

## ЕКСПРЕСІЯ ГЕНІВ *CFTR*, *NFKB1* ТА *OSLN* ПІД ЧАС ВІДНОВЛЕННЯ ЦІЛІСНОСТІ ШКІРИ

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

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

E-mail: alevtina.dranitsina@gmail.com

*Показано зниження рівня експресії генів *Cftr* та *Osln* при загоєнні як повношарових вирізаних площинних ран, так і гнійно-некротичних ран шкіри щурів на тлі зростання рівня експресії гена *Nfkb1*. Відновлення рівня експресії *Osln* може бути опосередковано зростанням рівня експресії гена *Cftr* за рахунок зменшення рівня мРНК гена *Nfkb1*. При застосуванні меланіну за тих самих умов експресія *Cftr* та *Osln* швидше наближалася до відповідних значень контрольної групи щурів за відсутності гіперекспресії гена *Nfkb1*, під час відновлення цілісності шкіри.*

**Ключові слова:** експресія генів *Cftr*, *Nfkb1*, *Osln*, повношарові вирізаних площинні рани та гнійно-некротичні рани шкіри, меланін.

**Вступ.** Гіпертрофічні рубці – це тип фібропроліферативного стану шкіри, що виникає в результаті патологічного процесу загоєння ран після опіків, важкої травми або хірургічних процедур (Caldas et al, 2020; Zhou et al, 2020; Lee et al, 2018). Зазвичай гіпертрофічні рубці червоні, запалені, жорсткі, і навіть болючі. Гістологічно вони характеризуються надмірним відкладенням колагену в дермі, що є результатом незбалансованого синтезу та деградації позаклітинного матриксу (Caldas et al, 2020; Zhou et al, 2020).

В останні роки було проведено численні дослідження гіпертрофічних рубців, у той час як механізм, що лежить в основі їх утворення, залишається складним і не повністю вивченим. Зокрема, було продемонстровано, що декілька факторів відіграють домінуючу роль у формуванні таких рубців у людини, включаючи механічне перевантаження, місцеве запалення та активацію фібробластів (Zhou et al, 2020; Sarraza et al, 2011).

Ген муковісцидозу – *Cftr* – це ген, який кодує електрогенний трансмембранний регуля-

торний білок CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator), який функціонує як  $\text{cAMP}^+$  – і  $\text{Ca}^{2+}$  – залежний хлорний канал. Нещодавно було виявлено, що крім транспортування аніонів, CFTR бере участь в інших біологічних процесах, включаючи розвиток запалення, проліферацію та диференціацію клітин, а також загоєння ран (Dong et al, 2015; Chen et al, 2016). Зокрема, кілька досліджень продемонстрували, що CFTR, який експресується в шкірі миші, спочатку зменшується, а потім знову з'являється під час загоєння ран. Більше того, дефіцит CFTR може викликати уповільнене загоєння поранень шкіри. Оскільки гіпертрофічні рубці є результатом аномального загоєння ран, можна припустити, що зниження регуляції CFTR також може сприяти формуванню таких рубців (Dong et al, 2015; Chen et al, 2016).

Раніше було продемонстровано, що CFTR може регулювати синтез білків щільних контактів (англ. Tight junctions), наприклад: ZO-1 (Zonula occludens-1) та оклюдину (кодується геном *Osln*) (De Lisle, 2014). Одним із основних механізмів такого впливу може бути розвиток надмірного запалення після поранень. Нокаут CFTR в епітелії кишечника призводив до посиленого вивільнення прозапальних цитокінів, включаючи інтерлейкін-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) та інтерлейкін-8 (IL-8) (Crites et al, 2015), які порушували щільні контакти, зумовлюючи подальші дефекти епітеліального бар'єру (Orman et al, 2011; Liu et al, 2021). Крім того, на різних патологічних станах було показано, що передача сигналів ядерного фактора- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B, (англ. Nuclear factor kappa B)) може опосередковувати продукцію цитокінів, регульовану CFTR, на тлі зменшення експресії *Cftr* (Dong et al, 2015; Li et al, 2018; Liu et al, 2021).

Субодинація один ядерного фактора- $\kappa$ B – NF- $\kappa$ B1 – це білок (кодується однойменним

геном *Nfkb1*), що контролює велику групу генів, залучених до розвитку запалення, проліферації клітин та апоптозу. Експресія цього гена, у свою чергу, може бути активованою цитокінами, активними формами кисню, бактеріями тощо (Kanigur-Sultuybek et al, 2020; Liu et al, 2021).

На сьогоднішній день, як і раніше, не знайдено специфічного лікування як для запобігання, так і зменшення будь-яких форм рубцювання. Численні клінічні дослідження, сучасні методи лікування й запропоновані профілактичні процедури в більшості не стандартизовані й вимагають подальшого аналізу. Висока вартість і недостатня ефективність існуючих препаратів (мазі, гелі, пов'язки, антибіотики тощо) спонукає шукати нові терапевтичні речовини, які були б здатними активувати регенеративні процеси та звести до мінімуму розвиток імунної відповіді як за рахунок стимулювання проліферації відповідних клітинних ліній і складових позаклітинного матриксу, так і шляхом модулювання експресії відповідних генів, залучених до процесу загоєння поранень (Alvim et al, 2017; Caldas et al, 2020).

Меланіни – це група фенольних полімерів, які зустрічається на всіх рівнях еволюційного масштабу від грибів і бактерій до рослин, молюсків, риб, птахів і ссавців, аж до людини (пігменти шкіри, волосся, райдужки тощо) (Caldas et al, 2020; Cavallini et al, 2020). Відомо, що ці сполуки виявляють репаративну, антиоксидантну, протизапальну, ранозагоєвальну, імуномодулюючу та протипухлинну властивості (Caldas et al, 2020; Cavallini et al, 2020). Було показано, що меланін, продуцентом якого є антарктичні чорні дріжджоподібні гриби *Nadsoniella nigra*, штам X1-M, висіяні із зразків вертикальних скель острова Галіндз (Українська антарктична станція «Академік Вернадський»), мав виражену цитопротекторну дію, і, відповідно, його можна запропонувати в якості нового дерматотропного препарату (Golyshkin et al, 2015; Huet et al, 2020).

З огляду на вищесказане метою роботи було проаналізувати експресію генів *Cftr*, *Nfkb1* та *Ocln* під час відновлення цілісності шкіри після поранень різної етіології та при введенні меланіну.

**Матеріали і методи.** Експериментальна модель. Дослідження проведені на білих нелінійних лабораторних щурах-самках масою 200–250 г, n = 96, які були розділені на 8 груп. Перед початком експерименту щурів витримували на карантині та маркували нанесенням надсічок на вушні раковини. В якості контролю (перша група для кожної експериментальної моделі поранень шкіри) використовували щурів без ран. У другій групі тварин відповідно до моделі були 1) щури, яким моделювали повношарові вирізані площинні рани; або 2) опіки, викликані розчином кальцієвої солі.

*Модель повношарової вирізаної площинної рани (різана рана).* Такі 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 см<sup>2</sup>.

*Модель опіку, викликаного розчином кальцієвої солі (гнійно-некротична рана).* Хімічний опік шкіри викликали підшкірним введенням 0,1 мл CaCl<sub>2</sub>. При цьому, розміри ран не перевищували 400 мм<sup>2</sup>. На 4-5й день здійснювали некротомію уражених ділянок.

Загоєння ран у тварин другої групи кожної моделі відбувалося самостійно шляхом епітелізації. Одразу після відтворення ран і до повного загоєння поранення щурів третьої групи кожної моделі обробляли двічі на добу 0,5%-ним карбополом (універсальний розчинник препаратів, що являє собою карбоксиакрилові чи карбоксивінілові полімери, для надання їм гелеподібної консистенції («Carbopol 980») за допомогою металевого шпателя, який перед кожним використанням фламбували. Тваринам четвертої групи кожної моделі впродовж усього експерименту на рани наносили отриману мікробіологічним шляхом фармакологічну композицію на основі меланіну (продуцентом котрого є антарктичні чорні дріжджоподібні гриби *Nadsoniella nigra*, штам X1-M), 0,1 % концентрації, розчинену в 0,5%-ному карбополі (Huet et al, 2020).

Так як при виконанні роботи аналізувався характер перебігу експериментального ранового процесу м'яких тканин, термінами спо-

стереження 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, очищенням рани від гнійно-некротичних мас, початком розвитку грануляцій, повним заповненням поверхні рани грануляційною тканиною, початком крайової епітелізації та закриттям дефекту рани шкірою (Huet et al, 2020).

**Кількісна ЗТ-ПЛР у реальному часі.** РНК отримували за методом Chomczynski (Chomczynski et al, 1987). 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 *Cftr* – прямий – АСТСТ ТСТТCAGCTGGACCACACCA та зворотний – AAAGCATCGCCGGAGGGCGT; *Nfkb1* – прямий – TTCCTGATCCCGACAAGAАСТG та зворотний – CCCCCAGAGACSTCATAGTTG T; *Ocln* – прямий – ТСТТТGTATAAGTCACC GCCT і зворотний – GTTTCATAGTGGTCT GGGTCTG; для *Actb* (ген β-актину, що використовується в якості внутрішнього контролю реакції завдяки конститутивній експресії) – прямий – TGGGACGATATGGAGAAG AT та зворотний – ATTGCCGATAGTGATGA CCT. 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. Відносну кількість мРНК обраховували за порів-

няльним  $C_T$  методом « $\Delta\Delta C_T$  Method» (Livak et al, 2001), ефективність ПЛР реакцій була однаковою ( $E_x = (10^{-1/\text{slope}}) - 1$ ),  $\text{slope} < 0,1$ . Відносний рівень експресії зазначених генів нормалізували до рівня експресії *Actb*.

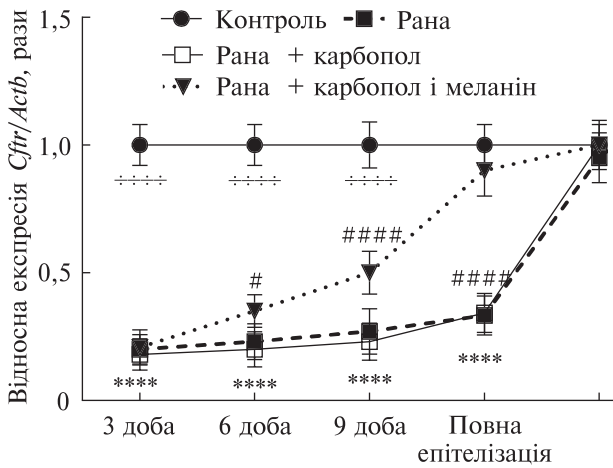
**Статистична обробка результатів досліджень.** Отримані дані тестували на нормальне розподілення за допомогою тесту Шапіро-Вілка з використанням програмного пакету «GraphPad Prism 8.4.3» («GraphPad Software Inc.», США). Подальший обрахунок результатів відбувався за допомогою двофакторного дисперсійного аналізу (two-way ANOVA) із пост тестом Бонферонні. Отримані результати наведені у вигляді середнього арифметичного  $\pm$  середньоквадратичне відхилення – SD. Результати вважали значущими, коли  $p \leq 0,05$ .

**Результати.** У попередніх дослідженнях, нами було показано, що повне закриття рани на моделі повношарових вирізаних площинних ран шкіри (різана рана) у тварин шляхом самостійної епітелізації відбувалося на  $23,2 \pm 1,0$  день, у той же час у шурів, рани яких обрахували меланіном, раніше – на  $21,0 \pm 0,5$  день (Huet et al, 2020).

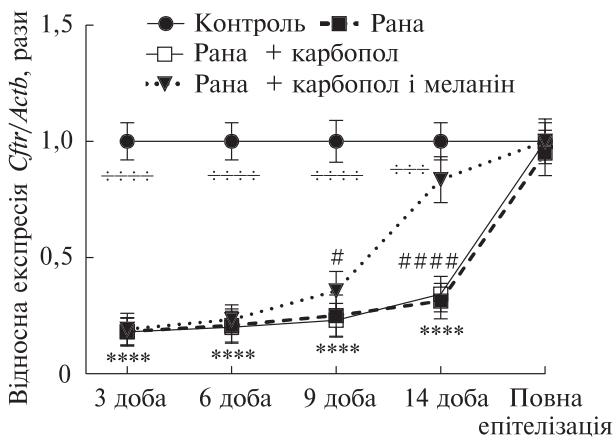
Хімічний опік, викликаний підшкірним введенням кальцієвої солі (гнійно-некротична рана), призвів до масивного некрозу тканин у зоні введення, площею 900 мм<sup>2</sup>. Некротомія сприяла формуванню щільного струпу, під яким відбувалася репарація тканин, у той час як навколишні тканини поступово відмирили, збільшуючи площу та глибину рани до тих пір, поки концентрація введеної хімічної речовини не зменшилась. Тому повне закриття таких ран шляхом самостійної епітелізації відбувалося на  $38,1 \pm 0,5$  день, а у шурів, рани яких обрахували меланіном, раніше – на  $36,0 \pm 0,7$  день (Huet et al, 2020).

**Рівень експресії генів *Cftr* і *Nfkb1*.** Нами було показано, що рівень експресії гена *Cftr* у групі тварин із різними ранами був нижчим у 4,7, 4, 3 і 2,2 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 шурів значуще не відрізнялися.

У той же час, у шурів, яким на рани наносили меланін, цей показник був в 1,5 ( $p \leq 0,05$ ), 1,9 і 2,7 раза ( $p \leq 0,0001$ ) вищим



**Рис. 1.** Рівень експресії гена *C/Actb* у динаміці загоєння різаних ран та при введенні меланіну. 1 – контроль; 2 – рана; 3 – рана + карбопол; 4 – рана + карбопол і меланін; \*\*\*\* –  $p \leq 0,0001$  рани відносно контролю; #### –  $p \leq 0,0001$ , # –  $p \leq 0,05$  рани з нанесеним меланіном відносно тварин із ранами; +++++ –  $p \leq 0,0001$ , рани з нанесеним меланіном порівняно з контролем



**Рис. 2.** Рівень експресії гена *C/Actb* у динаміці загоєння гнійно-некротичних ран та при введенні меланіну. 1 – контроль; 2 – рана; 3 – рана + карбопол; 4 – рана + карбопол і меланін; \*\*\*\* –  $p \leq 0,0001$  рани відносно контролю; #### –  $p \leq 0,0001$ , # –  $p \leq 0,05$ , рани з нанесеним меланіном відносно тварин із ранами; +++++ –  $p \leq 0,0001$ , +++ –  $p \leq 0,001$  рани з нанесеним меланіном порівняно з контролем

на 6, 9 і 14 добу відповідно, ніж у тварин з нелікованими ранами, та був менш зниженим відносно контролю: у 4,3; 2,9 і 2 рази ( $p \leq 0,0001$ ) на 3, 6 і 9 добу загоєння відповідно, і

вже на 14 добу повертався до контролю. Рівень мРНК зазначеного гена був на рівні контрольних значень у другій, третій та четвертій групах тварин при повній епітелізації рани.

Нами було виявлено більш значне зменшення рівня експресії цього гена при гнійно-некротичних ранах порівняно з повношаровими вирізаними ранами. Так, у групі тварин з опіками без лікування цей показник був нижчим у 5,5; 4,8; 4 і 3,2 рази ( $p \leq 0,0001$ ) 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 значуще не відрізнялися.

Проте у щурів, на рани яких наносили меланін, цей показник був в 1,4 ( $p \leq 0,05$ ) і 2,7 рази ( $p \leq 0,0001$ ) вищим на 9 і 14 добу відповідно, ніж у тварин другої групи, та менше знижувався відносно контролю: у 5,2; 4,3; 2,8 рази ( $p \leq 0,0001$ ) і майже 1,2 рази ( $p \leq 0,001$ ) 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.

У результаті подальших експериментальних досліджень було показано, що рівень експресії гена *Nfkb1* в групі тварин з різаними ранами був вищим у 3,7; 4,2; 3,5 і 2,2 рази ( $p \leq 0,0001$ ) на 3, 6, 9 і 14 добу загоєння відповідно в порівнянні з контролем (рис. 3). 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 у 2,1; 2,9 і 2,1 рази ( $p \leq 0,0001$ ) нижчим на 6, 9 і 14 добу відповідно, ніж у тварин з нелікованими ранами, та був менш підвищеним відносно контролю: у 3,1 і 2 рази ( $p \leq 0,0001$ ) на 3 і 6 добу загоєння відповідно, і вже на 9 добу повертався до контролю. Рівень мРНК зазначеного гена був на рівні контрольних значень у другій, третій та четвертій групах тварин при повному закритті рани.

При гнійно-некротичних ранах нами було виявлено більші значення експресії гена *Nfkb1* у порівнянні з повношаровими вирізаними ранами. Так, у групі тварин із ранами без лікування цей показник був вищим у 4, 4,5; 4,6 і 2,8 рази ( $p \leq 0,0001$ ) на 3, 6, 9 і 14 добу загоєння відповідно у порівнянні з контролем

(рис. 4). Рівні експресії зазначеного гена в другій та третій групі шурів достовірно не відрізнялися як і при попередній моделі пошкоджень шкіри.

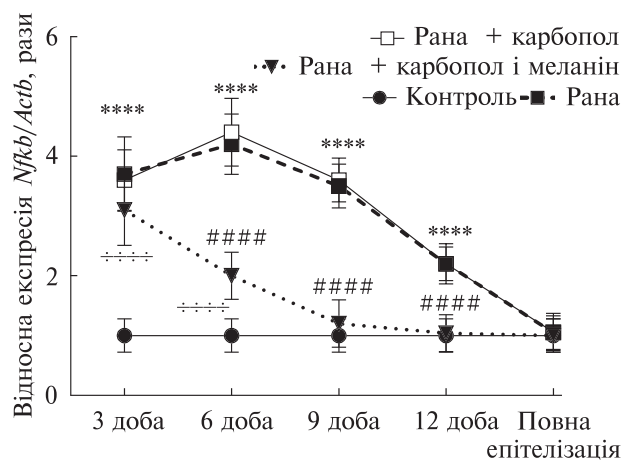
У тварин, яким на рани наносили меланін, цей показник був в 1,8 ( $p \leq 0,0001$ ) і 1,6 раза ( $p \leq 0,001$ ) нижчим на 9 і 14 добу відповідно, ніж у тварин другої групи, та виявився менш підвищеним відносно контролю: у 3,3; 3,8; 2,5 ( $p \leq 0,0001$ ) і 1,8 раза ( $p \leq 0,05$ ) на 3, 6, 9 і 14 добу загоєння відповідно. Рівень мРНК зазначеного гена був на рівні контрольних значень у другій, третій та четвертій групах тварин при повному закритті рани.

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

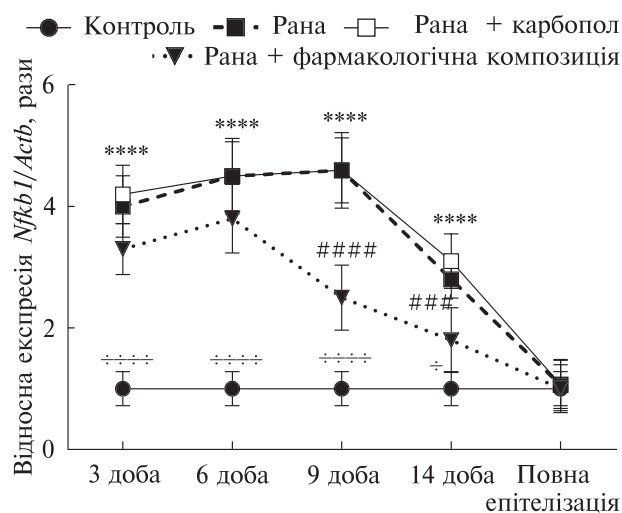
Проте в шурів, яким на рани наносили меланін, цей показник був в 1,9 ( $p \leq 0,0001$ ) і 2,6 раза ( $p \leq 0,0001$ ) вищим на 9 і 14 добу відповідно, ніж у тварин другої групи, та був менш зниженим відносно контролю: у 4,8; 3,4; 2 ( $p \leq 0,0001$ ) і 1,2 раза ( $p \leq 0,01$ ) на 3, 6, 9 і 14 добу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

Нами було виявлено потужніше зменшення рівня експресії цього гена при гнійно-некротичних ранах у порівнянні з повношаровими вирізаними ранами. Так, у групі тварин із ураженнями без лікування цей показник був нижчим у 6,5; 5,2; 4,5 і 3,6 раза ( $p \leq 0,0001$ ) на 3, 6, 9 і 14 добу загоєння відповідно в порівнянні з контролем (рис. 6). Рівні експресії цього гена у другій та третій групі шурів значуще не відрізнялися.

Однак у шурів, на рани яких наносили меланін, цей показник був в 1,5 ( $p \leq 0,05$ ) і 2,8 раза ( $p \leq 0,0001$ ) вищим на 9 і 14 добу відповідно, ніж у тварин другої групи, та менше знижувався відносно контролю: у 6,3; 5, 3 рази ( $p \leq 0,0001$ ) і майже 1,3 раза ( $p \leq 0,001$ ) на 3, 6, 9 і 14 добу загоєння відповідно. Рівень мРНК

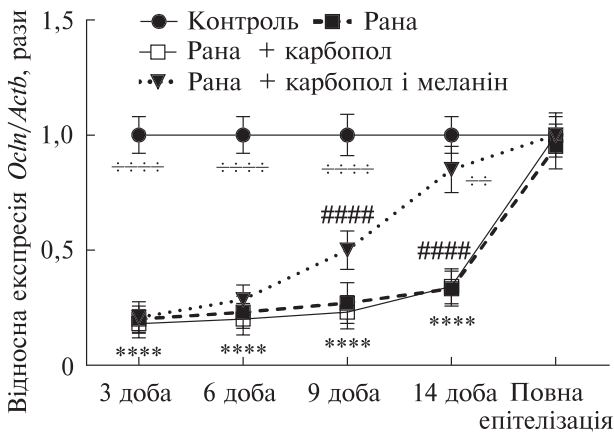


**Рис. 3.** Рівень експресії гена *Nfkb1* в динаміці загоєння різаних ран та при введенні меланіну. 1 – контроль; 2 – рана; 3 – рана + карбопол; 4 – рана + карбопол і меланін; \*\*\*\* –  $p \leq 0,0001$  рани відносно контролю; #### –  $p \leq 0,0001$  рани з нанесеним меланіном відносно тварин із ранами; ++++ –  $p \leq 0,0001$  рани з нанесеним меланіном порівняно з контролем

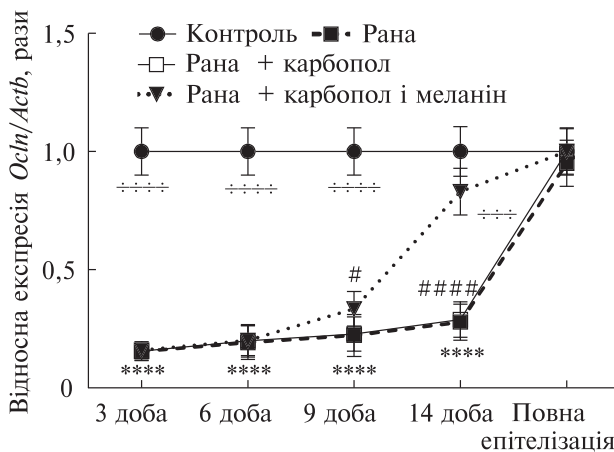


**Рис. 4.** Рівень експресії гена *Nfkb1* в динаміці загоєння гнійно-некротичних ран та при введенні меланіну. 1 – контроль; 2 – рана; 3 – рана + 0,5 % карбопол; 4 – рана + 0,1 % меланін, розчинений в 0,5 % карбополі; \*\*\*\* –  $p \leq 0,0001$  рани відносно контролю; #### –  $p \leq 0,0001$ , ### –  $p \leq 0,001$  рани з нанесеним меланіном відносно тварин із ранами; ++++ –  $p \leq 0,0001$ , ÷ –  $p \leq 0,05$  рани з нанесеним меланіном порівняно з контролем

зазначеного гена був на рівні контролю у другій, третій та четвертій групах тварин при повній епітелізації рани.



**Рис. 5.** Рівень експресії гена *Ocln* у динаміці загоєння різаних ран 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



**Рис. 6.** Рівень експресії гена *Ocln* у динаміці загоєння гнійно-некротичних ран та при введенні меланіну. 1 – контроль; 2 – рана; 3 – рана + карбопол; 4 – рана + карбопол і меланін; \*\*\*\* –  $p \leq 0,0001$  рани відносно контролю; #### –  $p \leq 0,0001$ , # –  $p \leq 0,05$  рани з нанесеним меланіном відносно тварин із ранами; +++++ –  $p \leq 0,0001$ , +++ –  $p \leq 0,001$  рани з нанесеним меланіном порівняно з контролем

**Обговорення.** У дослідженнях *in vitro* нокдаун CFTR викликав як дисфункцію епітеліального бар'єру, так і посилення вироблення запальних цитокінів, що також підтверджувалось на експериментальних моделях опікових уражень на мишах, мутантних за CFTR. Крім того, одер-

жані дані свідчили про те, що нокдаун CFTR активував ERKs (позаклітинні сигнал-регульовані кінази) та NF- $\kappa$ B. У той же час застосування інгібіторів ERKs або NF- $\kappa$ B, або їх комбінації, інгібувало вищезазначені негативні ефекти нокдауну CFTR при загоєнні ран (Liu et al, 2021).

Нами було показано зниження рівня експресії гена *Cftr* при загоєванні як повношарових вирізаних площинних ран, так і гнійно-некротичних ран шкіри щурів на тлі зростання рівня експресії гена *Nfkb1*. Крім цього, ми встановили зменшення рівня експресії гена *Ocln* за таких саме умов. Отримані нами дані збігаються з попередніми результатами та даними літератури, де продемонстровано зниження синтезу білків щільних контактів: ZO-1, оклюдину та E-кадгерину (і рівня експресії відповідних генів), а також порушення локалізації ZO-1 в облечених мишей (Costantini et al, 2009; Huet et al, 2020).

Відомо, що прозапальні медіатори, які виробляються епітелієм за певних патологічних станів, негативно регулюються CFTR, що, у свою чергу, спричиняє подальше пошкодження епітеліального бар'єру. TNF- $\alpha$  та IL-1 $\beta$  вважаються основними цитокінами, що індукуються незабаром після опікової травми. IL-8 є особливо сильним хемотаксичним фактором для нейтрофілів, адже внаслідок цього ініціюється гострий запальний каскад. Так, було показано, що після опікової травми залежна від часу зміна експресії CFTR супроводжувалась одночасною зміною експресії білків щільних контактів (De Lisle, 2014; Liu et al, 2021). Більш того, було виявлено, що роль CFTR у модуляції рівня експресії цих білків не залежила від його безпосередніх функцій як хлорного каналу (Liu et al, 2021).

Крім цього, на мишачих моделях повношарових поранень шкіри, які піддавали додатковому механічному перевантаженню задля утворення гіпертрофічних рубців, було виявлено, що дефіцит CFTR був здатний посилити утворення рубців і запальних реакцій тканин (Zhou et al, 2020). Було висунуто припущення, що дисфункція CFTR призводила до підвищеної реакції на запалення (за рахунок збільшення прозапальних та фіброгенних функцій фібробластів), погіршення загоєння ран та

ін-гібування деградації колагену (на фоні зниження вмісту колагену 3 типу – Col3 – та збільшення співвідношення Col1/Col3), що, нарешті, стимулювало утворення вищезазначених рубців (Dong et al, 2015; Zhou et al, 2020).

Однак чіткий механізм, який лежить в основі впливу *CFTR* на продукування фіброblastів і колагену, потребує подальшого дослідження. Давно відомо, що одним із ключових наслідків так званого стресу ендоплазматичного ретикулуму є активація програми відповіді на неправильно згорнуті білки UPR (unfolded protein response) Так, було продемонстровано, що стрес ендоплазматичного ретикулуму здатний сприяти проліферації фіброblastів та індукувати фіброз легенів (Hsu et al, 2017; Zhou et al, 2020). Також було показано, що гальмування розвитку стресу інгібітором сигнального шляху IRE1 $\alpha$  може зменшити фіброз печінки й шкіри у мишей (Heindryckx et al, 2016). Окрім цього, пригнічення функціонування *CFTR* було залучено до активації стресу ендоплазматичного ретикулуму (Yang et al, 2017). Ці вищезгадані дослідження свідчать про те, що стрес ендоплазматичного ретикулуму, зумовлений зниженням синтезу *CFTR*, може бути вирішальним чинником у процесі утворення гіпертрофічних рубців. Однак, на сьогодні, роль цього стресу у формуванні гіпертрофічних рубців потребує подальшого вивчення.

Отже, на основі отриманих результатів і літературних даних ми можемо припустити, що зниження рівня експресії генів *Cfr* та *Ocln* при загоюванні ран різної етіології може бути зумовлено зростанням рівня експресії гена *Nfkb1*. У той же час відновлення рівня експресії *Ocln* може бути опосередковано відновленням рівня експресії гена *Cfr* за рахунок зменшення рівня мРНК гена *Nfkb1*.

Раніше нами було встановлено, що відновлення цілісності шкіри після поранень різної етіології, без утворення гіпертрофічних рубців, відбувалося на початковій фазі регенерації шкіри саме при застосуванні меланіну (Dranitsina et al, 2017; Huet et al, 2020).

Як зазначено вище, меланін захищає організм від ультрафіолетового та рентгенівського опромінення, володіє радіопротекторною, цитопротекторною, антиоксидантною та протиза-

пальною дією (Golyshkin et al, 2015; Caldas et al, 2020; Cavallini et al, 2020). Більш того, він відрізняється своєю біосумісністю та біорозкладністю, а також здатністю до уловлювання й хелатування металів та електронною провідністю. Цей біоматеріал може діяти як наночасинки або в якості агента в різних біомедичних підходах, таких як візуалізація, контрольоване вивільнення ліків, біоінженерія та біоелектроніка, застосування антиоксидантів та тераностика (Caldas et al, 2020; Cavallini et al, 2020).

Продуцентом меланіну в нашому дослідженні, є дріжджеподібні гриби, які 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 та може бути сильнішим радіопротектором, антиоксидантом тощо в порівнянні з іншими меланінами (Golyshkin et al, 2015; Cavallini et al, 2020).

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 (Golyshkin et al, 2015; Cavallini et al, 2020); впливає на продукцію протизапальних цитокінів для зниження інтенсивності запалення та гіпертрофічного рубцювання при загоєнні поранень за рахунок, наприклад, пригнічення TGF- $\beta_1$ -сигнального шляху, який сприяє розвитку фіброзу (Dranitsina et al, 2017), та впливу на PPAR $\alpha$ -опосередкований шлях (рецептор  $\alpha$ , що активуються пероксисомними проліфераторами) (Cui et al, 2014; Stacey et al, 2016); а також через прямий вплив на кератиноцити (розміщення навколо ядер цих клітин), оскільки він стимулює поширення ендогенних електричних сигналів, які приваблюють регенеративні клітини господаря (Caldas et al, 2020). Таким чином, отримані нами результати можуть свід-

чити про доцільність застосування меланіну для лікування гнійно-запальних процесів при пораненнях шкіри.

**Висновки.** За допомогою молекулярно-генетичного аналізу було виявлено зниження рівня експресії генів *Cftr* та *Ocln* при загоєванні як повношарових вирізаних площинних ран, так і гнійно-некротичних ран шкіри шурів на тлі зростання рівня експресії гена *Nfkb1*. Відновлення рівня експресії *Ocln* може бути опосередковано зростанням рівня експресії гена *Cftr* за рахунок зменшення рівня мРНК гена *Nfkb1*. При застосуванні меланіну за тих самих умов експресія *Cftr* та *Ocln* швидше наближалася до відповідних значень контрольної групи шурів за відсутності гіперекспресії гена *Nfkb1*, 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 імені 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.

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

#### EXPRESSION OF *CFTR*, *NFKB1* AND *OCN* GENES DURING THE RESTORATION OF SKIN INTEGRITY

A. Huet, K. Dvorshchenko, 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 in the expression levels of *Cftr* and *Ocln* genes was shown while healing planar full-thickness excisional

wounds as well as purulonecrotic skin wounds in rats on the background of the increase in the expression level of *Nfkb1*. The restoration of *Ocln* gene expression might be mediated by the increase of *Cftr* gene expression caused by the decrease in *Nfkb1* mRNA level. When melanin was applied under these conditions, the values of *Cftr* and *Ocln* expression reached the corresponding values for the control group of rats faster without the *Nfkb1* hyperexpression during the recovery of skin integrity.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Alvim F, Addor S. (2017) Antioxidants in dermatology An Bras Dermatol 92(3):356–362. doi: 10.1590/abd1806-4841.20175697
- Caldas M, Cláudia Santos A, Veigaa F et al. (2020) Melanin nanoparticles as a promising tool for biomedical applications – a review Acta Biomaterialia 105:26–43. doi: 10.1016/j.actbio.2020.01.044
- Cavallini C, Vitiello G, Adinolfi B et al. (2020) Melanin and Melanin-Like Hybrid Materials in Regenerative Medicine Nanomaterials 10(8):1518. doi: 10.3390/nano10081518
- Chen J, Chen Y, Chen Y et al. (2016) Epidermal CFTR suppresses MAPK/NF-kappaB to promote cutaneous wound healing Cellular Physiology and Biochemistry 39(6):2262–2274. doi: 10.1159/000447919
- Chomczynski P, Sacchi N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidiniumthiocyanate-phenol-chloroform extraction Anal Biochem 162(1): 156–159. doi: 10.1006/abio.1987.9999
- Costantini T, Loomis W, Putnam J et al. (2009) Burn-induced gut barrier injury is attenuated by phosphodiesterase inhibition: effects on tight junction structural proteins. Shock 31:416–22. doi: 10.1097/SHK.0b013e3181863080
- Crites K, Morin G, Orlando V et al. (2015) CFTR knockdown induces proinflammatory changes in intestinal epithelial cells J Inflamm (Lond) 12:62. doi: 10.1186/s12950-015-0107-y
- Cui Y, Wang X, Xue J et al. (2014) Chrysanthemum morifolium extract attenuates high-fat milk-induced fatty liver through peroxisome proliferator-activated receptor alpha-mediated mechanism in mice Nutr Res 34:268–275. doi: 10.1016/j.nutres.2013.12.010
- De Lisle R. (2014) Disrupted tight junctions in the small intestine of cystic fibrosis mice Cell Tissue Res 355:131–142. doi: 10.1007/s00441-013-1734-3
- Dong J, Jiang X, Zhang X et al. (2015) Dynamically regulated CFTR expression and its functional role in cutaneous wound healing J Cell Physiol 230(9):2049–2058. doi: 10.1002/jcp.24931
- Dong Z, Chen J, Ruan Y et al. (2015) CFTR-regulated MAPK/NF-κB signaling in pulmonary inflammation



- in thermal inhalation injury *Sci Rep* 5:15946. doi: 10.1038/srep15946
- Dranitsina A, Taburets O, Dvorshchenko K et al. (2017) TGF $\beta$  1, PTGS 2 genes expression during dynamics of wound healing and with the treatment of melanin *Res J Pharm Biol Chem Sci* 8(1):2014–2023. doi: 10.3103/S0095452718030039
- Golyshkin D, Falaleeva T, Neporada K, Beregova T. (2015) Effect of melanin on the condition of gastric mucosa and reaction of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis under acute stress. *Physiol J* 61(2):65–72. doi: 10.15407/fz61.02.065
- Heindryckx F, Binet F, Ponticos M et al. (2016) Endoplasmic reticulum stress enhances fibrosis through IRE 1 $\alpha$ -mediated degradation of miR-150 and XBP-1 splicing. *EMBO Molecular Medicine*. 8(7):729–744. doi: 10.15252/emmm.201505925
- Hsu H, Liu C, Lin J et al. (2017) Involvement of ER stress, PI3K/AKT activation, and lung fibroblast proliferation in bleomycin-induced pulmonary fibrosis *Sci Rep* 7(1). doi: 10.1038/s41598-017-14612-5
- Huet A, Dvorshchenko K, Taburets O, Grebinyk D, Beregova T, Ostapchenko L. (2020) Tlr2 and Tjp1 Genes' Expression during Restoration of Skin Integrity *Cyt Genet* 54(6):539–545. doi: 10.3103/S0095452720060122
- Kanigur-Sultuybek G, Yenmis G, Soydas T. (2020) Functional variations of NFKB1 and NFKB1A in inflammatory disorders and their implication for therapeutic approaches *Asian Biomed (Res Rev News)* 14(2):47–57. doi: 10.1515/abm-2020-0008
- Lee H, Jang Y. (2018) Recent understandings of biology, prophylaxis and treatment strategies for hypertrophic scars and keloids. *Inter J Mol Sci* 19(3). doi: 10.3390/ijms19030711
- Li W, Wang C, Peng X et al. (2018) CFTR inhibits the invasion and growth of esophageal cancer cells by inhibiting the expression of NF- $\kappa$ B *Cell Biol Int* 42(12):1680–1687. doi: 10.1002/cbin.11069
- Liu X, Chen Y, You B et al. (2021) Molecular mechanism mediating enteric bacterial translocation after severe burn: the role of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Burns & Trauma*. 9(tkaa042) doi: 10.1093/burnst/tkaa042
- Livak K, Schmittgen T. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) (2001) *Methods* 25(4): 402–408. doi: 10.1006/meth.2001.1262
- Orman M, Nguyen T, Ierapetritou M et al. (2011) Comparison of the cytokine and chemokine dynamics of the early inflammatory response in models of burn injury and infection *Cytokine* 55:362–371. doi: 10.1016/j.cyto.2011.05.010
- Sarrazy V, Billet F, Micallef L et al. (2011) Mechanisms of pathological scarring: role of myo-fibroblasts and current developments *Wound Repair and Regeneration* 19(Suppl 1):10–15. doi: 10.1111/j.1524-475X.2011.00708.x
- Stacey A, D'Mello N, Graeme J et al. (2016) Signaling Pathways in Melanogenesis 17(7):1144. doi: 10.3390/ijms17071144
- Yang A, Sun Y, Mao C et al. (2017) Folate protects hepatocytes of hyperhomocysteinemia mice from apoptosis via cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR)-activated endoplasmic reticulum stress. *J Cell Biochem* 118(9):2921–2932. doi: 10.1002/jcb.25946
- Zhou Y, Zhao Y, Du H et al. (2020) Downregulation of CFTR Is Involved in the Formation of Hypertrophic Scars *BioMed Res Inter*. doi: 10.1155/2020/9526289

Надійшла в редакцію 15.11.21  
Після доопрацювання 23.12.21  
Прийнята до друку 18.05.22