфлікт інтересів. Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів, фінансових чи інших.

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

TLR2, TJP1 GENES EXPRESSION DURING RESTORATION OF SKIN INTEGRITY

A. Huet, K. Dvorshchenko, O. Taburets, D. Grebinyk, T. Beregova, L. Ostapchenko

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

E-mail: alevtina.dranitsina@gmail.com

The decrease of *Tjp1* gene expression against the background of activation of free radical processes (increase in the content of superoxide anion-radical) was observed during healing of full-thickness skin wounds in rats. The restoration of the expression level of this gene may be mediated by an increase in the expression level of *Tlr2* gene. The level of *Tjp1* gene expression as well as the content of the superoxide anion radical, was closer to the control values at the specified wound pattern in the absence of *Tlr2* gene overexpression upon the treatment with melanin during restoration of skin integrity.

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ *TLR2* И *TJP1* ВО ВРЕМЯ ВОССТАНОВЛЕНИЯ ЦЕЛОСТНОСТИ КОЖИ

A.С. Юет, Е.А. Дворщенко, Д.Н. Гребиньк, О.В. Табурец, Т.В. Береговая, Л.И. Остапченко

Показано снижение уровня экспрессии гена *Tjp1* при заживлении полнослойных вырезанных плоскостных ран кожи крыс на фоне активации сво-

боднорадикальных процессов (увеличение содержания супероксидного анион-радикала). Восстановление уровня экспрессии этого гена может быть опосредовано ростом уровня экспрессии гена *Tlr2*. При применении меланина при тех же условиях уровень экспрессии *Tjp1*, как и содержание супероксидного анион-радикала, быстрее приближалось к контрольным значениям при отсутствии гиперэкспрессии гена *Tlr2*, во время восстановления целостности кожи.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Penn, J.W., Grobbelaar, A.O., and Rolfe, K.J., The role of the TGF- β family in wound healing, burns and scarring: a review. *Int. J. Burn. Trauma.* 2012, vol. 2, no. 1, pp. 18–28.
2. Kuo, I.-H., Carpenter-Mendini, A., Yoshida, T., McGirt, L.Y., Ivanov, A.I., Barnes, K.C., Gallo, R.L., Borkowski, A.W., Yamasaki, K., Leung, D.Y., Georas, S.N., De Benedetto, A., and Beck, L.A., Activation of epidermal toll-like receptor 2 enhances tight junction function – Implications for atopic dermatitis and skin barrier repair. *J. Invest. Dermatol.* 2013, vol. 133, no. 4, pp. 988–98. <https://doi.org/10.1038/jid.2012.437>
3. Korotkyi, O., Dvorshchenko, K., Vovk, A., Dranitsina, A., Tymoshenko, M., Kot, L., and Ostapchenko, L., Effect of probiotic composition on oxidative/antioxidant balance in blood of rats under experimental osteoarthritis. *Ukr. Biochem. J.* 2019, vol. 91, no. 6, pp. 49–58. <https://doi.org/10.15407/ubj91.06.049>.
4. Wagener, F.A., Carels, C.E., and Lundvig, D.M., Targeting the redox balance in inflammatory skin conditions. *Int. J. Mol. Sci.* 2013, vol. 14, no. 9, pp. 126–67. <https://doi.org/10.3390/ijms14059126>.
5. Dranitsina, A.S., Taburets, O.V., Dvorshchenko, K.O., Grebinyk, D.M., Beregova, T.V., and Ostapchenko, L.I., TGF β 1, PTGS 2 Genes Expression during Dynamics of Wound Healing and with the Treatment of Melanin. *Res. J. Pharm., Biol. Chem. Sci.* 2017, vol. 8, no. 1, pp. 2014–23. <https://doi.org/10.3103/S0095452718030039>.
6. Flavia, Alvim, Sant'anna, Addor., Antioxidants in dermatology. *An. Bras. Dermatol.* 2017, vol. 92, no. 3, pp. 356–62. <https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20175697>.
7. Cario, E., Gerken, G., and Podolsky, D.K., Toll-like receptor 2 enhances ZO-1-associated intestinal epithelial barrier integrity via protein kinase C. *Gastroenterol.* 2004, vol. 127, pp. 224–38. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2004.04.015>.
8. Yuki, T., Yoshida, H., Akazawa, Y., Komiya, A., Sugiyama, Y., and Inoue, S., Activation of TLR2

- enhances tight junction barrier in epidermal keratinocytes. *J. Immunol.* 2011b, vol. 187, pp. 3230–7. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100058>.
9. Rajaiah, R., Perkins, D.J., Ireland, D.D.C., and Vogel, S.N., CD14 dependence of TLR4 endocytosis and TRIF signaling displays ligand specificity and is dissociable in endotoxin tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2015, vol. 112, pp. 8391–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.1424980112>.
 10. Lixiang, Sun, Wenjie, Liu, and Ling-juan, Zhang., The Role of Toll-Like Receptors in Skin Host Defense, Psoriasis, and Atopic Dermatitis. *J. Immunol. Res.* 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/1824624>.
 11. Bo, Zhang, Yeong Min, Choi, Junwoo, Lee, In Sok, An, Li, Li, Congfen, He, Yinmao, Dong, Seunghee, Bae, and Hong, Meng., Toll-like receptor 2 plays a critical role in pathogenesis of acne vulgaris. *Med. Dermatol.* 2019, vol. 4, pp. 1–6. <https://doi.org/10.1186/s41702-019-0042-2>.
 12. Niebuhr, M., Lutat, C., Sigel, S., and Werfel, T., Impaired TLR-2 expression and TLR-2-mediated cytokine secretion in macrophages from patients with atopic dermatitis. *Allergy.* 2009, vol. 64, pp. 1580–7. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2009.02050.x>.
 13. Brandner, J.M., Kief, S., Grund, C., Rendl, M., Hudedek, P., Kuhn, C., Tschachler, E., Franke, W.W., and Moll, I., Organization and formation of the tight junction system in human epidermis and cultured keratinocytes. *Europ. J. Cell Biol.* 2002, vol. 81, pp. 253–63. <https://doi.org/10.1078/0171-9335-00244>.
 14. Qiao X, Roth I, Féraillé E, Hasler U. Different effects of ZO-1, ZO-2 and ZO-3 silencing on kidney collecting duct principal cell proliferation and adhesion. *Cell Cycle.* 2014, vol. 13, no. 19, pp. 3059–75. <https://doi.org/10.4161/15384101.2014.949091>.
 15. Steed, E., Balda, M.S., and Matter, K., Dynamics and functions of tight junctions. *Trends Cell Biol.* 2010, vol. 20, pp. 142–9. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2009.12.002>.
 16. Bauer, H., Zweimueller-Mayer, J., Steinbacher, P., Lametschwandtner, A., and Bauer, H.C., The dual role of zonula occludens (ZO) proteins. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010; 2010, pp. 402593. <https://doi.org/10.1155/2010/402593>.
 17. Stacey, A. N. D’Mello, Graeme, J. Finlay, Bruce C., Baguley, Marjan, E., Askarian-Amiri., *Signal. Path. Melanog.* 2016, vol. 17, no. 7, pp. 1144. <https://doi.org/10.3390/ijms17071144>.
 18. El-Obeid, A., Al-Harbi, S., Al-Jomah, N., Hassib, A., Herbal melanin modulates tumor necrosis factor (TNF- α), interleukin 6 (IL-6) and vascular endothelial growth factor (VEGF) production. *Phytomed.* 2006, vol. 13, pp. 324–33. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2005.03.007>.
 19. Golyshkin, D.V., Falaleeva, T.M., Neporada, K.S., and Beregova, T.V., Effect of melanin on the condition of gastric mucosa and reaction of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis under acute stress. *Physiol. J.* 2015, vol. 61, no. 2, pp. 65–72. <https://doi.org/10.15407/fz61.02.065>.
 20. Henry, S.L., Concannon, M.J., and Yee, G.J., The effect of magnetic fields on wound healing. Experimental study and review of the literature. *Open Acc. J. Plast. Surg.* 2008, vol. 8, pp. 393–9.
 21. Bilyayeva, O., Neshta, V.V., Golub, A., Sams-Dodd, F., Effects of Sea Silon wound healing in the rat. *J. Wound Care.* 2014, vol. 23, no. 8, pp. 140–6. <https://doi.org/10.12968/jowc.2014.23.8.410>.
 22. Schäfer, M., Werner, S., Oxidative stress in normal and impaired wound repair. *Pharmacol. Res.* 2008, vol. 58, pp. 165–71. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2008.06.004>.
 23. Sutherland, M.W., Learmonth, B.A., The tetrazolium dyes MTS and XTT provide new quantitative assays for superoxide and superoxide dismutase. *Free Radic. Res.* 1997, vol. 27, no. 3, pp. 283–9. <https://doi.org/10.3109/10715769709065766>.
 24. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J., Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951, vol. 193, no. 1, pp. 265–75. PubMed PMID: 14907713.
 25. Chomczynski, P., Sacchi, N., Single-step method of RNA isolation by acid guanidiniumthiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 1987, vol. 162, no. 1, pp. 156–9. <https://doi.org/10.1006/abio.1987.9999>.
 26. Lee, W.H., Sonntag, W.E., Mitschelen, M., Yan, H., and Lee, Y.W., Irradiation induces regionally specific alterations in pro-inflammatory environments in rat brain. *Int. J. Radiat. Biol.* 2010, vol. 280, no. 2, pp. 132–44. <https://doi.org/10.3109/09553000903419346>.
 27. Sakuma, S., Kitamura, T., Kuroda, C., Takeda, K., Nakano, S., Hamashima, T., Kohda, T., Wada, S., Arakawa, Y., and Fujimoto, Y., All-trans Arachidonic acid generates reactive oxygen species via xanthine dehydrogenase/xanthine oxidase interconversion in the rat liver cytosol in vitro. *J. Clin. Biochem. Nutr.* 2012, vol. 51, no. 1, vol. 51, no. 1, pp. 55–60. <https://doi.org/10.3164/jcbrn.11-97>.
 28. Heike, Langbein, Coy, Brunssen, Anja Hofmann, Peter, Cimalla, Melanie, Brux, Stefan R., Bornstein, Andreas, Deussen, Edmund, Koch, and Henning, Morawietz., NADPH oxidase 4 protects against development of endothelial dysfunction and atherosclerosis in LDL receptor deficient mice. *Europ. Heart J.* 2016, vol. 37, no. 22, pp. 1753–61. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehv564>.
 29. Guo, W., Wang, P., Liu, Z., and Ye, P. Analysis

- of differential expression of tight junction proteins in cultured oral epithelial cells altered by Porphyromonas gingivalis, Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide, and extracellular adenosine triphosphate. *Int. J. Oral. Sci.* 2018, vol. 10, no. 1, e8. <https://doi.org/10.1038/ijos.2017.51>.
30. De Benedetto, A., Rafaels, N.M., McGirt, L.Y., Ivanov, A.I., Georas, S.N., Cheadle, C., Berger, A.E., Zhang, K., Vidyasagar, S., Yoshida, T., Boguniewicz, M., Hata, T., Schneider, L.C., Hanifin, J.M., Gallo, R.L., Novak, N., Weidinger, S., Beaty, T.H., Leung, D.Y., Barnes, K.C., and Beck, L.A., Tight junction defects in patients with atopic dermatitis. *J. Allerg. Clin. Immun.* 2011, vol. 127, pp. 773–86, e1–7. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2010.10.018>.
 31. Dickel, H., Gambichler, T., Kamphowe, J., Altmeyer, P., and Skrygan, M., Standardized tape stripping prior to patch testing induces upregulation of Hsp90, Hsp70, IL-33, TNF-alpha and IL-8/CXCL8 mRNA: new insights into the involvement of 'alarmins'. *Contact dermatitis.* 2010, vol. 63, pp. 215–22. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0536.2010.01769.x>.
 32. Berthelot, J.-M., Sellam, J., Maugars, Y., and Berenbaum, F., Cartilage-gut-microbiome axis: a new paradigm for novel therapeutic opportunities in osteoarthritis. *RMD Open.* 2019, vol. 5, e001037. <https://doi.org/10.1136/rmdopen-2019-001037>.
 33. Rajaiyah, R., Perkins, D.J., Ireland, D.D.C., and Vogel, S.N., CD14 dependence of TLR4 endocytosis and TRIF signaling displays ligand specificity and is dissociable in endotoxin tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2015, vol. 112, pp. 8391–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.1424980112>.
 34. Nasim, Dana, Golnaz, Vaseghi, and Shaghayegh Haghjooy, Javanmard., Crosstalk between Peroxisome Proliferator-Activated Receptors and Toll-Like Receptors: A Systematic Review. *Adv. Pharm. Bull.* 2019, vol. 9, no. 1, pp. 12–21. <https://doi.org/10.15171/apb.2019.003>.
 35. Jin, H., Kumar, L., Mathias, C., Zurakowski, D., Oettgen, H., Gorelik, L., and Geha, R., Toll-like receptor 2 is important for the T(H)1 response to cutaneous sensitization. *J. Allerg. Clin. Immun.* 2009, vol. 123, no. 4, pp. 875–82. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2009.02.007>.
 36. Nahid, M.A., Satoh, M., and Chan, E.K., Mechanistic role of microRNA-146a in endotoxin-induced differential cross-regulation of TLR signaling. *J. Immunol.* 2011, vol. 186, pp. 1723–34. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002311>.
 37. Ding, Y., Wang, L., Zhao, Q., Wu, Z., and Kong, L., MicroRNA-93 inhibits chondrocyte apoptosis and inflammation in osteoarthritis by targeting the TLR4/NF-kB signaling pathway. *Int. J. Mol. Med.* 2019, vol. 43, no. 2, pp. 779–90. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.4033>.
 38. Cui, Y., Wang, X.L., Xue, J., Liu, J.Y., and Xie, M.L., Chrysanthemum morifolium extract attenuates high-fat milk-induced fatty liver through peroxisome proliferator-activated receptor alpha-mediated mechanism in mice. *Nutr. Res.* 2014, vol. 34, pp. 268–75. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2013.12.010>.

Надійшла в редакцію 16.06.20
Після доопрацювання 17.07.20
Прийнята до друку 18.11.20