

**КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА  
МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ**

**КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА  
МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ**

Кваліфікаційна наукова  
праця правах рукопису

**ЧОРНЕНЬКА НАТАЛІЯ МИКОЛАЇВНА**

УДК: 616.329-001.37-053

**ДИСЕРТАЦІЯ  
ПРОЦЕСИ ЗАГОЄННЯ ЛУЖНОГО ОПІКУ СТРАВОХОДУ У ЩУРІВ  
ЗА УМОВ ВВЕДЕННЯ МЕЛАНІНУ**

03.00.04-біохімія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

\_\_\_\_\_ Чорненька Н.М.

Науковий керівник **Савчук Олексій Миколайович** д.б.н., професор.

Київ – 2018

## АНОТАЦІЯ

*Чорненька Н.М.* Процеси загоєння лужного опіку стравоходу у щурів за умов введення меланіну. - Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04-біохімія. –Київський національний університет імені Тараса Шевченка МОН України, Київ, 2018.

Опіки є однією з найпоширеніших причин дитячого травматизму. Щороку в Україні опіки отримують понад 12 тисяч дітей. Хімічні опіки стравоходу зазвичай отримують діти віком від 1 до 3 років, через доступність та різноманітність великої кількості хімічних речовин, які випадково можуть бути спожиті дитиною. На сьогодні важливим є питання щодо вивчення процесів загоєння після хімічних опіків стравоходу. Адже це зможе допомогти в розробці ефективного лікування а також попередити розвиток можливих ускладнень.

Дисертація присвячена дослідженню процесів загоєння за лужного опіку стравоходу (ЛОС) та за умов застосування меланіну. Для моделювання лужного опіку стравоходу було обрано натрію гідроксид (NaOH), так як лужні речовини є більш поширеними в побуті. Також при ураженні стравоходу лужними речовинами виникає колікваційний некроз, який спричиняє більш глибокі пошкодження тканин стравоходу, і тому є більш небезпечним ніж некроз при ураження кислотами.

На першому етапі наших досліджень ми провели визначення основних біохімічних показників в сироватці крові за умов ЛОС 2 та при застосуванні меланіну. Згідно отриманих нами результатів, було показано, що за ЛОС спостерігалось зниження концентрації загального білка та альбуміну, підвищення продуктів азотистого обміну сечовини та креатиніну, підвищення активності АСТ, АЛТ та лужної фосфатази, змінювались показники іонного

обміну. За введення меланіну спостерігалася нормалізація досліджуваних показників.

Для підтвердження ступеня опіку, а також для оцінки впливу меланіну на процеси загоєння після опіку стравоходу було проведено гістологічне дослідження. На 1 добу спостерігався набряк, ураження слизової, підслизової та м'язової оболонки стравоходу, також відзначена активна інфільтрація лейкоцитами уражених тканин стравоходу. На 7 добу після ЛОС 2 відзначено інфільтрацію лейкоцитами тканин стравоходу. За умов введення меланіну інфільтрація лейкоцитами була нижчою. На 15 добу за ЛОС 2 зафіксували зниження загальної лейкоцитарної інфільтрації, а за умов введення меланіну присутність лейкоцитів було повністю знівельована. На 21 добу досліджень, за ЛОС 2 було відзначено відновлення цілісності епітелію слизової оболонки, залишкову інфільтрацію лейкоцитами та збільшення шару підслизової оболонки, яке відбувається за рахунок патологічного розростання екстрацелюлярного матриксу, тобто варто зазначити, що повноцінної регенерації стравоходу не відбувалось. У групах з ЛОС 2 при застосуванні меланіну відбувалося майже повне відновлення уражених тканин з незначним розростанням сполучної тканини в підслизовій основі.

Оксидативний стрес є однією із причин ускладнень процесів загоєння за опіків. Проведені нами дослідження виявили та довели, що за ЛОС 2 відбувається підвищення вмісту продуктів перекисного окиснення (ТБК-активних продуктів, дієнових кон`югатів), знижувалась активність СОД та підвищувалась активність синтази оксиду азоту (індуцибельної та ендотеліальної), що може свідчити про надмірну продукцію активних форм кисню, на тлі зниженої активності СОД та пошкодження клітинних мембран. При застосуванні меланіну відбувалося зниження вмісту продуктів перекисного окиснення, а також підвищення активності СОД і зниження активності ендотеліальної та індуцибельної синтази оксиду азоту, що може вказувати на менше пошкодження клітинних мембран, а отже і швидші процеси загоєння.

За опіків відбувається активація імунної ланки, що характеризується в першу чергу змінами рівня прозапальних цитокінів. Було показано підвищення вмісту прозапальних цитокінів в сироватці крові та слизовій оболонці стравоходу за умов ЛОС 2, а також підвищення вмісту IgG в сироватці крові, що може свідчити про хронічний запальний процес при опіку стравоходу. Вміст протизапальних цитокінів знижувався за умов ЛОС 2. При застосуванні меланіну відбувалося зниження запального процесу: знижувався вміст прозапальних цитокінів в сироватці крові та слизовій оболонці стравоходу, IgG в сироватці крові та підвищувався вміст протизапальних цитокінів в сироватці крові та слизовій оболонці стравоходу, що характеризує процес загоєння. Зважаючи на вищезазначені результати з`являється певний інтерес в дослідженні потенційних змін білкового складу сироватки крові та протеолітичного потенціалу стравоходу та плазми крові за умов ЛОС 2, як факторів, що можуть впливати на процес загоєння опіків стравоходу.

При аналізі електрофореграми сироватки крові у щурів за умов ЛОС 2 та при застосуванні меланіну не виявлено якісних змін білкових фракцій, але були встановлені їх кількісні зміни. На електрофореграмі білкового складу сироватки крові в контрольних зразках та пробах, отриманих від тварин з ЛОС 2 та за введення меланіну, спостерігалися фракції від 15 до 168 кДа. Було показано, що за умов ЛОС 2 спостерігалося зростання вмісту фракцій з М.м 168 та 150 кДа, що може відповідати гамма-глобуліновій фракції на 7, 15 та 21 доби експерименту. При застосуванні меланіну відзначалося зниження вмісту фракцій з М.м. 168 та 150 кДа як порівняно з ЛОС 2. Фракція з М.м. 67кДа, що можливо відповідає альбуміновій фракції, за ЛОС 2 вміст якої знижувався на всі досліджувані доби, за введення меланіну відзначалося менш виражене зниження даної фракції порівняно з контролем. Зміни вмісту фракцій з М.м 55, 40,25 та 15 кДа мали різну динаміку як за умов ЛОС 2 так і при застосуванні меланіну.

При дослідженні протеолітичної ланки було показано, що за ЛОС 2 відбувається зростання протеолітичної активності, активності серинових протеїназ та матриксних металопротеїназ (ММП), висока активність яких на 15 добу може свідчити про активний процес відновлення ранової поверхні, тоді як високі показники на 21 добу свідчать про патологічний процес загоєння та перехід запального процесу в хронічну форму. Відмічено підвищення концентрації трипсиноподібних серинових протеаз в плазмі крові, аналізуючи склад яких було відмічено значну кількість низькомолекулярних похідних плазміну, що утворились внаслідок деградації схильного до автолізу плазміну, а також наявність нейтрофільної еластази. При застосуванні меланіну відзначалося зниження рівня утворення деградованих форм плазміну та нейтрофільної еластази в плазмі крові. Було досліджено активність інгібіторів протеолітичних ферментів  $\alpha 2$ -макроглобуліну (МГ) та  $\alpha 1$ -антитрипсину (АТ) в сироватці крові, виявлено, що за ЛОС 2 відбувається зростання активності досліджуваних інгібіторів. При застосуванні меланіну активність інгібіторів протеолітичних ферментів в сироватці крові знижувалась.

При застосуванні меланіну відбувалося зниження вмісту ММП та підвищення вмісту тканинного інгібітора матриксних металопротеїназ (ТІМП-1) та фактору росту фібробластів (ФРФ). При аналізі ензімограми слизової оболонки стравоходу після лужного опіку показана наявність фракцій, що можуть відповідати матриксним металопротеїназам 7 та 9. Показано, немалізуючий вплив меланіну на вміст молекул середніх мас та олігопептидів в сироватці крові та слизовій оболонці стравоходу за умов ЛОС 2. Встановлено, позитивний вплив меланіну щодо експресії генів прозапальних генів *Ptgs2* (простагландин-синтаза-2), *Tgfb1* (трансформуючий фактор росту бета-1) в крові та тканинах стравоходу за умов ЛОС 2.

Отримані у роботі результати можуть бути використані для пошуку нових біохімічних маркерів, які допоможуть у визначенні тяжкості стану хворого після отримання лужного опіку стравоходу. Робота містить експериментальне

обґрунтування застосування меланіну за лужного опіку стравоходу, що можна використати для розробки рекомендацій по застосуванню меланіну для лікування хімічних опіків стравоходу та корекції післяопікових ускладнень. Результати представленої роботи можуть бути використані в ході навчального процесу для студентів біологічних спеціальностей та студентів фармацевтичних та медичних навчальних закладів при розробці лекційних курсів з вивчення біохімічних аспектів патологічних станів.

Ключові слова: хімічний опік, меланін, імунні процеси, протеоліз, загоєння.

## SUMMARY

*Chornenka N.M.* Processes of healing alkaline burn of the esophagus in rats under conditions of introduction of melanin. - Manuscripts.

A dissertation submitted to acquire the degree of Candidate of Science in Biology (PhD), specialty 03.00.04 – Biochemistry. – Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ministry of Education and Science of Ukraine, Kyiv, 2018.

Burns are one of the most common causes of childhood injuries. Every year in Ukraine, more than 12 thousand children receive wards. The chemical burns of the esophagus are usually given to children aged 1 to 3 years, due to the availability and variety of a large number of chemicals that can accidentally be consumed by the child. The issue of studying the processes of healing after chemical esophageal burns is important today. After all, it can help in the development of effective treatment and also prevent the development of possible complications.

The dissertation is devoted to research of healing processes under alkaline burn of the esophagus (ABE) and under conditions of application of melanin. For simulation of alkaline burn of the esophagus, sodium hydroxide (NaOH) was chosen, since alkaline substances are more common in everyday life. Also, in case of damage to the esophagus, alkaline substances cause colic necrosis, which causes more

profound damage to the esophagus tissues, and therefore is more dangerous than necrosis with acid damage.

In the first phase of our research, we conducted the determination of basic biochemical parameters in blood serum under the conditions of ABE and in the application of melanin. According to our results, it has been shown that in the ABE there was a decrease in the concentration of total protein and albumin, increased nitrous exchange of urea and creatinine, increased activity of AST, ALT and alkaline phosphatase, and ion exchange rates changed. The introduction of melanin showed a normalization of the studied parameters under conditions of ABE.

Histological examination was carried out to confirm the degree of burn and also to assess the effect of melanin on healing processes after burning the esophagus. At day 1 there was swelling, lesions of the mucous membrane of the esophagus and infiltration with leukocytes. At day 7 after ABE 2, leukocyte infiltration was observed. Under conditions of melanin infusion, leukocyte infiltration was lower. At day 15 with ABE 2 there was a decrease in total leukocyte infiltration, and in the case of melanin administration, the presence of leukocytes was completely eliminated. On the 21st day of research, for ABE 2, the restoration of the integrity of the epithelium of the mucosa, residual infiltration of the leukocytes and an increase in the layer of the submucosal membrane, which is due to the pathological expansion of the extracellular matrix, was noted, that is, it was worth noting that complete regeneration of the esophagus was not occurring. In groups of ABE 2, when melanin was used, almost complete recovery of affected tissues with a small expansion of connective tissue in the submucosal region occurred.

Oxidative stress is one of the causes of the complications of healing in burns. The studies conducted by us have revealed and proved that the content of peroxidation products (TBA-active substances, diene conjugates) was increased in ABE, SOD activity decreased and nitric oxide synthase (inducible and endothelial) activity increased, which may indicate excessive production of active forms of oxygen, against the background of decreased activity of SOD and damage to cell

membranes. In the application of melanin, there was a decrease in the content of peroxide oxidation products, as well as increased activity of SOD and decreased activity of endothelial and inducible nitric oxide synthase, which may indicate less damage to cell membranes and hence faster healing processes.

In case of burns, activation of the immune system occurs, which is characterized primarily by changes in the level of inflammatory cytokines. It was shown that the increase in the content of proinflammatory cytokines under conditions of ABE 2, as well as IgG, which high rates may indicate a chronic inflammatory process with burning of the esophagus. The content of anti-inflammatory cytokines decreased under conditions of ABE 2. When melanin was used, the inflammatory process decreased, the content of proinflammatory cytokines and IgG decreased and the content of anti-inflammatory cytokines was increased, which characterizes the healing process. Taking into account the above-mentioned results, there is a certain interest in the study of potential changes in the serum protein content and the proteolytic potential of the esophagus and blood plasma as factors that can correct the process of healing of esophageal burns.

In the analysis of blood electrophoregrams in rats under conditions of ABE 2 and in the use of melanin, no qualitative changes in protein fractions were detected, but their quantitative changes were established. Fractions of 15 to 168 kDa were observed on the electrophoregram of the protein composition of blood serum in control specimens and samples obtained from animals with ABE 2 and when melanin was administered. It has been shown that under the conditions of ABE 2 there was a progressive increase in fractions with mp 168 and 150 kDa for all days of the experiment. In the application of melanin there was a decrease in the content of fractions with m. 168 and 150 kDa compared to the ABE 2, respectively, and compared with the control values. Faction with m. 67kDa, which probably corresponds to albumin in ABE 2, the content of which decreased for all studied days, when melanin was administered, there was a less pronounced reduction of this fraction compared with

control. Changes in the content of fractions with mM 55, 40, 25 and 15 kDa had different dynamics both under the conditions of ABE 2 and in the application of melanin.

During the study of the proteolytic chain, it was shown that when ABE 2 increases the proteolytic activity, the activity of serine and matrix metalloproteins, the high activity of which at 15 days can indicate an active process of restoration of the wound surface, while high 21-day indications indicate a pathological healing process and the transition of the inflammatory process to a chronic form. Increased concentrations of trypsin-like enzymes were noted, analyzing the composition of which a significant number of low molecular weight derivatives of plasmin, formed as a result of degradation of plasmin-prone autology, as well as the presence of neutrophil elastase, were noted. In the application of melanin, there was a decrease in the formation of degraded forms of plasmin and neutrophilic elastase. The activity of inhibitors of  $\alpha$ 2-MG and  $\alpha$ 1-AT proteolytic enzymes was investigated, and the activity of the inhibitors studied was increased when ABE 2 was observed. In the application of melanin, the activity of inhibitors of proteolytic enzymes was reduced.

In the application of melanin, there was a decrease in the content of MMPs and an increase in the content of TIMP-1 and the growth factor of fibroblasts. In the analysis of the enzymogram of the esophagus mucosa after alkaline burn, the presence of matrix metalloproteinases (7 and 9) is demonstrated, and the positive effect of melanin on the normalization of these indicators is established. It was shown that normalizing melanin flow to the level of the molecules of medium masses and oligopeptides under ABE conditions. It was established that the positive effect of melanin on the expression of pro-inflammatory genes of *Ptgs2* (prostaglandin-synthase-2), *Tgfb1* (transforming growth factor beta-1) under alkaline esophageal burns.

The results obtained in the work can be used to find new biochemical markers that will help in determining the severity of the patient's condition after receiving the alkaline esophagopathic burn. The work contains an experimental justification for the use of melanin in alkaline esophageal burn and can be used to develop

recommendations for the use of melanin for the treatment of chemical burns of the esophagus and correction of post-mortem complications. The results of the presented work can be used during the educational process for students of biological specialties and students of pharmaceutical and medical educational institutions in the development of lecture courses on the study of biochemical aspects of pathological conditions.

Key words: chemical burn, melanin, immune processes, proteolytic, healing process

## СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

### Статті у наукових фахових виданнях

1. **Chornenka NM, Raetska YA. B, Savchuk OM, Torgalo EO, Beregova TV, and Ostapchenko LI.** Correction Parameters of Endogenous Intoxication in Experimental Burn Disease at the Stage of Toxemia. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. 2016; 7(5): 1042-1047. (Особистий внесок здобувача – виконання частини експериментальних досліджень (визначення вмісту цитокінів), аналіз результатів).
2. **Chornenka NM, Raetska YA. B, Savchuk OM, Kompanets IV, Beregova TV, and Ostapchenko LI.** Effect of different doses of melanin in the blood protein changes in rats under alkaline esophageal burns. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences RJPBCS*. 2017; 8(1): 261-270. (Особистий внесок здобувача – проведення частини експериментальних досліджень (аналіз білкових фракцій сироватки крові), інтерпретація результатів та написання статті).
3. **Чорненька Н., Раецька Я., Савчук О., Остапченко Л.** Біохімічні зміни в сироватці крові щурів за умов експериментальної опікової хвороби та їх корекція меланіном Проблеми регуляції фізіологічних функцій. 2016; 2(21): 44-49. (Особистий внесок здобувача – виконання частини експериментальних досліджень (визначення біохімічних показників), аналіз результатів та написання статті).

4. **Chornenka N., Valetska K., Rayetska Ya., Ostapchenko L.** Correction of melanin proteolytic activity in the conditions of modeling alkali burns of the esophagus . Taras Shevchenko National University of Kyiv. Series: Problems of Physiological Functions Regulation. 2017; 1(22): 51-58. (Особистий внесок здобувача – проведення частини експериментальних досліджень (визначення протеолітичної активності), інтерпретація результатів та написання статті).

5. **Chornenka NM., Raetska Ya. B., Koval TV, Savchuk OM, Beregova TV, Ostapchenko LI.** Cytokine profile indicators in rat blood serum in a model of esophagus burn induced by antioxidant chemical preparation. Biomed Res Ther. 2017; 4(9): 1591-1606 (Особистий внесок здобувача – проведення частини експериментальних досліджень (визначення вмісту прозапальних цитокінів), інтерпретація результатів).

#### **Тези наукових доповідей**

1. **Чорненька Н.М., Іщук Т.В., Раєцька Я. Б** Корекція показників ендогенної інтоксикації при експериментальній опіковій хворобі в стадії токсемії X Міжнародна конференція молодих науковців «Біологія: Від молекули до біосфери» 2-4 грудня 2015р с. 21

2. **Чорненька Н.М., Мунько О.А., Раєцька Я. Б** Рівень цитокінів при опіку стравоходу першого ступеня у щурів за умов введення препарату меланін Конференція студентів та молодих науковців «Шевченківська Весна» 6-8 квітня 2016р м. Київ с.138

3. **Чорненька Н.М., Пятківська Н., Іщук Т.В., Раєцька Я.Б** Корекція показників ендогенної інтоксикації при моделюванні лужного опіку стравоходу і ступеня у статевонезрілих щурів XII міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології» Збірник тез, 16-19 квітня 2016 року, м.Львів с.50

4. **Чорненька Н.М., Дмитрик. В.В., Раєцька Я.Б** Вплив антиоксидантного препарату на метаболічні процеси при моделюванні опіку

стравоходу у щурів XI Міжнародної конференції молодих учених Харків; 29 листопада – 2 грудня 2016 с. 9

5. **Chornenka NM, Raetska YA. B, Savchuk OM** Dynamics Change of Proteolytic Activity under Experimental Burns of the Esophagus and Correction of Melanin PHOENIX 2017, the second edition of our International Medical Students' Conference 22-26 March, 2017, p. 192

6. **Chornenka NM, Raetska YA. B** Correction of infectious-inflammatory process in experimental burn disease of stage septic toxemia 2nd Prague European Days of Internal Medicine December 1–2, 2016 Prague p. 32

7. **Чорненька Н.М., Савчук О.М** Порушення протеолітичних процесів при моделюванні лужного опіку стравоходу та їх корекція меланіном IV Міжнародний медико-фармацевтичний конгрес студентів і молодих учених «Інновації та перспективи сучасної медицини», ВІМСО 2017 Чернівці с. 59

8. **Чорненька Н.М., Раєцька Я.Б Савчук О.М** Рівень матриксних металопротеїназ у сироватці крові щурів за лужного опіку стравоходу за умов введення меланіну XIII Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів молодь і поступ біології Львів, 25 – 27 квітня 2017 с. 59

9. **Чорненька Н.М, П'ятківська Н.В, Раєцька Я.Б** Показники азотистого обміну за лужного опіку стравоходу за умов введення меланіну Сучасні проблеми біології, екології та хімії V Міжнародна науково-практична конференція, ЗНУ 26-28 квітня 2017 р., Запоріжжя, с. 173

10. **Чорненька Н.М., Мунько О.М, Раєцька Я.Б** Вплив меланіну на рівень цитокінів у сироватці крові щурів за опіку стравоходу першого ступеня XIII Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів молодь і поступ біології Львів, 25 – 27 квітня 2017 Київ с. 40

11. **Chornenka NM, Raetska YA. B, Savchuk OM** Activity of trypsin-like enzymes at alkaline burn of the esophagus and in the application of melanin 14th Horizons in molecular biology Max Planck Institute for Biophysical Chemistry in Göttingen, Germany 11-14 September 2017

12. **Chornenka NM, Raetska YA. B, Savchuk OM** The proteolytic system disbalance under chemical burn of the esophagus in use of melanin 25th International Student Congress Of (bio)Medical Sciences 4-8 June 2018, Netherlands, p. 244

## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	17
ВСТУП.....	19
РОЗДІЛ 1	
ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	25
1.1. Загальні відомості про хімічні опіки стравоходу.....	25
1.2. Закономірності молекулярно-біохімічних процесів загоєння опікових ран.....	27
1.3. Потенційні методи лікування при хімічних опіках стравоходу.....	34
РОЗДІЛ 2	
МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	40
2.1. Реактиви та матеріали.....	40
2.2. Обладнання.....	40
2.3. Дотримання положень про гуманне відношення до тварин.....	41
2.4. Умови проведення експерименту.....	42
2.5. Отримання сироватки крові щурів.....	43
2.6. Отримання плазми крові щурів.....	43
2.7. Отримання слизової оболонки стравоходу щурів.....	43
2.8. Визначення концентрації білка за методом Бредфорд.....	44
2.9. Визначення біохімічних параметрів сироватки крові.....	44
2.10. Гістологічний аналіз зрізів стравоходу щурів.....	44
2.11. Визначення вмісту дієнових кон'югатів.....	46
2.12. Визначення вмісту ТБК-активних продуктів.....	47
2.13. Визначення супероксиддисмутазної активності.....	47
2.14. Визначення каталазної активності.....	48
2.15. Визначення активності синтази оксиду азоту (NOS).....	49

2.16. Електрофорез у поліакриламідному гелі за присутності ДСН.....	50
2.17. Ензим-електрофорез.....	51
2.18. Хроматографія для виділення трипсино-подібних серинових протеїназ.....	51
2.19. Визначення загальної протеолітичної активності, активності матриксних металопротеїназ та серинових протеїназ.....	51
2.20. Визначення активності $\alpha 1$ -антитрипсину та $\alpha 2$ -макроглобуліну....	53
2.21. Визначення вмісту молекул середньої молекулярної маси та олігопептидів.....	54
2.22. Визначення вмісту цитокінів, матриксних металопротеїназ, імуноглобулінів класу G (IgG), тканинного інгібітора матриксних металопротеїназ та фактору росту фібробластів у сироватці крові та слизовій оболонці стравоходу.....	55
2.23. Кількісна ЗТ-ПЛР.....	56
2.23.1. Виділення сумарної РНК з крові та тканин стравоходу щурів.....	56
2.23.2. Оцінка рівня експресії генів.....	57
2.24. Статистична обробка отриманих результатів.....	58
РОЗДІЛ 3.	
РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ.....	59
3.1. Характеристика біохімічних показників та показників антиоксидантної системи за умов лужного опіку стравоходу та за введення меланіну.....	59
3.2. Імунологічні показники за умов лужного опіку стравоходу та за введення меланіну.....	79
3.3. Рівень експресії мРНК генів Ptgs2 та Tgfb1 у крові та тканинах стравоходу за умов лужного опіку стравоходу та за введення меланіну.....	88

3.4. Білковий склад сироватки крові за умов лужного опіку стравоходу та за введення меланіну .....	90
3.5 Показники системи протеолізу за умов лужного опіку стравоходу та за введення меланіну.....	95
РОЗДІЛ 4.	
УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	120
ВИСНОВКИ.....	129
ЛІТЕРАТУРА.....	131
ДОДАТОК.....	153

**ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ**

АСТ – аспаратамінотрансфераза;  
АЛТ – аланінамінотрансфераза;  
АОС — антиоксидантна система  
ДК — дієнові кон'югати  
ШКТ– шлунково-кишковий тракт  
ЛОС– лужний опік стравоходу;  
ХОС – хімічний опік стравоходу;  
КАТ – каталаза  
СОД – супероксид дисмутаза  
ПОЛ — перекисне окиснення ліпідів;  
ТБК — тіобарбітурова кислота;  
ДК – дієнові кон'югати  
iNOS – індукцйбельна синтаза оксиду азоту;  
eNOS – ендотеліальна синтаза оксиду азоту;  
nNOS – нейрональна синтаза оксиду азоту;  
NO — монооксид азоту;  
ДОФА – дигідроксифенілаланін;  
ПЛР - полімеразана ланцюгова реакція;  
ММП – матрикснаметалопротеїназа;  
ТІМП – танинні інгібітори металопротеїназ;  
ПААГ – поліакриламід;  
ДСН – додецилсульфатнатрію;  
 $\alpha_2$ -МГ – макроглобулін;  
 $\alpha_1$ -АТ– антитрипсин;  
ЕЦМ – екстрацелюлярний матрикс;  
ФМСФ – фенілметил сульфоніл флуорид;  
ЕДТА – етилендіамінтетраацетат;

МСК– мезенхімальні стовбурові клітини;  
МСМ – молекули середньої маси;  
ОП – олігопептиди;  
IgG– імуноглобуліни класу G;  
БАЕЕ – N-бензоїл-L-аргінін- етиловий ефір;  
НСТ – нітросиній тетразаолій;  
НАДН – нікотинамідаденіндинуклеотид;  
ФМС – феназинметасульфат;  
ФРФ – фактор росту фібробластів;  
ІЛ – інтерлейкін;  
ІФ- $\gamma$  – інтерферон- $\gamma$   
EGF – епідермальний фактор росту;  
ФНП- $\alpha$  – фактор некрозу пухлин;  
БСА – бичачий сироватковий альбумін;  
Ptgs2 - prostaglandin-endoperoxide synthase 2;  
Tgf- $\beta_1$  — transforming growth factor beta 1

## ВСТУП

**Актуальність теми.** Щороку в Україні опіки отримують понад 12 тисяч дітей, найбільш постраждала група – це діти віком від 1-го до 5-ти років. Число постраждалих дітей продовжує неухильно зростати в зв'язку з доступністю та різноманітністю великої кількості хімічних речовин, які випадково можуть бути спожиті дитиною [1,2]. Уникнути розвитку ускладнень дозволяє комплексний підхід в лікуванні, своєчасна та повноцінна терапія в гострому періоді хвороби, планомірний контроль перебігу захворювання в динаміці [3,4]. Важливим є визначення точного ступеня ураження стравоходу, інколи це зробити складно на основі результатів проведених ендоскопічних досліджень. Звідси пошук біомаркерів, які утворюються на різних стадіях опіків, використання факторів росту, інгібіторів та активаторів ензимів, сприяють глибшому розумінню механізмів загоєння ран [5,6,7].

У дітей після хімічного опіку стравоходу ускладнення можуть виникнути навіть за умов першого ступеня опіку. Саме незрілість тканин та недосконалість захисних реакцій в ранньому віці у дітей є головними причинами патологічних післяопікових розладів та тривалого відновлення структури тканин. [8,9]. Хімічні опіки супроводжуються запальною реакцією, розвитком синдрому ендогенної інтоксикації та порушенням функціонування про/антиоксидантної системи. Внаслідок цих процесів відбувається порушення репаративних механізмів в тканинах стравоходу та перехід процесу загоєння в хронічну форму, з формуванням надлишкової грануляційної тканини, часто з розвитком надмірного фіброзу, що призводить до рубцевої контрактури і втрати повноцінних функцій органу [2, 10]. Основною метою за 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.

У зв'язку з цим, необхідно проводити розробку нових лікарських речовин з комплексними властивостями для швидшого загоєння опікової рани та попередження їх ускладнень. На сьогодні досліджується використання гелів [11], що містять природні глікозаміноглікани, хітин, які запобігають розвитку опікової травми [12], мають антимікробні властивості [13] сприяють проліферації фібробластів та ангиогенезу. Також дієвим є включення факторів росту фібробластів у гель [14] та застосування стовбурових клітин [15] для більш швидкого відновлення уражених тканин. Перспективним є використання природних нетоксичних антиоксидантів у якості цитопротекторів [16]. Лікарські рослини, багаті фенольними сполуками потенційно можуть впливати на прискорення загоєння опікових ран і захищати рану від бактеріальних інфекцій [17, 18]. Аналіз сучасної літератури дозволяє стверджувати, що можливими перспективними засобами нормалізації процесу загоєння за хімічних опіків стравоходу є речовини природного походження на основі поліфенольних сполук. Однією з таких речовин є меланін продуцентом якого є дріжджоподібні гриби *Nadsoniella nigra* штам X1, що висіяні із зразків вертикальних скель о. Галіндез. У літературі є лише поодинокі згадки про вплив меланіну з цієї сировини на процеси загоєння за умов зовнішніх опіків [19]. Дослідження впливу меланіну на інші патології показали, що він має антиоксидантні, цитопротекторні та стреспротекторні властивості [20, 21]. Таким чином, ми припустили, що меланін міг мати позитивний вплив на процеси загоєння за хімічного опіку стравоходу та поєднувати в собі універсальні властивості попереджуючи розвиток післяопікових ускладнень.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційна робота виконана на кафедрі біохімії ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка у рамках науково-дослідної теми «Механізми регуляції метаболічних процесів в

організмі за умов розвитку патологічних станів» (№ д/р 0116U002527, 2016-2018 рр.)

**Мета і задачі дослідження.** Метою даної роботи було дослідити процеси загоєння за експериментального лужного опіку стравоходу у щурів за введення меланіну.

Для досягнення мети були поставлені наступні завдання:

1. Визначити біохімічні та цитологічні зміни у сироватці крові та тканинах стравоходу щурів за лужного опіку стравоходу та за введення меланіну
2. Охарактеризувати стан антиоксидантної системи у сироватці крові та слизовій оболонці стравоходу щурів за лужного опіку стравоходу та за введення меланіну
3. Оцінити стан імунологічної ланки у сироватці крові та слизовій оболонці стравоходу за лужного опіку стравоходу та за введення меланіну
4. Дослідити рівень експресії генів, які характеризують процес запалення та загоєння за лужного опіку стравоходу та за введення меланіну
5. Проаналізувати стан системи протеолізу у сироватці крові та у слизовій оболонці стравоходу за лужного опіку стравоходу та за введення меланіну

*Об'єкт дослідження:* процеси загоєння за умов лужного опіку та за введення меланіну.

*Предмет дослідження:* молекулярно-біохімічні параметри крові та слизової оболонки стравоходу за лужного опіку стравоходу за умов введення меланіну

**Методи дослідження:** хроматографічні (отримання фракції трипсिनоподібних серинових протеїназ), електрофоретичні (аналіз білкових фракцій сироватки крові, якісного складу трипсिनоподібних серинових протеїназ), полімеразна ланцюгова реакція (оцінка рівня експресії генів *Ptgs2* та *Tgfb1*), імуноферментний аналіз (вміст інтерлейкінів та матриксних металопротеїназ), гістологічні, спектрофотометричні (вміст дієнових кон'югатів, загальна протеолітична активність) та статистичні методи.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Доповнено наукові дані про молекулярно-біохімічні процеси загоєння за умов лужного опіку стравоходу другого ступеня (ЛОС 2) у щурів у динаміці. Вперше встановлено, що меланін за умов лужного опіку стравоходу запобігає розвитку оксидативного стресу та нормалізує активність антиоксидантних ферментів. Меланін виявляє також нормалізуючу дію на перебіг імунних процесів, дисбаланс яких є невід’ємною патогенетичною ланкою запального процесу за умов опіку. Відповідно до аналізу основних біохімічних показників сироватки крові, виявлено позитивний вплив меланіну на метаболічні функції печінки та нирок щурів за умов ЛОС 2. Показано позитивний вплив меланіну на вміст IgG за умов опіку. Встановлено, позитивний вплив меланіну щодо експресії прозапальних генів циклооксигенази (*Ptgs2*) і трансформуючого фактору росту бета (*Tgfb1*) за умов ЛОС 2. Вперше показано, що меланін впливає на зниження рівня молекул середніх мас та вміст білкових фракцій у сироватці крові за умов ЛОС 2. Вперше проведено аналіз ензимограми якісного складу трипсино-подібних серинових протеїназ плазми крові за умов лужного опіку стравоходу та за умов введення меланіну. При аналізі ензимограми слизової оболонки стравоходу за ЛОС 2 показана наявність фракцій, що можуть відповідати матриксним металопротеїназам 7 та 9.

**Практичне значення одержаних результатів.** Робота містить експериментальне обґрунтування застосування меланіну за лужного опіку стравоходу та може бути використано для розробки рекомендацій по застосуванню меланіну для лікування хімічних опіків стравоходу та корекції після опікових ускладнень. Отримані у роботі результати можуть бути використані для пошуку нових біохімічних маркерів, які допоможуть у визначенні тяжкості стану хворого після отримання лужного опіку стравоходу. Результати представленої роботи можуть бути впроваджені у навчальний процес для студентів біологічних та медичних спеціальностей при розробці лекційних курсів з вивчення біохімічних аспектів патологічних станів.

**Особистий внесок здобувача.** Проведення експериментів та теоретичне обґрунтування первинних результатів досліджень та формулювання висновків виконано дисертантом особисто. Автором самостійно проведено підбір та аналіз наукової літератури за темою дисертації, статистичну обробку результатів експериментів, підготовку статей до друку. Вибір теми дисертаційної роботи, постановка мети, планування напрямків досліджень та підбір методичних підходів, узагальнення результатів і редагування тексту дисертаційної роботи проведено спільно з науковим керівником.

**Апробація результатів дисертації.** Основні результати дисертаційної роботи доповідалися та обговорювалися на X Міжнародній конференції молодих науковців «Біологія: Від молекули до біосфери» (Харків, 2015), Шевченківська весна: конференція студентів, аспірантів та молодих вчених (Київ, 2016), XI Міжнародній конференції молодих учених «Біологія: від молекули до біосфери» (Харків, 2016), XII міжнародній науковій конференції студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів, 2016), 2nd Prague European Days of Internal Medicine (Prague, 2016), IV Міжнародному медико-фармацевтичному конгресі студентів і молодих учених «Інновації та перспективи сучасної медицини» (Чернівці, 2017), XIII Міжнародній науковій конференції "Молодь і поступ біології" (Львів, 2017), Шевченківській весні: конференції студентів, аспірантів та молодих вчених (Київ, 2017), PHOENIX, International Medical Students' Conference (India, 2017), V Міжнародній науково-практичній конференції, ЗНУ (Запоріжжя, 2017), 14th Horizons in molecular biology Max Planck Institute for Biophysical Chemistry (Germany, 2017), 25th International Student Congress Of (bio)Medical Sciences (Netherlands, 2018)

**Публікації.** За темою дисертації опубліковано 17 наукових праць, серед них 5 статей у фахових періодичних виданнях, затверджених переліком МОН України (3 публікації у виданнях, що включені до міжнародних наукометричних баз даних), а також 12 тез доповідей у матеріалах наукових конференцій та з'їздів.

**Структура та обсяг дисертації.** Дисертаційна робота складається зі вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень, результатів власних досліджень з їх обговоренням, узагальнення, висновків, списку використаних літературних джерел (221 посилань). Дисертаційна робота викладена на 156 сторінках (з яких 110 сторінок основної частини) містить 23 рисунки та 14 таблиць.

## РОЗДІЛ 1

### ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

#### **1.1 Загальні відомості про хімічні опіки стравоходу. Класифікація хімічних опіків.**

Опіки є одними з найпоширеніших та руйнівних форм різноманітних травм. Відсоток виживання пацієнтів, що мають опіки, значно покращився в останні кілька десятиліть завдяки прогресу в сучасній медичній допомозі та розвитку спеціалізованих опікових відділів. Смертність від опікової травми була зменшена вдвічі впродовж останніх 40 років [22].

Однак і на сьогодні, за даними статистики, опіки займають перше місце серед причин дитячого травматизму у світі. Щороку понад 12 тисяч дітей в Україні отримують опіки. Найбільш постраждала група – діти від 1-го до 6-ти років. Причини опіків – переважно побутові. Наприклад, за весь 2015 рік серед 25370 термічних чи хімічних травмувань 24426 – побутові. Максимальне число уражень стравоходу хімічними речовинами (від 77% до 85%) відповідає віку від 1 року до 3 років, в інших випадках це зазвичай підлітковий період [23]. Виникають опіки стравоходу внаслідок випадкового або навмисного вживання їдких хімічних речовин. Незважаючи на існуючі методи лікування, кількість після опікових ускладнень стравоходу досягає 30%. Тяжкість отриманої хімічної травми залежить від характеру діючої речовини, від часу впливу реагенту, від кількості їдкої речовини, від своєчасності, правильності і повноти надання медичної допомоги потерпілому на момент надходження в лікарню. Постановка діагнозу хімічного опіку стравоходу у дітей базується на даних анамнезу; наявності слідів недавніх опіків і хімічних реагентів на губах, слизових оболонках рота, глотки. Основним методом, який дозволяє підтвердити або спростувати наявність хімічного ураження стравоходу, а також визначити ступінь пошкодження стравоходу, є первинне ендоскопічне дослідження.

Базуючись на результатах ендоскопічних досліджень розрізняють наступні ступені опіку стравоходу: I - гіперемія і набряк слизової оболонки; II - ураження слизової оболонки і підслизової основи; III - поразка всіх оболонок стравоходу [24]. Однак визначити точний ступінь ураження стравоходу, навіть на основі результатів проведених ендоскопічних досліджень, іноді буває складно. Для встановлення точного ступеня ураження потрібні повторні ендоскопічні обстеження та ретельне спостереження в динаміці лікування.

Ускладнення хімічного опіку залежно від терміну виникнення діляться на ранні (перфорація стравоходу, ерозії верхніх відділів шлунково-кишкового тракту, внутрішньо судинний гемоліз, аспіраційна пневмонія, сепсис) та пізні (рубцевий стеноз стравоходу, нервово-психічні розлади). Уникнути розвитку ускладнень дозволяє комплексний підхід в лікуванні, а саме: своєчасна та повноцінна терапія за гострого періоду хвороби, планомірний контроль перебігу захворювання в динаміці [25].

Ряд досліджень зосереджені на пошуку біомаркерів, які утворюються на різних стадіях опіків, а результати таких досліджень сприяють більш глибокому розумінню механізмів загоєння ран [5, 26-28]. Оцінка сироваткового профілю цитокінів є ефективним прогностичним інструментом при загоєнні ран. Не менш ефективним біомаркером може бути ексудат з опікової рани [28]. Показано, що ексудат рани містить підвищений рівень імуносупресивних і прозапальних цитокінів, таких як інтерлейкін-1 $\beta$ , інтерлейкін-2, інтерлейкіну-6, та фактор некрозу пухлини альфа [29]. Потрібно проведення більш детального дослідження, щоб визначити ряд біомаркерів, які можуть точно прогнозувати процесу загоєння рани і виявити потенційно нові області в схемах лікування опіків.

На сьогодні існує цілий ряд хімічних речовин, які можна знайти в кожному домі, вони є доступними для дітей, які можуть випадково випити або з'їсти хімічну речовину, при цьому відбувається розвиток каустичної травми, починаючи від лужних речовин з рН до 12 наприклад, гіпохлорит натрію

(чистячий засіб Доместос) та гідроксиду натрію (рідкі миючі засоби, чистячий засіб Крот, елементи живлення), до кислотних речовин з рН до 3 (наприклад, соляна кислота та саліцилова кислота, оцет), а також відбілювальні речовини (Білизна), в яких рН становить близько 7 [30]. Кислоти викликають коагуляційний некроз тканин з утворенням твердого струпа, який перешкоджає проникненню їдкої речовини в глибину тканин, що зменшує ймовірність потрапляння її в кров. На відміну від їдких лугів, кислотам притаманна більш слабка дія, що пояснюється швидким зниженням концентрації шляхом розведення у тканинній рідині. При ковтанні кислоти викликають сильний біль у гортані, тому вони зазвичай надходять у меншій кількості у шлунково-кишковий тракт (ШКТ), ніж лужні речовини, внаслідок чого зменшується частота утворення стриктури та/або перфорації стравоходу. Їдкі луги викликають колікваційний некроз, за умов якого, утворюється водорозчинний альбумінат, що переносить луг на здорові ділянки тканин, що супроводжується більш глибоким і поширеним ураженням тканин стравоходу [24].

Отже, при дії їдких хімічних речовин на тканини стравоходу відбувається процес незворотного ушкодження поверхневих і глибоких шарів самого стравоходу, а також ротової порожнини, гортані, дихальних органів та шлунку. Отримання опіку стравоходу у дитячому віці відбувається у більшості випадків при випадковому споживанні миючих або очищуючих засобів, елементів живлення, складовими яких є луговмісні речовини. Опік лугом є більш небезпечним ніж кислотний опік, так як, відбувається м'яка загибель тканин ШКТ внаслідок омилення жирів та порушення структури білків [24].

## **1.2 Закономірності молекулярно-біохімічних процесів загоєння опікових ран**

Опіки стравоходу у дітей є однією з найголовніших проблем сучасності, через доступність та різноманітність великої кількості хімічних речовин які випадково можуть бути спожиті дитиною, що у більшості випадків стосується

дітей віком до 6 років [31-34]. Більшість каустичних ушкоджень є поверхневими, які спонтанно загоюються. Але у дітей у зв'язку з незрілістю тканинних структур стравоходу можуть виникати ускладнення навіть за умов першого ступеня опіку стравоходу. До того ж опік стравоходу першого ступеня може не супроводжуватися больовими симптомами, але відсутність болю не виключає значних порушень тканинних структур стравоходу. Саме незрілість тканин та недосконалість захисних реакцій в ранньому віці у дітей є головними причинами патологічних післяопікових розладів та тривалого відновлення структури тканин. Якщо це опік другого або третього ступеня то у більшості випадків, розвиваються післяопікові ускладнення такі як патологічне загоєння та розвиток стриктур і стенозів, корекція яких можлива тільки шляхом хірургічного втручання[31, 32]. Труднощі у діагностиці ускладнень виникають у дітей, які не здатні адекватно оцінити стан та надати відомості про характер ушкоджуючого чинника. Важко робити висновок, чи проковтнула дитина хімічну речовину чи ні, бо за ізольованого опіку порожнини рота і за опіку стравоходу є ряд спільних симптомів. Тому діагностика опіків стравоходу повинна ґрунтуватися не тільки на симптомах. В клінічній медицині найчастіше відбувається механічне перенесення закономірностей перебігу опікової хвороби у дорослих в дитячу клініку, тому, щоб знайти нові ефективні методи лікування, потрібно знати яка різниця між механізмами загоєння опіків стравоходу у дітей та дорослих [33, 34].

Загоєння 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 у процесі загоєння рани: запалення, проліферація та реконструкція [35]. Стадія запалення передбачає вивільнення цитокінів і факторів росту, надходження нейтрофілів і макрофагів та створення початкового матричного каркасу [36]. Фаза проліферації характеризується ангиогенезом, синтезом колагену, реепітелізацією та скороченням рани. Ендотеліальні клітини

ініціюють ангиогенез, а фібробласти синтезують колаген та фібронектин, щоб утворити нову позаклітинну матрицю в ураженій тканині [37, 38]. Остання фаза – це матрична реконструкція, яка характеризується синтезом та осадженням колагену фібробластами та утворення нової відновленої тканини [39]. Комплексний процес загоєння ран регулюється мережею міжклітинної сигналізації, яка передбачає взаємодію численних цитокінів, хемокінів та факторів росту [40]. На всіх етапах загоєння відбуваються різноманітні взаємодії всередині складної мережі профібротичних та антифібротичних молекул, таких як фактори росту, протеолітичні ферменти та білки екстрацелюлярного матриксу [41, 42].

За однією моделлю, опікова рана може бути розділена на три зони залежно від тяжкості руйнування тканин і зміни кровотоку [28, 42-44]. Центральна частина рани, відома як зона коагуляції, зазнає найбільшої кількості та сили пошкоджуючого агента. Надмірний вплив пошкоджувального агента на місці травми призводить до денатурації, деградації та коагуляції білків, що спричиняє некроз тканин. Навколо центральної зона коагуляції - є зона стазу, або зона ішемії, саме у цій зоні може відбуватися некроз тканини впродовж 48 год після опіку при відсутності медичного втручання [45]. Механізми, що лежать в основі апоптозу та некрозу в зоні ішемії залишаються недостатньо вивченими. Впродовж перших 24 годин після травми відбувається аутофагія і апоптоз із запізненням - приблизно від 24 до 48 годин після опікової травми [45]. Крайня область опікової рани є зоною гіперемії, яка має підвищений кровообіг та вазодилатацію спричинені запаленням. Дана зона рани зазвичай, за нормального загоєння, відновлюється [43].

Хоча опіки відрізняються від інших ран рядом аспектів, загоєння всіх ран є динамічним процесом з фазами, що збігаються [46, 47]. Початковий запальний процес спричинений нейтрофілами і моноцитами, які надходять до рани через локальну вазодилатацію та екстравазацію рідини, тим самим ініціюють імунну відповідь, що пізніше підтримується набором макрофагів та

хемокінів [46]. Процеси запальної фази направлені не лише для запобігання інфікування під час загоєння, а також на знищення некротичної тканини [48]. Збільшення судинної проникності в зоні травми є основою для надходження різних клітинних популяцій, включаючи поліморфонуклеарні лейкоцити (ПНЛ) та мононуклеарні лейкоцити, які дозрівають в ранові макрофаги та пізніше в лімфоцити.

Моноцити вважаються найбільш важливими клітинними компонентами ранніх фаз процесу ранового загоєння. Проте ПНЛ необхідні для захисту рани від інфекції, знищення бактерій і видалення некротичних тканинних фрагментів. Активовані нейтрофіли виділяють вільні кисневі радикали та лізосомальні ензими, включаючи протеази, колагенази і еластази, які допомагають у боротьбі з інфекцією та в очищенні рани [49]. Таким чином, фагоцитоз лежить в основі формування макрофаго-лімфоцитарного комплексу, який може продукувати речовини, що впливають на рану та організм у цілому [49, 50]. Крім того, продукти фагоцитуючих клітин беруть участь також в процесах, які супроводжують фазу самоочищення рани, а саме, судинної запальної реакції (набряку), формуванні запального ексудату, лізису мертвих тканин, запуску і стимуляції іммуноцитогенезу [50, 51]. В результаті осередок травматичної деструкції (рана) перетворюється на осередок нагноєння (гнійну рану), однак, до певного моменту, це ще не відповідає поняттю хірургічної інфекції. Гнійна рана утворюється тоді, коли серозний ексудат поповнюється клітинними популяціями (мігруючі фагоцити, лімфоцити, тромбоцити, ендотеліоцити), фрагментами мертвих тканин [52, 53]. Запалення є життєво важливим процесом для успішного загоєння ран, а медіатори запалення (цитокіни, кініни, ліпіди, і т. д.) забезпечують імунні сигнали для набору лейкоцитів і макрофагів, які ініціюють проліферативну фазу [49, 53].

Проліферативна фаза характеризується активацією фібробластів цитокінами і факторами росту [54]. На даній стадії фібробласти та кератиноцити мігрують ушкодженими тканинами, допомагаючи відновити

судинну сітку, що є важливим кроком у процес загоєння ран [10]. Ця мережа взаємодії між стромальними, ендотеліальними та імунними клітинами сприяє загоєнню.

Відкладення фібронектину створює в рані каркас, на який мігрують фібробласти. Фібронектин продукується в перші 24-48 годин після травми. Популяція фібробластів стає домінуючою серед усіх клітин в рані, після того як фаза запалення йде на спад. Джерело цих фібробластів - похідні фіброцитів сполучної тканини. Фібробласти продукують різноманітні активні речовини, необхідні для ранового загоєння, в тому числі глікозаміноглікани і колаген. Протеоглікани - протеїни, до яких прикріплюються полісахариди. Чотири головних глікозаміногліканів включають гіалуронову кислоту, хондроїтин-4-сульфат, дерматин сульфат і сульфат гепарину. Вони формують аморфний гель, відомий як «основна субстанція», який має важливе значення у відкладенні і агрегації колагенових фібрил. 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 [48, 54]

Особливе місце у процесі проліферації відводиться матриксним металопротеїназам (ММП). Їм належить ключова роль у обміні білків сполучної тканини як у здорових, так і пошкоджених тканинах. Основними компонентами міжклітинного матриксу сполучної тканини є фібрилярні білки (колаген і еластин) та полісахариди [55].

ММП- представники сімейства цинкових протеїназ, що беруть участь у протеолітичній деградації різних компонентів позаклітинного матриксу, здійснюють регулюючу та модулюючу функцію в ангиогенезі [56]. Ключовим моментом регуляції ангиогенезу є баланс ангиогенних та ангиостатичних факторів, які, як вважається, визначають перебіг раневого процесу взагалі та опікової рани зокрема. Сучасні досягнення протеоміки показали, що для

нормального розвитку, фізіологічного відновлення здорових тканин провідними є дві групи білків, а саме, ММП та їх тканинні інгібітори [57].

Субстратами ММП є фактори росту, хемокіни, протеїнази, адгезивні молекули і компоненти позаклітинного матриксу. Синтез металопротеїназ стимулюють фактори росту, гормони, цитокіни, адгезивні молекули, компоненти позаклітинного матриксу і активні форми кисню. Вважається, що основним джерелом ММП при запаленні є нейтрофіли і макрофаги. Як передбачається, прямо або опосередковано, в синтезі ММП важлива роль належить тучним клітинам та еозинофілам. Підвищена експресія та висока активність ММП в свою чергу, приводить до запальної реакції [58], у той час як зниження експресії та активності ММП може бути причиною надмірного утворення екстрацелюлярного матриксу та патологічного загоєння рани.

Хронічні рани містять вищі концентрації ММП в тканинах і тканинному ексудаті порівняно з гострими ранами. Наприклад, нейтрофільна еластаза в хронічних ранах в уражених тканинах присутня в концентрації в 10-40 разів вище, ніж в ранах при гострому запаленні. Високий рівень протеолітичної активності може привести до тривалої деградації ендogenous сполук. Необхідно відзначити, що, коли має місце ранева епітелізація, продукція ММП кератиноцитами припиняється. Одночасно з цим формується десмосомальне прикріплення між кератиноцитами і базальною мембраною. Активність ММП зазвичай регулюється тканинними інгібіторами матриксних металопротеїназ (ТІМП-1 і ТІМП-2). Зміна концентрації ТІМП в рані може бути обумовлена зниженням ензиматичної деструкції ендogenous і екзогенних факторів росту, присутніх в хронічній рані [59].

Надмірне утворення рубцевої тканини - ще одна особливість хронічної рани. Незважаючи на первинне закриття рани, можливі відхилення від нормального процесу загоєння в сторону його хронізації, що обумовлено фібро-проліферативними розладами. Ці відхилення характеризуються надмірним відкладенням колагену або надмірною продукцією колагену, протеогліканів і

фібронектину, а також порушенням процесу деградації екстрацелюлярного матриксу. Є дві форми фібро-проліферативних розладів, що викликають особливий інтерес, - це гіпертрофічні рубцювання та утворення келоїдних рубців [59, 60].

Останньою фазою загоєння є реконструкція рани або фаза епітелізації, яка часто може поєднуватись з проліферативною фазою [60]. Під час фази ремоделювання утворюється рановий рубець [46], за рахунок осадження колагену та еластину та перетворення фібробластів на міофібробласти [61]. Через 3 тижні після травми встановлюється рівновага між синтезом колагену і його лізисом, після чого починається ремоделювання тканин у рубці, що формується. Цей процес триває близько 2 років, і, хоча при цьому не спостерігається підвищення кількості колагену, відбувається формування колагенових фібрил у більш організовані структури під впливом локальних механічних факторів. Епітелізація поверхні рани є критерієм успішного лікування рани і являє собою ряд послідовних подій, що включають мобілізацію, міграцію, мітоз і клітинну диференціацію епітеліальних клітин [46, 61].

Кінцевий результат неускладненого процесу раневого загоєння - це ніжний рубець з невеликим фіброзом, повернення практично до нормальної структури тканини і функції органу. Якщо рана у ході лікування не загоюється впродовж 8 тижнів, вона вважається хронічною [62, 63]. Загоєння хронічних ран відбувається з формуванням надлишкової грануляційної тканини, часто з розвитком надмірного фіброзу, що веде до рубцевої контрактури і втрати повноцінних функцій органу [63, 64].

Таким чином, процес загоєння опікової рани є комплексним та багатоступеневим процесом, що характеризується складними метаболічними каскадами та взаємодією між клітинами, екстрацелюлярним матриксом, цитокінами, хемокінами та факторами росту. Поглиблення розуміння процесів загоєння гострих та хронічних ран, застосування факторів росту, інгібіторів та

активаторів ензимів може сприяти успіху в лікуванні пацієнтів з даною патологією.

### **1.3 Потенційні методи лікування при хімічних опіках стравоходу**

Сукупність змін в організмі потерпілого, що виникають у результаті обширного опіку, прийнято в даний час називати опіковою хворобою. Вона має певний циклічний перебіг. За загально прийнятою періодизацією розрізняють 4 періоди опікової хвороби, кожен з яких має свої прояви і вимагає особливого лікування. Перший період хвороби носить назву «опіковий шок», який настає одразу після опікової травми та триває 2-3 доби; другий – «гостра опікова токсемія», яка триває до двох тижнів; третій – «септикотоксемія» яка характеризується активним розвитком бактеріальної інфекції і четвертий – «реконвалесценція» (одужання), впродовж якої вирівнюються і нормалізуються всі функції організму, який переніс важку фізичну і психічну травму [64].

Основною метою при лікуванні є запобігання утворенню рубцевої стриктури, зниження інтенсивності перебігу запального процесу та бактеріальної транслокації в тканини стравоходу. На сьогодні загальноприйнятими методами лікування під час гострої фази є застосування стероїдних препаратів для зменшення запального процесу; антирефлюксна терапія, для запобігання розширення опікової рани та різноманітні комбінації антибіотиків для пригнічення росту бактерій. Такі методи як розширення стравоходу (бужування), стентування, міотомія застосовуються для запобігання утворенню патологічного звуження стравоходу - стриктури після прийому агресивної речовини [65, 66]. Однак, доцільність використання антибіотиків та стероїдних препаратів залишається суперечливою [65].

Одним з головних є питання щодо лікування при утворенні стенозів та стриктур після опікової травми [65]. Повторні процедури розширення можуть викликати травми слизової оболонки, в результаті чого можливе збільшення

утворення рубців через посилення проліферації фібробластів та осадження колагену [67], що в кінцевому підсумку викликає можливе погіршення стриктури. До того ж, оперативне втручання небезпечне для дітей як в фізичному плані так і в психологічному. На сьогодні відсутня універсальна схема лікування, яка б однозначно дала можливість уникнути утворення стриктури стравоходу.

Значна кількість досліджень, присвячених вивченню препаратів, що сприяють зниженню запалення та полегшують перебіг процесів загоєння після хімічних опіків стравоходу, це речовини такі як еритропоетин, дексанфенол, ретиноева кислота, ібупрофен, епідермальний фактор росту, вітамін Е, метилпреднізолон, N-ацетилцистеїн, диметилсульфоксид [68]. Але незважаючи на велику кількість препаратів та різноманітних досліджень, потрібно проводити пошук та дослідження нових перспективних речовин для лікування корозійного езофагіту.

Однією з головних причин смерті після важкого опіку є сепсис та мультиорганна недостатність [69], тобто профілактика та лікування інфекції є однією з основних проблем в лікуванні опіків. На сьогодні, маркером запальної реакції є С-реактивний білок і лейкоцитарна формула. Пошкоджені тканини при опіку забезпечують утворення сприятливого середовища для бактеріального росту та разом з імуносупресією, що супроводжує великі опіки, є основними причинами для розвитку інфекції, інвазивного сепсису. На сьогодні сепсис найчастіша причина смерті після опікової травми і сприяє майже 75-85% всіх смертей після опікової травми [70].

На сьогодні існують різноманітні методи для лікування опікових травм та попередження їх ускладнень. Так, можуть використовуватися гелі [11], що містять природні глікозаміноглікани, хітин, що запобігає розвитку опікової травми [12], має антимікробні властивості [13] сприяє проліферації фібробластів та ангиогенезу. Також можна підвищити ефект загоєння опікової рани шляхом включення факторів росту фібробластів у гель [14]. Активно

досліджується застосування статинів, які демонструють протизапальну дію, що було підтверджено у досліджах, результати яких показали поліпшення виживання після опікового сепсису на тваринній моделі [71]. Дуже популярним є використання стовбурових клітин, які прискорюють загоєння опікових ран, що було показано в тваринних моделях. Крім того, лікування стовбуровими клітинами шкіри сприяло зниженню маркерів міофібробластів і знижувалася продукція колагену I типу, це призводило до зменшення фіброзів [15].

За останні декілька десятиліть, були зроблені значні успіхи в терапії лікування опіків. Однак до сьогодні, триває пошук ефективної схеми лікування при хімічному опіку стравоходу у дітей. При глибоких опіках стравоходу, важливо швидко надати необхідну допомогу, тому що будь-яка затримка або неналежне лікування може значно уповільнити процес загоєння або викликати серйозну інфекцію. На сьогодні, на фармацевтичному ринку є багато препаратів для лікування опіків, більшість з яких мають тільки антимікробну активність, але не впливають на процес загоєння рани. Крім того, ці засоби часто є токсичними для інтактних клітин, і викликають алергічні реакції [72]. Перспективним є використання природних нетоксичних антиоксидантів в якості цитопротекторів [73]. Захисний ефект антиоксидантів широко досліджується в умовах впливу несприятливих чинників, метаболічних розладів. Лікарські рослини, багаті фенольними сполуками потенційно можуть впливати на прискорення загоєння опікових ран і захищати рану від бактеріальних інфекцій [17]. За опіків відбувається порушення гомеостазу між активними формами кисню та антиоксидантними системами захисту в організмі [74]. Антиоксидантний ефект фенольних сполук відбувається за рахунок різних механізмів дії: пригнічення утворення активних форм кисню, здатність нейтралізувати молекули синглетного кисню, зв'язувати іони металів які є каталізаторами реакцій, що призводять до утворення активних форм кисню, перериваючи каскад реакцій вільних радикалів у процесі перекисного окиснення ліпідів [16, 18, 75, 76].

Таким чином, аналіз сучасної літератури дозволяє стверджувати, що можливими перспективними засобами нормалізації процесу загоєння за ЛОС є речовини природного походження на основі поліфенольних сполук. У зв'язку з цим великий інтерес представляє можливість використання при хімічних опіках речовини меланін. Він є одним з найпотужніших антиоксидантів, що запобігає деградації колагенових білків та посилює мікроциркуляцію [77]. Меланін проявляє властивості гастропротектора, його застосовують при лікуванні наслідків дії стресу на організм [21].

Меланіни – це полімери фенольних сполук [78]. Його колір і захисні функції багато в чому обумовлені наявністю в його молекулі неспарених електронів. Загальна класифікація меланінів, включаючи всі їх типи у про- і еукаріотів, містить три головні класи таких полімерів: еумеланіни, феомеланіни, алломеланіни. В шкірі людини виявлено 2 типи меланіну: еумеланін і феомеланін. Найбільш інтенсивно вивчається структура еумеланіну. Важливу роль в утворенні меланіну відіграють амінокислота тирозин та фермент тирозиназа, який каталізує перші етапи біосинтезу меланіну [78].

Еумеланіни (чорні або коричневі) – утворюються в результаті окиснення тирозину (і/або фенілаланіну) за участю фермента тирозинази до о-дигідроксифенілаланіну (ДОФА) і ДОФАхінону, який в подальшому циклізується до 5,6-дигідроксиіндолу або 5,6-дигідроксиіндол-2-карбоксильної кислоти, які зазнають оксидативної полімеризації з утворенням меланіну [79]. Феомеланіни мають жовте, червоне та коричневе забарвлення. Розповсюдження феомеланінів обмежується волоссям, пір'ям, а також веснянками. Алломеланіни-чорні пігменти вищих рослин та грибів. У грибів алломеланіни знаходяться в спорноспроному шарі та спорах їстівних грибів та в чорних гіфах пліснявих грибів [80].

При взаємодії фенольних сполук з вільними радикалами нейтралізація (інактивація) останніх супроводжується переходом неспареного спіну, утворені

радикали фенольних сполук (семіхіноні, фенокисьні, арокисьні) - довгоживучі, малоактивні і не продовжують ланцюг вільнорадикальних перетворень. З іншого боку, радикали фенольних сполук можуть реагувати з окисними радикалами з взаємною інактивацією. Ці ефекти фенольних сполук можна охарактеризувати як антиоксидантні. В результаті окиснення будь-якої з цих сполук поліфенолоксидазою або в комбінації з іншими фенольними та нефенольними сполуками, наприклад, цистеїном, відбувається утворення хінонів, які здатні полімеризуватись з утворенням макромолекулярних продуктів з властивостями меланінів [79].

Меланіни - це стабільна полімерна макромолекула. Як молекулярне сито, меланін здатний нейтралізувати і стабілізувати новоутворені активні форми кисню, іони металів зі змінною валентністю, електрофільнотоксичні речовини - метаболіти, канцерогени, лікарські препарати. Утворення самого меланіну можна розглядати як спосіб детоксикації продуктів окисного метаболізму катехоламінів [81].

Меланін та його попередник діоксифенілаланін інгібують ПОЛ [79, 80] і дають фотозахист в розчинах та модельних системах з ліпосомами, в гомогенатах мозку щурів. Діоксифенілаланін-меланін гальмує розвиток вільнорадикальних процесів в опроміненних білках [82]. Автори вважають, що це обумовлено безпосередньою взаємодією меланіну з вільними радикалами, які виникають при опроміненні біологічних об'єктів. Присутність меланіну зменшує необхідність в активації супероксиддисмутази. Є.П. Сидорик, М.О. Дружина, А.П. Бурлака та співавт. [83] показали, що меланін гальмує швидкість генерування супероксидних радикалів-аніонів у мембранах ендоплазматичного ретикулуму печінки.

При моделюванні запальних процесів меланін діє на інші речовини, що супроводжують запальний процес - простагландини, лейкотрієни та систему комплементу. Меланін значно інгібує первинні запальні ураження у щурів. При цьому меланін не тільки гальмує процеси ПОЛ у мікросомальних мембранах

гепатоцитів щурів, а також нормалізує концентрацію цитокінінів ІЛ-1 і ІЛ-6, ТНФ-альфа та лімфоцитів (Т4 або Т8), що відповідають за клітинний імунітет [84]. Тобто, меланін проявляє антизапальні та імуномодулюючі властивості.

Були проведені дослідження щодо впливу меланіну на виразакоутворення в умовах стресу, та було показано зменшення ерозій в слизовій оболонці шлунку викликаних стресом. Також меланін підсилював експресію eNOS яка активує механізми захисту в клітинах [85]. Також, показано вплив гелю на основі меланіну на загоєння хімічного опіку шкіри, меланін сприяв зниженню запального процесу та пришвидшенню загоєння опікової рани. [19]. Розчинні форми меланіну можуть в умовах організму виконувати і транспортну функцію, сприяючи переносу важливих метаболітів. Наприклад, меланіни здатні долати гематоенцефалогічний бар'єр, транспортуючи речовини, які не здатні проходити через цей бар'єр самостійно [85].

Проведений аналіз літератури свідчить про відсутність комплексних досліджень впливу меланіну на процеси загоєння ХОС. В літературі є лише поодинокі згадки впливу меланіну на процеси загоєння при зовнішніх опіках [19]. Наведені дані свідчать про недостатнє вивчення впливу меланіну на механізми процесу загоєння за лужного опіку стравоходу. Теоретичне значення досліджень впливу меланіну на процеси загоєння при опіку та перспективність меланіну як субстрату для створення фармакологічного препарату з цитопротективними властивостями, який може застосовуватися в комплексному лікуванні саме лужних опіків стравоходу. Для подальших досліджень було обрано меланін який є продуктом життєдіяльності дріжджеподібних грибів *Nadsoniella nigra* штам X-1 [20]. Меланін демонструє антиоксидантні [18, 19, 20], імуномодулюючі [82], антиканцерогенні [72] та стрес-протекторні [20] властивості.

## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

#### 2.1 Реактиви та матеріали

У роботі були використані наступні реактиви: супероксиддисмутаза, каталаза, тріс-НСІ, НАДН, НАДФН, нітросинім тетразолієм (НСТ), нікотинамідаденіндинуклеотида (НАДН), феназинметасульфата (ФМС), акриламід, L-аргінін, N,N'-метилен-біс-акриламід, персульфат амонію, ТЕМЕД (N,N,N',N'-тетраметилен-1,2-діамін) (GE Healthcare AB, Швеція), маркери молекулярної маси білків для електрофорезу, протеїн А сефароза (Amersham Biosciences, AB, Швеція). ФМСФ, натрію додецилсульфат, кумасі блакитний, Твін-20, тритон X-100, БСА, ПМСФ, ЕДТА.

Комерційні набори для визначення інтерлейкінів: ФНП- $\alpha$ , ІЛ-1 $\beta$ , ІЛ-6, ІФ- $\gamma$ , ІЛ-4, ІЛ-10, ІЛ-12, комерційні набори для визначення: ММП (1,2,3,8,9), ФРФ та ТІМП-1, Іg класу G виробництва фірми «Santa Cruz Biotechnology», США. Поліклональні анти-мишині, анти-кролячі, анти-бичачі антитіла, коньюговані з пероксидазою хрону; субстрат для пероксидази хрону о-фенілендіамін (OPD) виробництва фірми «Sigma», США.

Набори: Таq ДНК-полімераза, RevertAid M-MLV зворотна транскриптаза, рекомбінантна Таq ДНК-полімераза (“Fermentas”, Литва). Тіопентал натрію (“Київмедпрепарат”, Україна).

Решта хімічних реактивів (солі, кислоти, луги) були вітчизняного виробництва кваліфікації не нижче ч.д.а.

#### 2.2 Обладнання

При виконанні роботи використано прилади і обладнання таких марок та виробників: центрифуги СМ-6М «ELMI», Allegra 64R «Beckman Coulter»,

мікропланшетний рідер виробництва фірми «BioTec», США; хроматограф «Bio Logic LP», спектрофотометр «Smart Spec Plus» виробництва фірми «Bio Rad», США; мікроскоп Primo Star «Zeiss», автоматичні піпетки та дозатори «Humapette», апарат для препаративного диск-електорофорезу «BioRad».

Біохімічний аналізатор «Humalyser 3000», набір для фотометричного колориметричного визначення концентрації Albumin liquicolor (Human human GmBh- 65205 wiesbaden). Виготовлені в Germany human diagnostics worldwide. Total Proteine liquicolor, Urea liquicolor, Creatinine liquicolor, GPT (ALAT) IFCC mod .liquiUV Humazym Test, COT (ASAT).IFCC mod. liquiUV Humazym Test, Sodium-rapid ( $\text{Na}^+$ ), Potassium liquirapid ( $\text{K}^+$ ), Chloride liquicolor (Cl<sup>-</sup>), Human human GmBh- 65205 wiesbaden).

Магнітні мішалки, піпетки автоматичні, термостати, шейкери та т.і. є продукцією фірм, що працюють згідно стандарту ISO 9001. Пластиковий лабораторний посуд (планшети для імуноферментного аналізу, планшети з несорбуючою поверхнею, епандорфи, пробірки та інше) отримано від фірми Sente-Lab. Скляний лабораторний посуд (колби, стакани, пробірки, циліндри та інше) фірми Simax.

### **2.3 Дотримання положень про гуманне ставлення до тварин**

При роботі з лабораторними тваринами дотримувалися міжнародних рекомендацій про проведення медично-біологічних досліджень з використанням тварин згідно з «Загальними принципами роботи на тваринах», затвердженими I Національним конгресом з біоетики (Київ, Україна, 2001) і погодженими з положеннями «Європейської конвенції із захисту хребетних тварин, які використовуються в експериментальних та інших наукових цілях» (Страсбург, Франція, 1986). Експериментальні роботи зі щурами проводили у віварії Київського національного університету імені Тараса Шевченка (2015 - 2018 р.). Роботи з тваринами регламентувались правилами проведення

експериментальних робіт з піддослідними тваринами, які було затверджено вченою Радою цього закладу, які в свою чергу узгоджувались з чинним законодавством України, прийнятим на той період [86].

## 2.4 Умови проведення експерименту

Дослідження проводили на статевонезрілих щурах (самках) масою 90-110 г. Впродовж експерименту тварини утримувались на стандартному раціоні віварію з вільним доступом до їжі. Впродовж всього експерименту було використано 532 щури. Щурів розділяли на 5 груп : 1 група інтактні щури, 2 група - щури з ЛОС 2 ступеня яким вводили фізіологічний розчин у відповідній дозі, 3 група – щури з ЛОС 2 ступеня, яким вводили меланін починаючи з 2-ї доби експерименту в дозі 0,1мг/кг; 4 група – щури з ЛОС 2 ступеня, яким вводили меланін починаючи з 2 доби експерименту в дозі 0,5 мг/кг; 5 група – щури з ЛОС 2 ступеня, яким вводили меланін починаючи з 2-ї доби експерименту в дозі 1мг/кг. Для кожної групи щурів було не менше 10. Меланін вводили впродовж 14 діб. Лужний опік стравоходу моделювали використовуючи розчин 20% NaOH. 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 розчину 20% NaOH, моделюючи зміни, що відповідають 2-му ступеню опікового ураження. Контрольним щурам одноразово перорально вводили відповідний об'єм води для ін'єкцій [87]. Продуцентом меланіну, який був використаний в наших дослідженнях, були дріжжеподібні гриби *Nadsoniella nigra* штам X1, що висіяні із зразків вертикальних скель о. Галіндез. Тварин виводили з експерименту на 1, 7, 15 та 21 добу від моменту введення NaOH/вода. Вибір термінів дослідження обумовлений розвитком патоморфологічних процесів за хімічних опіків стравоходу [64].

## **2.5 Отримання сироватки крові**

Сироватку крові отримували з цільної крові. Кров залишали при 37° С на 4 години для вилучення фібриногену та супутніх білків. На наступному етапі чистою сухою скляною паличкою згусток крові обережно відділяли від стінок пробірки для пришвидшення отримання сироватки і центрифугували впродовж 40 хв. при 2500 г. Отриманий супернатант (сироватку) швидко відокремлювали від формених елементів крові, переносили епендорфи та заморожували при -20°С до подальшого використання [88].

## **2.6 Отримання плазми крові**

Тварин забивали методом декапітації. Плазму крові щурів отримували з цільної крові. Кров відбирали у поліетиленові пробірки з вмістом 3,8% цитрату натрію у співвідношені 9:1. Обережно перемішували та центрифугували при 2,5 тис.об/хв впродовж 30хв. Отриманий супернатант (плазму) швидко відбирали та заморожували при -20°С до подальшого використання. При розморожуванні аліквоту плазми поміщали на водяну баню за температури 37°С [88].

## **2.7 Отримання слизової оболонки стравоходу**

Вилучений стравохід розрізали та промивали фізіологічним розчином. Верхній шар клітин зішкрібали та переносили до 3 мл буферу для тканин 10мМ тріс НСІ (рН7.4) з вмістом 0,2М сахароза та 1мМ ЕДТА. Гомогенізували у скляних гомогенізаторах Поттера та центрифугували при 2,5 тис.об/хв. 25 хв. Отриманий супернатант швидко відбирали та заморожували при -20°С до подальшого використання [89].

## **2.8. Визначення концентрації білка за методом Бредфорд.**

Визначення проводили згідно з стандартною методикою [90], з деякими модифікаціями. Досліджуваний зразок об'ємом 20 мкл вносили пробірку, додавали 200 мкл реактиву Бредфорд, повільно струшували на шейкері, через 10 хвилин вимірювали оптичну щільність на спектрофотометрі.

Калібрувальну криву будували, використовуючи розчин БСА в якості стандарту. Графік залежності поглинання A595 будували залежно від концентрації стандарту.

## **2.9. Визначення біохімічних параметрів сироватки крові**

Біохімічні показники сироватки крові щурів (вміст загального білка, альбуміну (г/л), креатиніну (мкмоль/л), сечовини (мг/дл), концентрацію холестеролу та глюкози (ммоль/л), активність аланін- та аспартатамінотрансфераза, лужної фосфатази, креатинкінази (од/л) концентрацію Na, K, Cl, Mg (ммоль/л), Ca та фосфатів (мг/дл) визначали спектрофотометрично на біохімічному аналізаторі Humalyser 3000 з використанням стандартних тест наборів [91].

## **2.10. Гістологічний аналіз зрізів стравоходу щурів**

Виготовлення парафінових зрізів стравоходу [92]. Під час забою експериментальних щурів забирали уражені ділянки стравоходу. Зразки тканин стравоходу фіксували у 10% буферному формаліні впродовж 2 діб. Після фіксації тканини ретельно промивали проточною водою впродовж 2 год. Промивали дистильованою водою впродовж 10 хв. Проводили по розчинам спиртів зростаючої концентрації, щоб довести до хлороформу:

1.70% спирт дві зміни впродовж 2 год.;

2. 80% спирт впродовж 2 год.;
3. 90% спирт впродовж 2 год.;
4. 96% спирт впродовж 1,5 год.;
5. Абсолютний спирт 100% EtOH, впродовж 1,5 год.

Зразки тканин стравоходу поміщали у суміш 96% спирту з хлороформом у співвідношенні 1:1 на 1 год. Переносили зразки у хлороформ, замінюючи розчин двічі по 20 хв. Отримані зразки тканин вносили у суміш хлороформу з парафіном (дві зміни по 30 хв. кожна,  $t$  37°C). Наступного етапу зразки тканин стравоходу переносили безпосередньо у парафін на 30 хв.,  $t$  56°C. Заливали у парафін, після отримання готових блоків їх розрізали на мікротомі із товщиною зрізів 5 – 7 мкм. Парафінові зрізи викладали на обезжирені предметні скельця, змащені білок/гліцерином та складали на предметний столик.

Для оцінки зрізів стравоходу використовували метод забарвлення гематоксилін-еозином. Забарвлення зрізів стравоходу проводили за стандартною методикою фарбування гематоксилін-еозином. Спочатку депарафінували зрізи та проводили по спиртах спадної концентрації до дистильованої води (96%, 90%, 80%, 70% спирт по 5 хв. у кожному). Промивали в дистильованій воді та зафарбовували гематоксиліном Бемера впродовж 3 - 5 хв. На наступному етапі промивали проточною та дистильованою водою. Зафарбовували еозином впродовж 1 - 2 хв та швидко промивали в дистильованій воді. Зневоднювали проводячи по спиртах зростаючої концентрації (70%, 80%, 90%, 96% спирт по 5 хв у кожному). Просвітлювали бензолом (дві зміни по 3-5 хв.) та заключали в канадський бальзам.

## 2.11. Визначення вмісту дієнових кон'югатів ненасичених жирних кислот

Вміст дієнових кон'югатів визначали за методом [93]. У щільно притертий скляний гомогенізатор Поттера вносили аліквоту, що містила 0,1 мг білка досліджуваного зразка, до аліквоти – додавали 5 мл суміші гептан/ізопропіловий спирт у співвідношенні 1:1 та гомогенізували 10 хв. Проби центрифугували (1000 g, 15 хв) у пробірках з притертою пробкою. Надосадову фракцію відбирали та додавали 0,5 мл дистильованої води для розшарування фаз гептану та ізопропілового спирту.

Для визначення дієнових кон'югатів у хімічні пробірки відбирали по 0,3 мл гептанової фази, додавали 1,5 мл 96% етилового спирту, проби перемішували, вимірювали показник екстинкції при  $\lambda=233$  нм на спектрофотометрі. Вміст дієнових кон'югатів у пробі розраховували, виходячи з величини молярного коефіцієнту екстинкції при  $\lambda=233$  нм для спряжених дієнів 4болі ненасичених вищих жирних кислот, що дорівнює  $2,2 \times 10^5 \text{ см}^{-1}\text{M}^{-1}$ , та виражали в умовних одиницях / мг білка. Вміст дієнових кон'югатів у пробі розраховували за формулою:

$$C = \frac{A}{(\varepsilon \times a)},$$

де  $C$  – вміст дієнових кон'югатів,  $A$  – екстинкція проб,  $\varepsilon$  - молярний коефіцієнт екстинкції при  $\lambda=233$  нм для спряжених дієнів поліненасичених вищих жирних кислот,  $a$  – вміст білку в пробі, мг.

## 2.12. Визначення вмісту ТБК-активних продуктів

Вміст ТБК-активних продуктів оцінювали згідно методу Стальної [94]. У пробу вносили аліквоту досліджуваного зразка, який містив 0,5 мг білка, у тріс-буфері (25 мМ тріс-НСІ, 175 мМ КСІ, рН=7,4) та додавали 0,2 мл 17% трихлороцтової кислоти. Проби центрифугували при 1000 g 15 хв. До супернатанта (0,5 мл) додавали 0,25 мл 0,8% тіобарбітурової кислоти та інкубували на киплячій водяній бані 10 хв для розвитку забарвлення.

Визначення інтенсивності забарвлення проводили на спектрофотометрі при  $\lambda=532$  нм.

Вміст ТБК-активних продуктів розраховували на основі значення молярного коефіцієнта екстинкції комплексу малонового діальдегіда з 2-тіобарбітуровою кислотою за формулою:

$$C = \frac{E_{\text{досл}}}{a_{\text{мг}} \times 1,56 \cdot 10^5 \text{ моль}^{-1}},$$

де С – вміст ТБК-активних продуктів,  $E_{\text{досл}}$  - екстинція проби, а – вміст білка в пробі, мг. Вміст ТБК-активних продуктів визначали у  $\text{нмоль} \times \text{мг}^{-1}$  білка.

## 2.13. Визначення супероксиддисмутазної активності

Супероксиддисмутазну активність визначали за Чеварі і співавторами [95]. Метод базується на здатності супероксиддисмутази конкурувати з НСТ за супероксидні аніони, що утворюються в результаті аеробної взаємодії відновленої форми НАДН та ФМС. У результаті цієї реакції НСТ відновлюється з утворенням гідразантетразаолію. У присутності СОД відсоток відновлення НСТ зменшується. У дослідну пробірку, що містила 50 мкл суспензії клітин (0,5 мг білка), додавали 2 мл реагенту 1 (57 мкМ НСТ, 16 мкМ ФМС на 0,15 М фосфатному буфері з ЕДТА, рН=7,8). Одразу вимірювали екстинцію проб при  $\lambda=540$  нм на спектрофотометрі. Потім до кожної проби додавали 100 мкл реагенту 2 (98,5 мкМ НАДН на Тріс-ЕДТА буфері, рН=8,0),

проби витримували при 30°C та повторно визначали екстинцію через 10 хвилин за тих же умов.

За формулою розраховували відсоток пригнічення ступеню відновлення НСТ у пробі:

$$E = \frac{\Delta E_{\text{нул}} \times 50}{\Delta E_{\text{досл}} \times 100 \times t \times a},$$

де E – супероксиддисмутазна активність,  $\Delta E_{\text{нул}}$  - екстинція проби до додавання реагенту II,  $\Delta E_{\text{досл}}$  - екстинція проби після додавання реагенту II, 50/100 – 50% блокування реакції відновлення НСТ, a – вміст білка в пробі, мг, t – час інкубації 10 хв. Супероксиддисмутазну активність визначали в умовних одиницях / (хв × мг білка).

#### 2.14. Визначення каталазної активності

Для визначення каталазної (КФ 1.11.1.6) активності застосовували спектрофотометричний метод, який базується на здатності пероксиду водню утворювати з солями молібдену стійкий забарвлений комплекс [96].

Під час дослідження у лунки мікропланшету вносили 200 мкл 0,03% розчину пероксиду водню. Реакцію запускали додаванням в лунки 10 мкл досліджуваного зразку. Реакцію зупиняли через 10 хв, додаючи в реакційне середовище 100 мкл 4% молібдату амонію. Інтенсивність забарвлення, яке утворювалось, вимірювали спектрофотометрично при довжині хвилі 410 нм проти контрольної проби, в яку замість проби вносили 10 мкл води.

Каталазну активність розраховували за формулою:

$$A = \frac{E_1 - E_2}{k * t},$$

де  $A$  – активність ферменту, мкмоль  $H_2O_2/xv \cdot mg$  білка;  $E_1$  – екстинція проби на початку інкубації;  $E_2$  – екстинція проби в кінці інкубації;  $k$  – калібрувальний коефіцієнт;  $t$  – час інкубації.

## 2.15 Визначення активності NO-синтази

Визначення активності NO-синтази ( $Ca^{2+}$ -залежної та  $Ca^{2+}$ -незалежної) засноване на комбінації класичного метода [97] та сучасної його модифікації [98], пристосованої до спектрофотометричного вимірювання одного з продуктів реакції – L-цитруліну.

Для визначення загальної активності NO-синтази аліквоти грубих гомогенатів клітин (фракціонування гомогенатів не проводили з метою визначення величини сумарної активності NO-синтаз) інкубували впродовж 60 хв при  $37\text{ }^\circ\text{C}$  в загальному об'ємі 120 мкл субстратної суміші ( $pH=7,0$ ), яка містила: 50 мкМ  $KH_2PO_4$ , 1 мкМ  $MgCl_2$ , 2 мкМ  $CaCl_2$ , 4,8 мМ НАДФН, 2 мкМ L-аргінін. Реакцію зупиняли, додаючи 0,3 мл 2N  $HClO_4$ . Контролем були проби, що містили повну субстратну суміш та попередньо денатурований білок 2N  $HClO_4$ . Контрольну та дослідні суміші центрифугували 10 хв при 3500 об/хв і в надосадовій безбілковій суміші визначали вміст L-цитруліну за кольоровою реакцією з антипірином.

Методика визначення активності індукцйбельної NOS була аналогічна попередній з деякими відмінностями: для визначення активності  $Ca^{2+}$ -незалежної NOS в інкубаційну суміш замість  $CaCl_2$  додавали 2 мкМ ЕДТА.

Цитрулін визначали високочутливим колориметричним методом [99]. Безбілкові аліквоти проб, об'ємом 100 мкл, змішували з 1 мл 59 мМ диацетилмонооксиму та 1 мл 32 мМ антипірину з 55 мкМ сульфату заліза в 6N  $H_2SO_4$ , ставили на 15 хв на водяну баню ( $96\text{--}100\text{ }^\circ\text{C}$ ) і після охолодження визначали екстинцію при  $\lambda=465$  нм. Вимірювання проводили проти проби, яка

містила 100 мкл дистильованої води, 1 мл діацетилмонооксиму та 1 мл антипірину з сульфатом заліза. Вміст цитруліну визначали за допомогою калібрувального графіку.

Активність ферменту виражали в нмоль L-цитруліну на мг білка за хв.

$$A = ((A_{cit} - A_0) * V) / (B * t),$$

де,  $A_{cit}$  – абсорбція цитруліну проби,  $A_0$  – абсорбція холостого зразка,  $V$  – об'єм інкубації (120 мкл),  $B$  – нахил калібрувальної кривої (0,0009),  $t$  – час інкубації (60 хв).

## 2.16. Електрофорез в поліакриламідному гелі

Електрофорез проводили у поліакриламідному гелі (ПААГ) у присутності додецилсульфат натрію (ДСН) за методом Лемлі [100]. Електрофорез проводили у апараті для вертикального препаративного диск-електорофорезу (BioRad) у скляних пластинах завтовшки 1 мм. У якості розділяючого гелю використовували 12% ПААГ, концентруючого – 4% ПААГ. Електродний буфер, що використовувався, містив тріс – 0,025 М, гліцин – 0,192 М та ДСН – 0,1%. Електрофорез проводили у апараті для вертикального препаративного диск-електорофорезу (BioRad) у скляних пластинах завтовшки 1 мм за сили струму 19 мА для концентруючого та 35 мА для розділяючого гелів. Гелі фарбували 0,125 % розчином кумасі G-250 у 25 % ізопропанолі та 10 % оцтовій кислоті. Відмивку від надлишкової фарби проводили використовуючи розчин 0,8 % оцтової кислоти.

Для знебарвлення гелі витримували у розчині, що містив оцтову кислоту – 0,8% впродовж однієї години при кімнатній температурі. За допомогою цифрової камери одержані гелі переводили у електронний формат. Кількісну характеристику електрофореграм проводили з використанням програмою програми TotalLab 2.01.

### **2.17. Ензим-електрофорез.**

Для ідентифікації ММП у слизовій оболонці стравоходу застосовували метод ензим-електрофорезу, який базується на проведенні вертикального електрофорезу у ПААГ, зополімеризованому з желатином у якості субстрату в концентрації 1 мг/мл [101], герметично зібрану камеру заповнювали 12% розділяючим гелем, по закінченні полімеризації якого поверх нашаровували 4% концентруючий гель. Після електрофорезу ДСН видаляли з гелю промиванням у 2,5%-му розчині тритону X-100. Потім гель залишали в 0,05М тріс-НСІ буфері рН 7.4 упродовж 12 год. Гель забарвлювали Кумасі R-250 впродовж 40 хв. та ідентифікували зони протеолітичної активності за положенням незабарвлених плям на гелі. Для ідентифікації відповідних ділянок лізису досліджуваним ММП застосовували забарвлені маркери для електрофорезу Bio-Rad Lab (США). За допомогою цифрової камери одержані ензімограми переводили у електронний формат. Обчислення електрофореграм проводили з використанням програмою програми TotalLab 2.01.

### **2.18. Хроматографія для виділення трипсино-подібних серинових протеїназ**

Виділення трипсино-подібних серинових протеїназ проводили методом афінної хроматографії використовуючи у якості сорбенту сефарозу, як описано у роботі [102].

З метою подальшого очищення серинових ферментів використовували афінну хроматографію на колонці з інсулін-сефарозою, об'ємом 3 мл. Колонку з сорбентом попередньо урівноважували 10 об'ємами 50 мМ Тріс-НСІ буферу (рН 7,4). У якості вихідного матеріалу на колонку наносили солюбілізовану мембранну фракцію клітин печінки після попереднього очищення на колонці з Сефадекс G-25.

Після нанесення білкового матеріалу колонку промивали 15 об'ємами 50 мМ Тріс-НСІ буферу (рН 7,4), таким чином позбавляючись незв'язаного матеріалу. Неспецифічно зв'язаний матеріал видаляли відмиванням 10 об'ємами 50 мМ Тріс-НСІ буферу (рН 7,4), що містив 1 М NaCl. Далі проводили елюцію білкового препарату з колонки буферним розчином наступного складу: 50 мМ ацетатний буфер (рН 5,0), що містив 1 М NaCl та 0,1 % Тритон Х-100. Білкові фракції збирали по 0,5 мл. Фракції трипсино-подібних серинових протеїназ було відібрано та об'єднано.

### **2.19. Визначення загальної протеолітичної активності, активності матриксних металопротеїназ та серинових протеїназ.**

Загальну активність протеїназ у зразках аналізували методом визначення казеїнолітичної активності з наступними модифікаціями. 30 мкл плазми та 500 мкл гомогенату стравоходу доводили 0,05 М (рН 7.4) фосфатним буфером до об'єму 1 мл [103]. Перемішували та додавали 1 мл 4% казеїну. Далі інкубували впродовж 30 хв. на водяній бані при 37<sup>0</sup>С. Реакцію зупиняли додаванням 3 мл 15% ТХО з наступним центрифугуванням при 2000 об./хв. впродовж 30 хв. Надосадову рідину відбирали визначали екстинцію при довжині хвилі 280 нм. Контрольний зразок складається з суміші казеїну, відповідного фосфатного буфера та ТХО у ідентичних співвідношеннях.

Казеїнолітичні одиниці обчислюються за формулою:

$$\frac{\text{К.о/1 мг.білка} = \Delta E_{280} * 3,27}{\text{мг білка в пробі}}$$

Для приготування 4% казеїну наважку реактиву масою 4 г розчиняли в 80 мл 0,05 М фосфатного буфера рН 7.4 і 1,6 мл 1М NaOH. Суміш залишити при кімнатній температурі на 40 хв. для набухання. Після чого кип'ятили 15 хвилин

на водяній бані. Після охолоджували, рН розчину казеїну доводили до 7,4 1 М NaOH та доводили об'єм до 100 мл фосфатним буфером.

Для селективного визначення активності матриксних металопротеїназ та серинових протеїназ до реакційної суміші додавали до кінцевої концентрації 0,2М ЕДТА або 0,2М ФМСФ, відповідно.

## 2.20. Визначення активності $\alpha_1$ -антитрипсину та $\alpha_2$ -макроглобуліну

Активність  $\alpha_1$ -антитрипсину та  $\alpha_2$ -макроглобуліну в сироватці крові визначали уніфікованим спектрофотометричним методом по гальмуванню гідролізу N-бензоїл-L-аргінін- етилового ефіру (БАЕЕ) [104].

Для визначення  $\alpha_2$ -МГ у кювету спектрофотометра вносили 1,8мл тріс-НСІ-буферу( рН 8,0), 0,1 мл розведеної 10 разів сироватки крові та 50 мкг у водному розчині об'ємом 0,05 мл. Обережно перемішували та інкубували 5хв. при кімнатній температурі. Після чого додавали 0,1 мл розчину СІТ (300мкл). Через 5 хв додають 1мл 1,5мм розчину БАЕЕ, пробу перемішують і вимірюють приріст абсорбції при 253 нм впродовж 10хв проти контрольної проби, що містить тільки реактиви. Активність  $\alpha_2$ -МГ визначають за формулою:

$$\Delta D_{253} * 2,73 = \frac{\Delta D_{253} * 2,73 * 10}{0,1 * 10}$$

де  $\Delta D_{253}$  – приріст абсорбції в пробі за 10хв. при лінійній реакції; 2,73 – розрахунковий коефіцієнт; 10 – хвилини розрахунку реакції; 0,1 – кількість сироватки; 10 – фактор розведення.

Для визначення активності  $\alpha_1$ -АТ в кюветах спектрофотометра готували дві проби – дослідну і холосту. Дослідна проба містила 1,8мл 0,05М тріс-НСІ-буфері (рН 8,0) 0,1 мл розведеної в 50 разів сироватки крові та 10 мкг трипсину у водному розчині об'ємом 0,1 мл. Холоста проба була аналогічного складу і об'єму, без вмісту сироватки. Проби витримують у кюветах спектрофотометра

впродовж 5 хв при 25°C. В кожну пробу по 1мл додавали розчину БАЕЕ; обережно перемішувати та вимірюють оптичну абсорбцію при 253нм проти холостої проби. Вимірювання проводили кожну хвилину впродовж 4-5хв. З лінійної ділянки графіка, побудованого на основі даних реакції знаходять приріст абсорбції за 1 хв для дослідної та холостої проб. Різниця між цими величинами була використана для обчислення активності  $\alpha_1$ -АТ згідно формули:

$$X \text{ (ІО/мл)} = \frac{(V_0 - V_1) * 2,73 * 50}{0,1}$$

де  $V_0$  і  $V_1$  - швидкість гідролізу N-бензоїл-L-аргінін- етилового ефіру трипсином у контрольній та дослідній пробі, відповідно, дорівнює приросту абсорбції  $\Delta D_{253}$  за 1хв; 2,73 - коефіцієнт для обчислення кількості БАЕЕ, гідролізованого за 1 хв при даних умовах (у мкмоль). отриманий з різниці абсорбції 1мМ розчину БАЕЕ, рівної 1,1 і обсягу проби 3мл (3 / 1,1); 0,1 – кількість сироватки крові, взятої для аналізу (в мл); 50 - розведення.

Активність  $\alpha_1$ -АТ і  $\alpha_2$ -МГ виражали числом умовних інгібуючих одиниць (ІО) в 1мл сироватки крові. За 1 ІО приймаємо за таку кількість сироватки крові, яка гальмувала  $\alpha_1$ -АТ або зв'язувала  $\alpha_2$ -МГ активності трипсину, так як розщеплює 1мкмоль БАЕЕ за 1хв.

## 2.21. Визначення кількості молекул середньої молекулярної маси

Вміст молекул низької та середньої молекулярної маси визначали за Габриелян [105] з модифікаціями. Метод базується на осадженні високомолекулярних пептидів і білків біологічних рідин за допомогою ТХО і кількісним визначенням середньомолекулярних пептидів. У центрифужні пробірки вносили 1 мл сироватки (клітинного лізату) та 0,5 мл розчину ТХО (100 г/л), перемішували та центрифугували впродовж 30 хв. при 3000 г.

Відбирали 0,5 мл супернатанту і переносили в пробірки з 4,5 мл дистильованої води. Абсорбцію визначали при довжині хвилі 254 нм. Вміст молекул середньої маси виражали в ум.од./мг білка. Кількість олігопептидів у складі молекул середньої маси оцінювалося за рівнем білка в супернатанті та виражали в мкг/мг білка.

## **2.22. Визначення вмісту цитокінів, матриксних металопротеїназ, імуноглобулінів класу G (IgG), тканинного інгібітора матриксних металопротеїназ та фактору росту фібробластів у сироватці крові та слизовій оболонці стравоходу**

Визначення цитокінового профілю, вмісту інсуліну та імуноглобулінів класу G (IgG) у сироватці крові щурів здійснювали за допомогою методу імуноферментного аналізу за загальною методикою для розчинних білків, який проводили у 96-лункових мікропланшетах з сорбційною здатністю для розчинних білків [106].

Сироватку попередньо розводили в десять разів 50 мМ Тріс-НСІ буфером (рН 7,4), який містив 150 мМ NaCl або білкового матеріалу слизової оболонки щурів, попередньо розведеного до концентрації білка 10 мкг/мл за допомогою 50 мМ Тріс-НСІ буфера (рН 7,4), що містив 130 мМ NaCl. Концентрацію білка визначали методом Бредфорд.

Зразки в об'ємі 100 мкл інкубували в лунках мікропланшета при 4°C впродовж ночі. Після інкубації для видалення незв'язаного матеріалу лунки промивали буфером такого складу: 50 мМ Тріс-НСІ буфер (рН 7,4) з 150 мМ NaCl та 0,05% Твін-20. Блокування неспецифічних місць зв'язування здійснювали шляхом інкубації з 5% розчином знежиреного молока при 37°C протягом 1 год. Після промивання в окремі лунки мікропланшета вносили первинні анти-інсулінові кролячі антитіла, анти-IgG мишині антитіла, анти-IFN- $\gamma$  бичачі антитіла, анти-IL-1 $\beta$  бичачі антитіла, анти-IL-4 мишині антитіла,

анти-ІЛ-10 мишині антитіла, анти-ІЛ-12 кролячі антитіла. Інкубація тривала при 37°C протягом 1 год. По закінченню часу інкубації, лунки мікропланшету промивали та вносили до них відповідні вторинні анти-кролячі, анти-мишині, анти-бичачі антитіла, кон'юговані з пероксидазою хрому та інкубували при 37°C впродовж 1 год. Візуалізацію зв'язування вторинних антитіл проводили шляхом додавання в лунки 100 мкл розчину ортофенілендіаміну (ОФД) в концентрації 0,4 мг/мл, приготованому на цитратному буфері (рН 5,0) з вмістом 0,013% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Пероксидазну реакцію зупиняли через 10 хв шляхом додавання 100 мкл 1М H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Абсорбцію вимірювали при 492 нм. Вміст інсуліну, цитокінів та IgG виражали в ум.од. у перерахунку на вміст загального білка в сироватці крові, який визначали методом Бредфорд.

## **2.23. Кількісна ЗТ-ПЛР.**

### **2.23.1. Виділення сумарної РНК з крові та тканин стравоходу щурів.**

РНК отримували за методом Chomczynski [107]. У фарфорову ступку вносили 100 мг тканини, після чого додавали невелику кількість рідкого азоту та ретельно розтирали до однорідної порошкоподібної консистенції. Після цього в ступку вносили 1 мл суміші D (гуанідин ізотіоціанат + β-меркаптоетанол + лаурилсаркозинат натрію) та перемішували. До зразка додавали 100 мкл 2 М ацетату натрію та знову перемішували, після чого додавали 1 мл фенолу. Далі додавали 200 мкл суміші хлороформ:ізопропанол та ретельно перемішували. Проби лишали на льоду на 15 хв, після чого центрифугували при 10 000 g впродовж 20 хв.

В окремі пробірки обережно відбирали супернатант, до якого додавали 1 мл ізопропанолу. Після перемішування, проби лишали на 1 год. на льоду.

Проби знов центрифугували за тих же умов, після чого супернатант декантували, а осад розчиняли у трикратному об'ємі суміші D і додавали до

нього ізопропанол. Проби лишали на 1 год. на льоду, після чого повторювали центрифугування. Супернатант зливали, а до осаду обережно додавали відповідну кількість 70% етанолу, перемішували та центрифугували впродовж 2 хв при 13000 g. Спирт зливали, осад підсушували у витяжній шафі. Сухі осад розчиняли у 100 мкл дистильованої води та вкривали 96% етанолом.

### 2.23.2. Оцінка рівня експресії генів

Синтез кДНК та кількісну полімеразану 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°C – 30 хв; ініціююча денатурація 95°C – 15 хв; далі 40 циклів: денатурація ДНК 95°C – 15 с; гібридизація праймерів 52°C – 35 с; добудова ланцюга 72° С – 30 с.; елонгація ампліфікатів 72°C – 5 хв.

У реакціях було використано такі послідовності праймерів: для *Tgfb1* – прямий - `CTTCAGCTCCACAGAGAAGAACTGC` та зворотний - `CACGATCATGTTGGACAACCTGCTCC`; *Ptgs2* – прямий - `TGCTGTTCCAACCCATGTCA` та зворотний - `TGTCAGAAACTCAGGCGTAGT`; 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 раз (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. Початкову кількість мРНК

обраховували за порівняльним СТ методом « $\Delta\Delta$ CT 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. )

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 достовірними при  $p \leq 0,05$ .

## **2.24. Статистична обробка результатів**

Статистичну обробку результатів проводили, використовуючи методи математичної статистики із застосуванням пакетів прикладних програм Statistica 6.0, Microsoft Excel 2010, та TotalLab 2.01. Достовірними вважали відмінності при  $p < 0,05$ . Для кожного отриманого результату визначали показники середнього арифметичного (M) і стандартної похибки середнього арифметичного (m) [108].

## РОЗДІЛ 3

### РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

#### **3.1 Характеристика біохімічних показників та показників антиоксидантної системи за умов лужного опіку стравоходу та за введення меланіну**

Найрозповсюдженіше хімічне пошкодження у дітей – опік стравоходу, виникає при випадковому ковтанні речовин, які мають в своєму складі луги, кислоти або інші їдкі хімічні речовини. Глибина опіку залежить від концентрації та часу контакту слизової оболонки з уражуючим агентом [109]. ЛОС у зв'язку з утворенням коагуляційного некрозу є більш небезпечним порівняно з утворенням сухого струпа, що має місце за умов кислотного опіку [110]. У дітей при хімічному опіку стравоходу частіше трапляється опіковий шок та летальні випадки [111,112]. Опікова хвороба та синдром поліорганної недостатності, до якого вона призводить, є актуальною проблемою сучасної медицини. Ушкодження нирок та легень, які найчастіше зустрічаються в структурі синдрому поліорганної недостатності, виникають внаслідок розвитку шоківих змін та дії ендогенних токсинів [113].

Процес загоєння зазвичай починається через три тижні після прийому ушкоджувального агенту. Саме в цей час (перші 3 три тижні), найвищий рівень перфорації стравоходу. Саме з цієї причини рекомендовано уникати ендоскопії між 5-ю і 15-ю добою після прийому каустичної речовини [114]. До 3-го тижня відбувається утворення нової тканини і цей процес може тривати ще кілька місяців, поки не відбудеться утворення стриктури. У процесі загоєння також знижується тиск нижнього сфінктера стравоходу, що викликає підвищену частоту та тяжкість кислотного рефлюксу, це ще більше посилює наявні ураження слизової оболонки та прискорює утворення стриктури [115].

Як відомо, хімічні опіки можуть супроводжуватись тривалими порушеннями обмінних процесів, що негативно відображається на функціонуванні різних органів та систем [116]. Одним з основних діагностичних критеріїв тяжкості при опіку є визначення біохімічних показників сироватки крові. Тому першим етапом наших досліджень, було визначити біохімічні показники в динаміці за ЛОС 2 а також оцінити вплив меланіну в дозі 0,1; 0,5 та 1мг/кг за ЛОС 2.

Основними критеріями білкового обміну є концентрація загального білка та альбуміну [116], тому для аналізу було обрано саме ці показники (табл. 3.1).

Таблиця 3.1

**Показники білкового обміну у сироватці крові щурів за умов ЛОС 2 та за введення різних доз меланіну ( $M \pm m$ ,  $n=10$  для кожної групи)**

	Контроль		ЛОС 2	ЛОС +2 меланін 0,1мг/кг	ЛОС +2 меланін 0,5мг/кг	ЛОС +2 меланін 1мг/кг
Загальний білок (г/л)	65,01±0,8	7 доба	41,2±1,0*	62,5±0,6*#	60,01±0,9*#	63,5±0,9#
		15 доба	60,5±0,7*	63,5±1,2#	64,0±0,5#	61,4±1,5*
		21 доба	67,3±0,8*	65,5±0,9	73,8±1,2*#	62,7±0,4*#
Альбумін (г/л)	37,5±2,5	7 доба	23,6±1,1*	28,86±2,3*#	33±1,1*#	29,5±1,2*#
		15 доба	29±0,7*	32,3±1,1*#	43,2±1,7*#	35,2±1,3#
		21 доба	31±0,8*	31,1±1,1*	41,5±1,5#	32,2±0,7*

\* –  $p < 0,05$  порівняно з контролем

# –  $p < 0,05$  порівняно з ЛОС 2

Концентрація загального білка знижувалась за ЛОС 2 переважно на 7 добу на 36,6%, порівняно з контрольними значеннями, що вказує на зниження синтезу білка, підвищення процесів катаболізму, зниження абсорбції протеїнів, інгібування окисного фосфорилування [118]. За умов введення меланіну за

ЛОС 2 при дозі 1 мг/кг спостерігали вищу концентрацію загального білка на 7 добу на 54,1% порівняно з показниками за ЛОС 2.

Концентрація альбуміну знижувалась за ЛОС 2 переважно на 7 та 15 доби на 37,1% та 29,3% відповідно, порівняно з контролем та поступово підвищувалась до 21 доби. При застосуванні меланіну за умов ЛОС 2 найбільш ефективними були дози 0,5 та 1 мг/кг, при яких вміст альбуміну був вище на 7 та 15 добу, при дозі 0,5 мг/кг на 40% та 49%, при дозі 1 мг/кг на 25% та 21%, відповідно, порівняно з тваринами з ЛОС 2. Відомо, що вміст альбуміну в крові тварин залежить переважно від інтенсивності його синтезу в печінці [119]. Так, гіпоальбумінемія, яку ми спостерігали свідчить про порушення білоксинтезуючої функції цього органа. За введення меланіну відзначалося підвищення концентрації загального білка та альбуміну, що може свідчити про його відновлюючу функцію на клітини печінки.

Печінка є одним із провідних органів регулювання вуглеводного та ліпідного обміну, депо глікогену. Зміна функціонального стану печінки супроводжується порушенням обміну речовин [109, 120]. Тому, для оцінки функціонального стану печінки визначали активність аспартатамінотрансферази (АсАТ) (ЕС 2.6.1.1), аланінамінотрансферази (АлАТ) (ЕС 2.6.1.2) лужної фосфатази (ЛФ) (ЕС 3.1.3.1), концентрацію холестерину та глюкози в крові (табл. 3.2).

Активність АсАТ підвищувалась за ЛОС 2 на 7 та 15 добу на 26% та 13,7% відповідно, порівняно з контрольними значеннями. Активність АлАТ підвищувалась на 7, 15 та 21 добу за ЛОС 2 на на 156%, 130% та 55% відповідно, порівняно з контролем. При дослідженні активності ЛФ спостерігали схожу картину, за умов ЛОС 2 активність даного фермента зростала на 7 добу на 45% порівняно з контрольними значеннями.

У групах ЛОС 2 які отримували меланін в дозах 0,1, 0,5 та 1 мг/кг спостерігалось зниження активності АсАТ, так при застосуванні дози 1 мг/кг показник знижувався на 15 та 21 доби експерименту на 23,3% та 29%

відповідно порівняно з щурами, яким моделювали ЛОС 2. У групах ЛОС 2, які отримували меланін в дозах 0,1, 0,5 та 1мг/кг, активність АлАТ за умов введення меланіну в дозі 1мг/кг знижувалась на 7 та 15 добу на 21,7% та 20,6% відповідно порівняно з тваринами з ЛОС 2. Активність ЛФ була нижчою за умов дози 1мг/кг на 7 добу на 26% порівняно з тваринами з ЛОС 2, що може вказувати на відновлюючі функції меланіну, щодо гепатоцитів.

Таблиця 3.2

**Показники активності печінкових ферментів у сироватці крові щурів за умов ЛОС 2 та за введення різних доз меланіну ( $M \pm m$ ,  $n=10$  для кожної групи)**

	Контроль		ЛОС 2	ЛОС +2 меланін 0,1мг/кг	ЛОС +2 меланін 0,5мг/кг	ЛОС +2 меланін 1мг/кг
АсАТ (Од/л)	55,5±1,1	7 доба	70,1±2,3*	66,6±1,0* <sup>#</sup>	62,4±1,4* <sup>#</sup>	62,3±1,4* <sup>#</sup>
		15 доба	63,1±2,0*	58,05±1,9*	58,1±1,3* <sup>#</sup>	48,4±2,0* <sup>#</sup>
		21 доба	56,3±1,2	51,8±0,7* <sup>#</sup>	56±1,5 <sup>#</sup>	39,7±2,1*
АлАТ (Од/л)	27,7±0,9	7 доба	71,1±2,2*	62,3±1,9*	52,2±1,3* <sup>#</sup>	55,7±1,0* <sup>#</sup>
		15 доба	64±2,3*	50,48±1,5*	48,2±1,5*	50,8±1*
		21 доба	43±2,0*	42,05±2,1*	46,7±1,4*	47,7±1,5* <sup>#</sup>
ЛФ (Од/л)	354,2±3,5	7 доба	513,2±4,7*	423,6±4,7* <sup>#</sup>	491,2±3,4* <sup>#</sup>	378,1±3,0* <sup>#</sup>
		15 доба	436,2±4,0* <sup>#</sup>	401,3±4,0* <sup>#</sup>	389,7±2,9* <sup>#</sup>	364,7±3,1* <sup>#</sup>
		21 доба	385,7±4,2*	396±4,1* <sup>#</sup>	347±3,1* <sup>#</sup>	368,1±3,7* <sup>#</sup>

\* –  $p < 0,05$  порівняно з контролем

<sup>#</sup> –  $p < 0,05$  порівняно з ЛОС 2

У клінічній лабораторній діагностиці велику роль відіграє визначення вмісту кінцевих продуктів обміну білка, які прийнято розглядати як систему

залишкового азоту. Сечовина є кінцевим продуктом обміну білків. У клініці показник концентрації сечовини має вирішальне значення для діагностики захворювань нирок, збільшення концентрації сечовини є ознакою ниркової недостатності, при цьому різко знижується виділення сечовини з сечею. В нормальному стані синтез креатиніну та його елімінація еквівалентні [120].

Таблиця 3.3

**Показники азотистого обміну у сироватці крові щурів за умов ЛОС 2 та за введення різних доз меланін ( $M \pm m$ ,  $n=10$  для кожної групи)**

	Контроль		ЛОС 2	ЛОС +2 меланін 0,1 мг/кг	ЛОС +2 меланін 0,5 мг/кг	ЛОС +2 меланін 1 мг/кг
Сечовина (мг/дл)	36,2±0,2	7 доба	46,4±0,4*	43,3±1,2* <sup>#</sup>	44,2±1,1*	39,2±1,3* <sup>#</sup>
		15 доба	44,9±0,5*	44,4±1,3*	42,4±0,9* <sup>#</sup>	34,2±1,1* <sup>#</sup>
		21 доба	42,1±0,8*	46,1±1,4* <sup>#</sup>	46,1±0,9* <sup>#</sup>	40,1±0,9*
Креатинін (мкмоль/л)	88±2,1	7 доба	145,0±2,1*	125,6±2,6* <sup>#</sup>	109,9±1,3* <sup>#</sup>	93,4±1,2* <sup>#</sup>
		15 доба	120,0±2,9*	98,5±1,4* <sup>#</sup>	100,0±1,7* <sup>#</sup>	94±1,3* <sup>#</sup>
		21 доба	110,0±1,9*	86,8±1,8 <sup>#</sup>	86,1±0,9 <sup>#</sup>	89,7±1,4 <sup>#</sup>

\* –  $p < 0,05$  порівняно з контролем

<sup>#</sup> –  $p < 0,05$  порівняно з ЛОС 2

Підвищення рівня креатиніну та сечовини в крові ознака ниркової недостатності. Визначення рівня креатиніну більш надійний тест, тому що, підвищення його концентрації в крові відбувається швидше ніж сечовини. Утворення креатиніну не пов'язано з метаболізмом екзогенного білка в той час коли сечовина - основна катаболічна форма білків їжі. Для визначення функціонального стану нирок досліджували показники азотистого обміну: креатинін та сечовину. За умов ЛОС 2 на 7 добу спостерігали підвищення концентрації сечовини на 28,2% та креатиніну на 65% порівняно з контролем.

При дозі меланіну 1 мг/кг концентрація сечовини була нижчою на 7 добу на 15,2% показник креатиніну на 36% порівняно з тваринами з ЛОС 2, що може свідчити про відновлення функцій нирок.

За умов опіку підвищувалась концентрація холестерину в сироватці крові і на 21 добу перевищувала контроль на 14,7%, що може вказувати на зниження активності печінкової триацилгліцеридної ліпази [121, 122]. За введення меланіну відзначалося зниження концентрації холестерину порівняно з тваринами з ЛОС 2. Можна припустити, що меланін діє, як активатор мобілізації холестерину з периферичних тканин з печінки в складі жовчних кислот. Можливо меланін діє шляхом зниження синтезу мРНК ацетил КоА карбоксилази та синтезу жирних кислот.

Таблиця 3.4

**Показники концентрації глюкози та холестерину у сироватці крові щурів за умов лужного опіку стравоходу 2 ступеня та за введення різних доз меланіну ( $M \pm m$ ,  $n=10$  для кожної групи)**

	Контроль		ЛОС 2	ЛОС +2 меланін 0,1мг/кг	ЛОС +2 меланін 0,5мг/кг	ЛОС +2 меланін 1мг/кг
Глюкоза (ммоль/л)	4,9±0,3	7 доба	6,1±0,7*	6,2±0,8*	6,1±0,8*	5,9±0,7*
		15 доба	6,2±0,6*	5,9±0,6*	5,9±0,4*	5,7±0,5*
		21 доба	5,9±0,4*	5,7±0,4*	5,9±0,6*	5,2±0,6
Холестерин (ммоль/л)	4,2±0,1	7 доба	4,4±0,1	4,4±0,2	4,0±0,2 <sup>#</sup>	4,2±0,1 <sup>#</sup>
		15 доба	4,2±0,3	4,1±0,2	4,1±0,2	4,3±0,2
		21 доба	4,6±0,2*	4,3±0,2	4,2±0,1 <sup>#</sup>	4,1±0,2 <sup>#</sup>

\* –  $p < 0,05$  порівняно з контролем

<sup>#</sup> –  $p < 0,05$  порівняно з ЛОС 2

Одним з головних учасників вуглеводного обміну є глюкоза за умов опіку спостерігалось підвищення даного показника на 7 добу, що перевищував

контрольні значення на 40,9%, що може бути пов'язано з стресовим станом та зниженням виділення інсуліну внаслідок стресу після опіку. За умов введення меланіну в дозі 1мг/кг спостерігалось зниження глюкози на 7 добу за ЛОС 2 на 16,7%, порівняно з тваринами з ЛОС 2, що може вказувати на активацію продукування інсуліну та стимулюванні периферичних тканин до використання глюкози.

Обмін електролітів важлива частина загального метаболізму, що спрямована на підтримання гомеостазу. Було визначено концентрацію основних катіонів організму - калію, натрію, кальцію та магнію; та аніонів – хлоридів та фосфатів (табл. 3.5, 3.6).

Таблиця 3.5

**Концентрація хлоридів (Cl) та фосфатів (P) у сироватці крові щурів за умов лужного опіку стравоходу 2 ступеня та за введення різних доз меланіну ( $M \pm m$ ,  $n=10$  для кожної групи)**

	Контроль		ЛОС 2	ЛОС +2 меланін 0,1мг/кг	ЛОС +2 меланін 0,5мг/кг	ЛОС +2 меланін 1мг/кг
Cl (ммоль/л)	110±1,1	7 доба	98,4±1,5*	104,6±1,1*#	105,9±1,2*#	104,8±1,5*#
		15 доба	101,8±1,3*	105,4±1,4*#	104,9±1,2*#	105,2±1,0*#
		21 доба	103,6±1,4*	106,4±1,4*	108,7±1,1#	107,2±1,3*#
P (мг/дл)	3,98±0,3	7 доба	9,3±0,4*	7,7±0,7*#	6,8±0,7*#	6,1±0,6*#
		15 доба	6,6±0,3*	7,7±0,7*#	6,8±0,7*#	6,1±0,6*#
		21 доба	5,5±0,4*	5,1±0,3*	5,2±0,4*	5,3±0,5*

\* –  $p < 0,05$  порівняно з контролем

# –  $p < 0,05$  порівняно з ЛОС 2

За нормального фізіологічного стану рівень іонів в клітині та поза її межами нерівномірний, що сприяє підтриманню трансмембранного потенціалу,

при патологіях цей баланс порушується і, як наслідок, є неспроможність клітини проводити нормальний обмін речовин [122]. За умов ЛОС 2 підвищувались концентрації К та Р, порівняно з контрольними значеннями. За ЛОС 2 концентрація К підвищувалась на 7 та 15 добу на 48% та 27,8%, порівняно з контрольними значеннями.

Концентрація Р за ЛОС 2 підвищувалась на 7, 15 та 21 добу на 133%, 65,8% та 38,2% відповідно, порівняно з контролем. За введення меланіну концентрація К була нижчою при застосуванні дози 1мг/кг на 7 добу на 23,7% порівняно з показниками у тварин з опіком.

Таблиця 3.6

**Концентрація натрію (Na), калію (K), магнію (Mg) та кальцію (Ca) у сироватці крові щурів за умов лужного опіку стравоходу 2 ступеня та за введення різних доз меланіну (M±m, n=10 для кожної групи)**

	Контроль		ЛОС 2	ЛОС 2 + меланін 0,1мг/кг	ЛОС 2 + меланін 0,5мг/кг	ЛОС 2 + меланін 1мг/кг
Na (ммоль/л)	156,2±1,1	7 доба	148,0±1,3*	150,9±1,1* <sup>#</sup>	152,8±1,5* <sup>#</sup>	149,4±1,1*
		15 доба	141,0±1,5*	149,7±1,0* <sup>#</sup>	153,1±1,5* <sup>#</sup>	150,6±1,3* <sup>#</sup>
		21 доба	150,0±1,1*	151,9±1,1*	154,0±1,5* <sup>#</sup>	152,1±1,3*
K (ммоль/л)	5,4±0,2	7 доба	8,0±0,8*	6,6±0,6*	6,7±0,9*	6,1±0,5 <sup>#</sup>
		15 доба	6,9±0,3*	5,8±0,3 <sup>#</sup>	6,1±0,4*	5,7±0,6 <sup>#</sup>
		21 доба	5,9±0,4	5,3±0,4	5,8±0,5	5,5±0,7
Mg (ммоль/л)	0,91±0,01	7 доба	0,74±0,06*	0,79±0,06*	0,81±0,05*	0,8±0,05*
		15 доба	0,8±0,05*	0,82±0,05*	0,87±0,03	0,84±0,04*
		21 доба	0,85±0,04*	0,84±0,05*	0,85±0,03*	0,87±0,03
Ca (мг/дл)	10,6±0,3	7 доба	8,6±0,6*	11,8±0,3* <sup>#</sup>	9,8±0,4* <sup>#</sup>	10,9±0,4 <sup>#</sup>
		15 доба	8,1±0,5*	9,8±0,2* <sup>#</sup>	10,5±0,6 <sup>#</sup>	9,5±0,5* <sup>#</sup>
		21 доба	7,1±0,5	11,8±0,4 <sup>#</sup>	10,4±0,5 <sup>#</sup>	10,2±0,7 <sup>#</sup>

\* – p<0,05 порівняно з контролем

# – p<0,05 порівняно з ЛОС 2

Концентрація Na та Cl, Mg та Ca незначно знижувалась за умов ЛОС 2 у всі доби експерименту. За ЛОС 2 застосовуючи меланін в дозі 1 мг/кг, концентрація Ca підвищувалась на 43% порівняно з тваринами з ЛОС 2.

Отже, було встановлено, що при ЛОС 2 у статевонезрілих щурів відбувалося порушення основних біохімічних показників та водно-електролітного балансу. Досліджені біохімічні показники сироватки крові за умов застосування меланіну свідчать про коригуючий вплив меланіну на деструктивні зміни тканин печінки та відновлення синтетичної функції даного органу у щурів з ЛОС 2, відновлення функцій нирок, в той час як показники електролітного балансу є різноспрямованими [123].

З трьох досліджуваних доз меланіну, найбільш ефективною виявилася доза 1 мг/кг. Саме тому, в подальших етапах нашої роботи було вирішено зупинитися на дозі меланіну 1 мг/кг. В зв'язку з цим всі подальші дослідження представлятимуться тільки з дозою меланіну 1 мг/кг.

Наступним етапом для підтвердження ступеня опіку а також для оцінки впливу меланіну щодо загоєння після опіку стравоходу було проведено гістологічне дослідження.

Після моделювання ЛОС 2 у відповідній групі (рис. 1 А) спостерігалися ураження слизової оболонки (епітелію, власної пластинки) та м'язової оболонки стравоходу щурів, запалення, що проявлялось у збільшенні інфільтрації лейкоцитами на 1 добу досліджень, порівняно з контрольними щурами (рис. 1 Д). При дослідженні гістологічних зразків на 7 добу у групах з ЛОС 2 (рис. 1 Б) виявили продовження запального процесу та присутність інфільтрації лейкоцитами, окрім цього відбувалося патологічне приростання серозної оболонки стравоходу до тканин трахеї. За введення меланіну (рис. 1 Е) було помітне зниження інфільтрації лейкоцитами всіх 3-х оболонок стравоходу та як наслідок нижчий рівень запалення порівняно з показниками у тварин з ЛОС 2.

На 15 добу за ЛОС 2 (рис. 1 В) зафіксували зниження загальної лейкоцитарної інфільтрації, а за умов введення меланіну присутність лейкоцитів було повністю знівельована (рис. 1 Є). Також, за ЛОС 2 на 15 добу (рис. 1 В) спостерігали хаотичне укладання і збільшення волокон колагену в підслизовій основі стравоходу, що може бути передумовою патологічного процесу загоєння та початковою фазою розвитку фіброзу, причому при застосуванні меланіну (рис. 1 Є) відмічали подібне депонування колагенових волокон в меншій мірі.

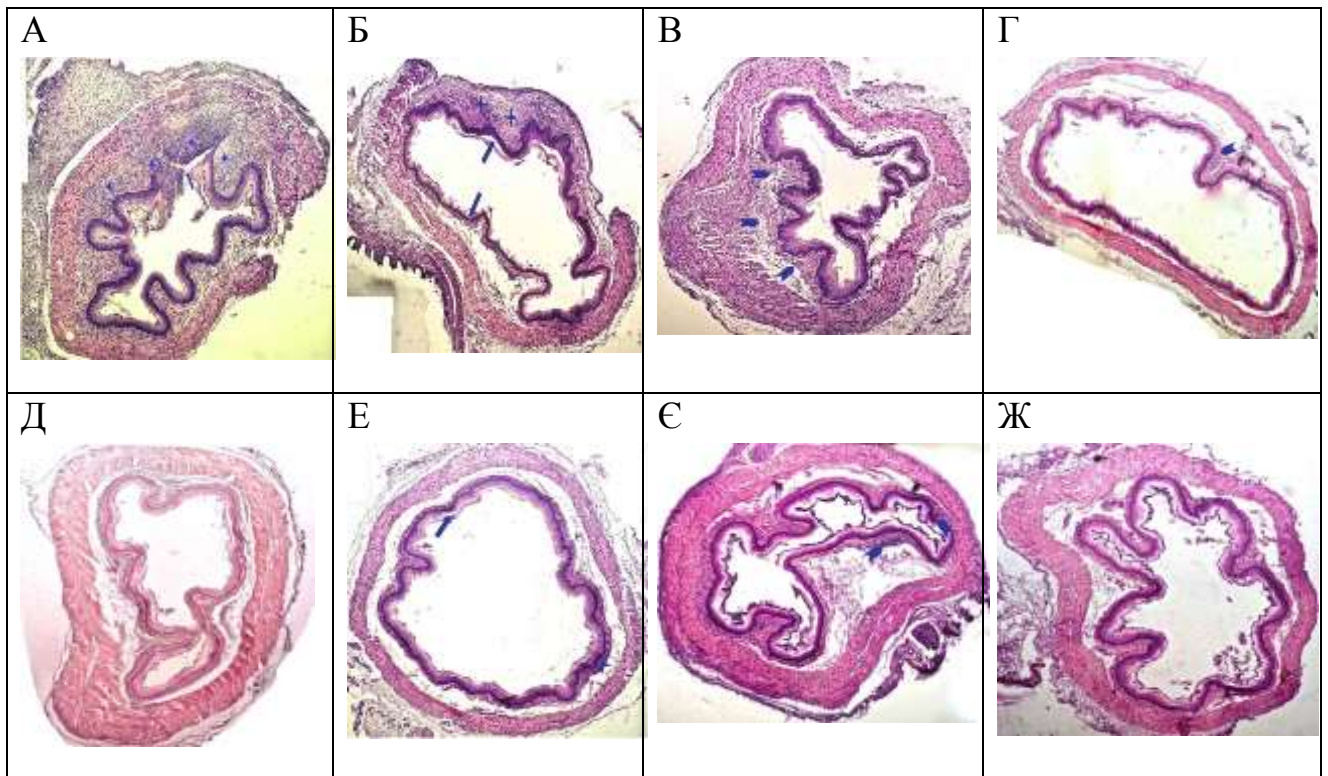


Рис. 3.1. Мікрофотографія тканин стравоходу контрольних щурів, щурів з ЛОС 2 та за умов застосування меланіну. А – ЛОС 1 доба; Б – ЛОС 7 доба; В – ЛОС 15 доба; Г – ЛОС 21 доба; Д – контроль; Е – ЛОС 7 доба + меланін; Є – ЛОС 15 доба + меланін; Ж – ЛОС 21 доба + меланін. Забарвлення гематоксилін-еозином, ок. X 10, об. X 10. Позначення: зірочки – інфільтрація лейкоцитами, стрілочки – порушення епітелію слизової оболонки, маркер – розростання сполучної тканини.

На 21 добу досліджень, за ЛОС 2 (рис. 1 Г) було відзначено відновлення цілісності епітелію слизової оболонки, залишкову інфільтрацію лейкоцитами та збільшення шару підслизової оболонки, яке відбувається за рахунок патологічного розростання екстрацелюлярного матриксу, тобто варто зазначити, що повноцінної регенерації стравоходу не відбувалось. У групах з ЛОС 2 при застосуванні меланіну (рис. 1 Ж) відбувалося майже повне відновлення уражених тканин з незначним розростанням сполучної тканини в підслизовій основі.

Ступінь тяжкості патологічних реакцій з боку різних органів, а також результат захворювання залежать від тяжкості опікової травми, віку дитини, своєчасності та правильності проведеного лікування потерпілого [110]. Велика кількість нейтрофілів, що надходить до опікової рани починають продукувати велику кількість активного кисню який на фоні зниження активності антиоксидантних ферментів починає пошкоджувати мембрани клітин, це може уповільнювати процес загоєння. Меланін як потужний антиоксидант здатний нейтралізувати активні форми кисню і таким чином рана може загоїтися швидше та з меншими ускладненнями.

Істотне значення має і надмірна активація процесів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ). В результаті зростання активності вільнорадикальних процесів і ослаблення антиоксидантного захисту (АОЗ) токсичні продукти накопичуються, обумовлюючи серйозні метаболічні порушення, що призводить до формування оксидативного стресу [124].

Відомо, що активація ПОЛ може призвести до оксидативного пошкодження мембран, пригнічення каталітичної активності ферментів та інших шкідливих ефектів, які порушують життєві функції клітин [125, 126]. За опіків відбувається порушення гомеостазу між активними формами кисню та антиоксидантними системами захисту в організмі [127]. Антиоксидантна активність фенольних сполук опосередкована різними механізмами дії: пригнічення утворення активних форм кисню, здатність нейтралізувати

молекули синглетного кисню, зв'язувати іони металів які є каталізаторами реакцій, що призводять до утворення активних форм кисню, перериваючи каскад реакцій вільних радикалів у процесі перекисного окиснення ліпідів [128,129].

Процес радикального окиснення пов'язаний з обміном білків, ліпідів, нуклеїнових кислот, простагландинів та ін. За виснаження антиоксидантної системи, процес перекисного окиснення стає основним обтяжливим фактором у патогенезі ряду захворювань.

Тому наступним етапом наших досліджень було визначити інтенсивність ПОЛ, для цього визначали рівень первинних продуктів ПОЛ - дієнових кон'югатів (ДК) та вторинних – ТБК-активних продуктів в сироватці крові і гомогенаті стравоходу (табл. 3.7, 3.8). Так, за умов ЛОС 2 концентрація ТБК-активних речовин в сироватці крові щурів впродовж всього експерименту була достовірно підвищена, на 21 добу концентрація підвищувалась в 1,4 раза за ЛОС 2 порівняно з контрольними значенням.

Схожі результати були отримані в тканинах стравоходу, де концентрація ТБК-активних речовин за ЛОС 2 була високою на 7 та 15 добу експерименту, а на 21 добу спостерігалось зниження концентрації та наближення до контрольних значень, так на 7 добу вміст підвищувався в 3 раза за ЛОС 2 порівняно з контрольними значенням. За введення меланіну спостерігалася тенденція до зниження вмісту ТБК-активних речовин як в сироватці, на 15 добу за ЛОС 2 1,5 раза так і в тканинах стравоходу на 7 добу показник був нижчим в 3 раза порівняно з показниками у тварин з ЛОС 2.

Таблиця 3.7

**Концентрація ТБК-активних речовин (нмоль/мг білка) в тканинах стравоходу (А) та в сироватці крові щурів (В) за умов ЛОС 2 та за введення меланіну в дозі 1мг/кг ( $M \pm m$ ,  $n=10$  для кожної групи)**

	контроль		7 доба	15 доба	21 доба
сироватка	35,1±1,1	ЛОС 2	45,7±1,8*	54±2,3*	49±2,1*
		ЛОС 2 + меланін	31,5±1,9#	36,6±1,5#	40,3±2,5*#
слизова оболонка стравоходу	203,6±4,0	ЛОС 2	619,3±5,9*	469,4±7,1*	255,5±6,5*
		ЛОС 2 + меланін	243,2±6,1*#	273,8±5,5*#	203,7±4,5#

\* –  $p < 0,05$  порівняно з контролем

# –  $p < 0,05$  порівняно з групою ЛОС 2

Посилення процесів вільнорадикального окиснення у мембранах клітин слизової приводить до пошкодження їх структури. Оскільки структурною основою клітинних мембран є ліпідний бішар, ПОЛ, опосередковане вільними радикалами, є однією з важливих причин деструкції мембрани клітин і подальшого їх ушкодження. Деградація ліпідів мембрани веде до зростання текучості мембрани клітини й збільшує її проникність до іонів, що порушує клітинний гомеостаз у цілому [130]. Продукти ПОЛ (4-гідроксиалкенили, малоновий діальдегід та ін.) є мутагенними та цитотоксичними. У процесі ПОЛ вільні радикали ушкоджують основні біологічні молекули (нуклеїнові кислоти, білки, ліпіди, вуглеводи) [131].

При дослідженні вмісту дієнових кон'югатів у сироватці крові спостерігалось підвищення даного показника за умов ЛОС 2 на 21 добу значення перевищували контрольні в 6,5 раза (табл. 3.8).

Таблиця 3.8

**Вміст дієнових кон'югатів (ДК) мкМоль/мг в тканинах стравоходу та в сироватці крові щурів за умов ЛОС 2 та за введення меланіну в дозі 1мг/кг (M±m, n=10 для кожної групи)**

	контроль		7 доба	15 доба	21 доба
сироватка	32,3±1,1	ЛОС 2	111,8±5,1*	157,3±5,6*	211,8±6,7*
		ЛОС 2 + меланін	102,7±6,2*	89,1±4,5*#	80±2,5*#
слизова оболонка стравоходу	19,5±1,4	ЛОС 2	90,1±5,9*	113±7,3*	134,5±6,0*
		ЛОС 2 + меланін	59,3±4,0*#	48,2±5,8*#	23,2±3,5#

\* –  $p < 0,05$  порівняно з контролем

# –  $p < 0,05$  порівняно з групою ЛОС 2

В тканинах стравоходу концентрація ДК підвищувалася за ЛОС 2 на всі доби експерименту, максимальні значення спостерігалися на 21 добу експерименту де показник перевищував контрольні значення за ЛОС 2 в 6,9 раза. За умов введення меланіну концентрація ДК була нижчою як в сироватці крові так і в тканинах стравоходу порівняно з даними при опіку. В сироватці крові вміст ДК був нижчим на 21 добу в 2,6 раза за ЛОС 2, в тканинах стравоходу вміст ДК знижувався на 21 добу 5,8 раза порівняно з даними при опіку.

Вільнорадикальні процеси, у нормі, відіграють важливу роль у функціонуванні біологічних систем, беруть участь у складному комплексі реакцій регулювання клітинного метаболізму. Поряд з цим, вільнорадикальні реакції є універсальним механізмом ушкодження клітин за дії різних чинників [132]. Надмірна їх активація відіграє ключову роль в ушкодженні клітин, може стимулювати їх проліферацію. Накопичення в організмі продуктів ПОЛ і високотоксичних супероксид аніон-радикалів призводить до значних порушень в організмі та посилення ендотоксикозу.

Опікова хвороба збільшує утворення АФК, що призводить до пошкодження тканин. При цьому може розвиватися дисбаланс між інтенсивністю вільно-радикальних процесів і рівнем активності антиоксидантної системи (АОС), внаслідок чого посилюється окиснення біомолекул [133]. Порушення нормального перебігу окислювальних процесів, що лежать в основі метаболізму всіх клітин і визначають адаптивну спроможність організму до дії ушкоджуючих факторів, призводить до формування оксидативного стресу [134].

Для оцінки вільнорадикальних процесів у тканинах стравоходу, а також в сироватці крові щурів, досліджували такі ферментні компоненти АОС як активність каталази (ЕС 1.11.1.6) та супероксиддисмутази (СОД) (ЕС 1.15.1.1).

СОД – ензим групи антиоксидантних ферментів, що захищає організм від високотоксичних кисневих радикалів. СОД каталізує дисмутацію супероксиду, в кисень і перекис водню. Пригнічення активності СОД призводить до нагромадження супероксид-аніон-радикалу, який ініціює ланцюг вільнорадикальних реакцій у клітині [135].

У сироватці крові активність СОД знижувалась на 7 та 15 добу, так на 15 добу на 45% за ЛОС 2, порівняно з контрольними значеннями. В тканинах стравоходу спостерігалась дещо інша картина, за умов опіку на 7 добу експерименту відзначалося підвищення активності СОД у тканинах стравоходу, що може пояснюватися компенсаторною відповіддю організму на утворення надмірної кількості АФК, на 15 та 21 добу спостерігалось зниження активності СОД, так на 21 добу на 48% за ЛОС 2, порівняно з контрольними значеннями. За введення меланіну спостерігалось підвищення активності СОД, але дані все одно залишалися нижче, ніж у контрольних тварин. За введення меланіну у сироватці крові активність СОД підвищувалась на 12% порівняно з даними при ЛОС 2. У слизовій оболонці стравоходу активність СОД підвищувалась на 21 добу на 13% порівняно з даними при ЛОС 2 (табл 3.9).

Таблиця 3.9

**Активність СОД (УО/(мг білка\*хв)) в тканинах стравоходу та у сироватці крові щурів за умов ЛОС 2 та за введення меланіну в дозі 1мг/кг (M±m, n=10 для кожної групи)**

	контроль		7 доба	15 доба	21 доба
сироватка	0,3±0,02	ЛОС 2	0,17±0,02*	0,16±0,02*	0,24±0,02*
		ЛОС 2 + меланін	0,25±0,01*#	0,26±0,02#	0,28±0,02
слизова оболонка стравоходу	4,8±0,3	ЛОС 2	5,2±0,3	3,2±0,1*	2,5±0,2*
		ЛОС 2 + меланін	2,8±0,1*#	2,9±0,2*	3,2±0,2*#

\* – p<0,05 порівняно з контролем

# – p<0,05 порівняно з групою ЛОС 2

Каталаза – ензим класу оксидоредуктаз, виявлений у тканинах майже всіх еукаріотичних організмів, здійснює реакцію відновлення пероксиду водню до води і кисню з використанням різних донорів протонів. Активність каталази зростала впродовж всього експерименту за умов опіку стравоходу, в сироватці крові найвищі показники були на 15 добу, що перевищували контрольні значення за ЛОС 2 в 2,5 раза. У тканинах стравоходу найбільш висока активність каталази була на 7 добу, що перевищувала контроль в 6 раз за ЛОС 2. При застосуванні меланіну спостерігалось нижча активність каталази в тканинах стравоходу на 15 добу за ЛОС 2 в 1,6 раза порівняно з даними за ЛОС 2 (табл. 3.10)

Таким чином, при опіку стравоходу другого ступеня на фоні підвищеної активності процесів ПОЛ (ДК, ТБК-активні речовини) відзначалося значне пригнічення механізмів антиоксидантного захисту (активність СОД). За умов опікової хвороби розвивається порушення балансу між дією прооксидантно факторів і антиоксидантною системою за рахунок активації вільнорадикальних процесів.

Таблиця 3.10

**Активність каталази (нмоль/хв\*мг білка) в тканинах стравоходу та в сироватці крові щурів за умов ЛОС 2 та за введення меланіну в дозі 1мг/кг (M±m, n=10 для кожної групи)**

	контроль		7 доба	15 доба	21 доба
сироватка	0,31±0,02	ЛОС 2	0,6±0,05*	0,8±0,03*	0,7±0,04*
		ЛОС 2 + меланін	0,8±0,06*#	0,7±0,03*#	0,7±0,04*
слизова оболонка стравоходу	1,1±0,2	ЛОС 2	6,6±0,5*	5,2±0,4*	2,6±0,5*
		ЛОС 2 + меланін	3,2±0,5*#	3,2±0,4*#	2,1±0,3*

\* – p<0,05 порівняно з контролем

# – p<0,05 порівняно з групою ЛОС 2

Опік не тільки підвищує синтез активних форм кисню, але також погіршує антиоксидантні механізми захисту, що робить пацієнтів з опіками більш сприйнятливими до ROS-опосередкованої ушкоджень клітинної ДНК та білків [136, 137]. Оксид азоту (NO) - це міжклітинна сигнальна молекула, що активно бере участь у процесах загоєння. Антиоксидантний ефект біодоступного NO відбувається завдяки витісненню супероксиду, який є основним компонентом окисного стресу. NO також сприятливо впливає на ангіогенез, запалення, реконструкцію тканин [138].

Фізіологічне вивільнення NO з епітеліальних і нейрональних клітин регулює кровоплин, моторику та секрецію [139] різних відділів шлунково-кишкового тракту. Ендогенний NO утворюється у клітинах з L-аргініну [140]. Це складна окиснювальна реакція, яку каталізує фермент синтаза оксиду азоту (NOS) (EC 1.14.13.39). В результаті молекулярний кисень приєднується до кінцевого атому азоту в гуанідиновій групі L-аргініну. Окрім молекулярного кисню для синтезу NO необхідним є нікотинамідаденіндинуклеотид (НАДФ), а також рекордна кількість різноманітних кофакторів: флавінмононуклеотид

(ФМН), флавінаденіндинуклеотид (ФАД), гем та кальцій-кальмодулін [141]. NOS існує в трьох ізоформах: конститутивних (NOS I та NOS III) та індукцибельній (NOS II).

NOS I, вона є ж і нейрональною (nNOS), експресується в нейронах центральної та периферійної нервової системи, тромбоцитах, мозковому шарі наднирників, скелетних м'язах та ін. [142]. NOS III - ендотеліальна NOS (eNOS), міститься у великій кількості в ендотелії, у тому числі ендотелії судин мікроциркуляторного русла ШКТ [143]. Результати чисельних досліджень довели, що функціонування конститутивних форм (cNOS) є кальційзалежним процесом. cNOS постійно знаходиться в цитоплазмі і її активність залежить від концентрації кальцію та кальмодуліну. Інактивація ферменту відбувається при низьких концентраціях вільного кальцію. Він максимально активний при концентрації кальцію близько 1 мМ. Утворений NO діє як трансмітер у різноманітних фізіологічних відповідях, тобто він виконує регуляторну роль [144]. В той час як, NOS II, індукцибельна NOS (iNOS) або макрофагальна (mNOS), є кальцій незалежною і індукується внаслідок патогенного впливу макрофагами, цитокінами [145].

Тому, нами було визначено активність eNOS та iNOS в сироватці крові та тканинах слизової оболонки стравоходу за умов ЛОС 2 та при застосуванні меланіну. Активність eNOS в сироватці крові за умов ЛОС 2 поступово підвищувалась на 7 та 15 добу на 19,6% та 55,1% відповідно, порівняно з контролем та знижувалась на 21 добу та наближалась до контрольних значень. В тканинах стравоходу відмічено схожу тенденцію до зростання активності ферменту на 7 та 15 добу на 35,4% та 60% відповідно, порівняно з контрольними значеннями. Активність iNOS в сироватці крові за умов опіку достовірно підвищувалась на 7, 15 та 21 добу на 24,6%, 43,9% та 20,5% відповідно, порівняно з контрольними значеннями. В тканинах стравоходу активність ферменту за ЛОС 2 також зростала на 7, 15 та 21 добу на 63,6%, 69,6% та 51% відповідно, порівняно з контрольними значеннями.

Таблиця 3.11

**Активність eNOS та iNOS (ум.о/мг білка\*хв) у сироватці крові щурів за умов ЛОС 2 та за застосування меланіну (M±m, n=10 для кожної групи)**

	контроль		7 доба	15 доба	21 доба
eNOS	0,57±0,01	ЛОС 2	0,67±0,02*	0,92±0,05*	0,62±0,05
		ЛОС 2 + меланін	0,61±0,04	0,81±0,02*#	0,71±0,05*
iNOS	0,65±0,03	ЛОС 2	0,81±0,03*	0,95±0,06*	0,88±0,04*
		ЛОС 2 + меланін	0,63±0,03#	0,74±0,03*#	0,76±0,04*#

\* – p<0,05 порівняно з контролем

# – p<0,05 порівняно з групою ЛОС 2

За введення меланіну активність eNOS в сироватці крові за умов опіку була нижчою порівняно з показниками у тварин з ЛОС 2. Визначено незначне зниження активності eNOS в тканинах стравоходу за ЛОС 2 за умов введення на 7 та 15 добу, на 21 добу активність підвищувалась на 18,3% порівняно з показниками за ЛОС 2.

Встановлено, що активність iNOS в сироватці крові за ЛОС 2 за умов введення меланіну була нижчою на 7,15 та 21 добу на 22,2%, 22,1% та 13,6% відповідно, порівняно з показниками за ЛОС 2. В тканинах стравоходу спостерігали нижча активність ферменту на всі досліджувані доби експерименту, так на 7,15 та 21 добу активність ферменту була нижчою на 28,5%, 29,5% та 27,9% відповідно, порівняно з показниками при опіку стравоходу.

Таблиця 3.12

**Активність eNOS та iNOS (ум.о/мг білка\*хв) у слизовій оболонці стравоходу щурів за умов лужного опіку стравоходу другого ступеня та за застосування меланіну (M±m, n=10 для кожної групи)**

	контроль		7 доба	15 доба	21 доба
eNOS	0,94±0,02	ЛОС 2	1,3±0,05*	1,44±0,08*	1,02±0,09
		ЛОС 2 + меланін	1,24±0,04	1,36±0,07*	0,71±0,05*#
iNOS	0,88±0,04	ЛОС 2	1,44±0,05*	1,56±0,09*	1,5±0,07*
		ЛОС 2 + меланін	1,03±0,06*#	1,1±0,05*#	0,98±0,06#

\* – p<0,05 порівняно з контролем

# – p<0,05 порівняно з групою ЛОС 2

Таким чином, за лужного опіку стравоходу спостерігалось підвищення активності обох ізоформ NOS, що може впливати негативно на процеси загоєння при опіку стравоходу, адже у високих концентраціях NO може надавати на клітини токсичний ефект, пов'язаний з утворенням сильного окислювача - пероксинітриа (ONOO-), який чинить негативний вплив на тканини порушуючи структуру клітинних мембран а також порушуючи енергетичний обмін в клітині а також синтез ДНК [144]. За застосування меланіну активність eNOS та iNOS знижувалась переважно на всі досліджувані доби експеримента, і як наслідок знижувалось утворення надмірної кількості пероксинітриту.

При дослідженні АОС, було показано, що за умов ЛОС 2 відбувалося порушення прооксидантного-антиоксидантного балансу. За введення меланіну знижувалось утворення продуктів перекисного окиснення ліпідів та поліпшувався прооксидантний- антиоксидантний баланс, а отже і відбувалося швидше загоєння після опіку.

### **3.2 Імунологічні показники за умов лужного опіку стравоходу та за введення меланіну**

За лужного опіку стравоходу відбувається утворення активних форм кисню, що було описано вище, вільні радикали спричиняють активацію транскрипційних факторів AP-1 та NF- $\kappa$ B, ці фактори регулюють секрецію сигнальних молекул таких як цитокіни, хемокіни та фактори росту.

На опікову травму, організм відповідає неспецифічною запальною реакцією, яка проявляється викидом цитокінів [146, 147]. Вираженість цієї реакції залежить від площі та глибини ураження, характеру інфекційного агента та активності імунної відповіді постраждалого організму.

В період ранньої і пізньої токсемії, знижується активність транспорту кисню до тканин. Тяжка і тривала гіпоксія тканин активує ендотеліальні клітини, котрі активують медіатори запалення та мітогенні молекули. Медіатори запалення індукують адгезію нейтрофільних гранулоцитів, і непрямим шляхом, ініціюють проліферацію гладком'язових клітин. Під час процесу адгезії лейкоцити активуються і вивільняють вільні радикали та протеази, які пошкоджують біологічні молекули [148].

Цитокіни впливають практично на всі клітини, що беруть участь у розвитку запалення, включаючи гранулоцити, макрофаги, фібробласти, клітини ендотелію й епітелію, Т- і В-лімфоцити [149]. При опіковій травмі значення цитокінів важко переоцінити на місцевому і системному рівнях. При тяжкому запаленні цитокіни потрапляють в кров, що призводить до гострої відповіді на рівні всього організму.

У даний час лікування хворих з хімічним опіком стравоходу представляє певні труднощі. До того ж, більшість досліджень проводиться саме в крові, а досліджень в тканинах проведено значно менше, в зв'язку з тим, що кров є більш зручним об'єктом дослідження ніж тканини. За опіків імунна недостатність знижує ефективність проведеної терапії, активує умовно-патогенні мікроорганізми, наслідком чого є затяжний перебіг опікової хвороби і

розвиток ускладнень. У зв'язку з цим, відновлення функціонального стану імунної системи є невід'ємною частиною комплексної терапії при опіку. Можливість регулювати взаємодії імунних клітин є пріоритетним напрямком лікування ХОС [150]. Тому, наступним етапом наших досліджень було дослідити стан імунологічних показників за ЛОС а також визначити вплив меланіну на дані показники.

Нами були досліджені прозапальні інтерлейкіни в сироватці крові та тканинах слизової оболонки стравоходу, до яких відносяться ІЛ-1 $\beta$ , ІЛ-12, ІФ- $\gamma$ , ІЛ-6, фактор некрозу пухлини альфа (ТНФ- $\alpha$ ). Вони стимулюють проліферацію Т- і В-лімфоцитів, продукцію антитіл, посилюють синтез адгезивних молекул, активують синтез білків гострої фази, беруть участь у реалізації як специфічного, так і неспецифічного імунітету [151].

Було встановлено достовірне підвищення прозапальних цитокінів переважно на 7 добу експерименту, що є відображенням активності і тяжкості патологічного процесу. В подальші терміни дослідження динаміка змін рівня цитокінів мала різнонаправлений характер. За введення меланіну відбувалось зниження рівнів прозапальних цитокінів порівняно з групою тварин, які не отримували меланін переважно на 7 добу експерименту, але залишались вище контрольних значень. В подальші терміни дослідження динаміка змін рівнів прозапальних цитокінів мала різнонаправлений характер.

ІЛ-1 $\beta$ , є одним з ключових цитокінів, який характеризує рановий процес. Дослідження ІЛ-1 $\beta$  у сироватці крові показало підвищення рівню цитокіну, в порівнянні з інтактними тваринами. Отримані дані узгоджуються з літературними, та свідчать про активацію запального процесу у щурів опіком, який характеризується тривалим підвищенням вмісту ІЛ-1 $\beta$  [152]. Також відомо, що невід'ємною складовою частиною біологічної дії ІЛ-1 є його стимулюючий вплив на метаболізм сполучної тканини. Він стимулює проліферацію фібробластів і збільшує продукцію ними простагландинів, ростових факторів і ряду цитокінів. Під впливом ІЛ-1 клітини сполучної

тканини збільшують синтез колагену, а також інших ферментів. Однак, підсумком репарації можуть бути гіпертрофічні або келоїдні рубці, формування яких, пов'язане з підвищенням утворенням гранульованої тканини, посилюється під впливом високих концентрацій ІЛ-1b [153].

ІФ- $\gamma$  і ТНФ- $\alpha$  має виражену імуномодулюючу дію, є індуктором клітинної ланки імунітету і відноситься до основних прозапальних цитокінів. Було досліджено, що в умовах ЛОС 2 відбувалось підвищення рівню ІФ- $\gamma$  в сироватці крові на 7 добу експерименту на 18% порівняно з контролем (рис. 3.2). В тканинах стравоходу рівень дослідженого інтерлейкіну мав незначне підвищення. При застосуванні меланіну не спостерігалось достовірного зниження в сироватці крові, в той час як в тканинах стравоходу вміст ІФ- $\gamma$  знижувався на 20% порівняно з групою тварин, які не отримували меланін (рис. 3.2).

Вважаємо, що одним з механізмів підвищення концентрації ІФ- $\gamma$  в сироватці є відновлення кількості і функціональної активності Т-лімфоцитів, в тому числі CD4 +, що беруть участь в продукції цього цитокіну. Втім, не можна виключити роль інших чинників: зміна рівня ендогенної інтоксикації, функціональної активності ендотеліоцитів.

Основними продуцентами ІЛ-12 є моноцити, макрофаги, нейтрофіли, активовані лімфоцити. Індукторами синтезу цитокіну служать мікробні компоненти і продукти. Було показано, що ІЛ-12 є ключовим цитокіном для посилення імунної відповіді та ініціації протиінфекційного захисту. Основними клітинами-мішенями ІЛ-12 є природні кілери і Т-лімфоцити. Цитокін активує диференціювання Т-лімфоцитів, підвищує їх цитотоксичну активність [147].

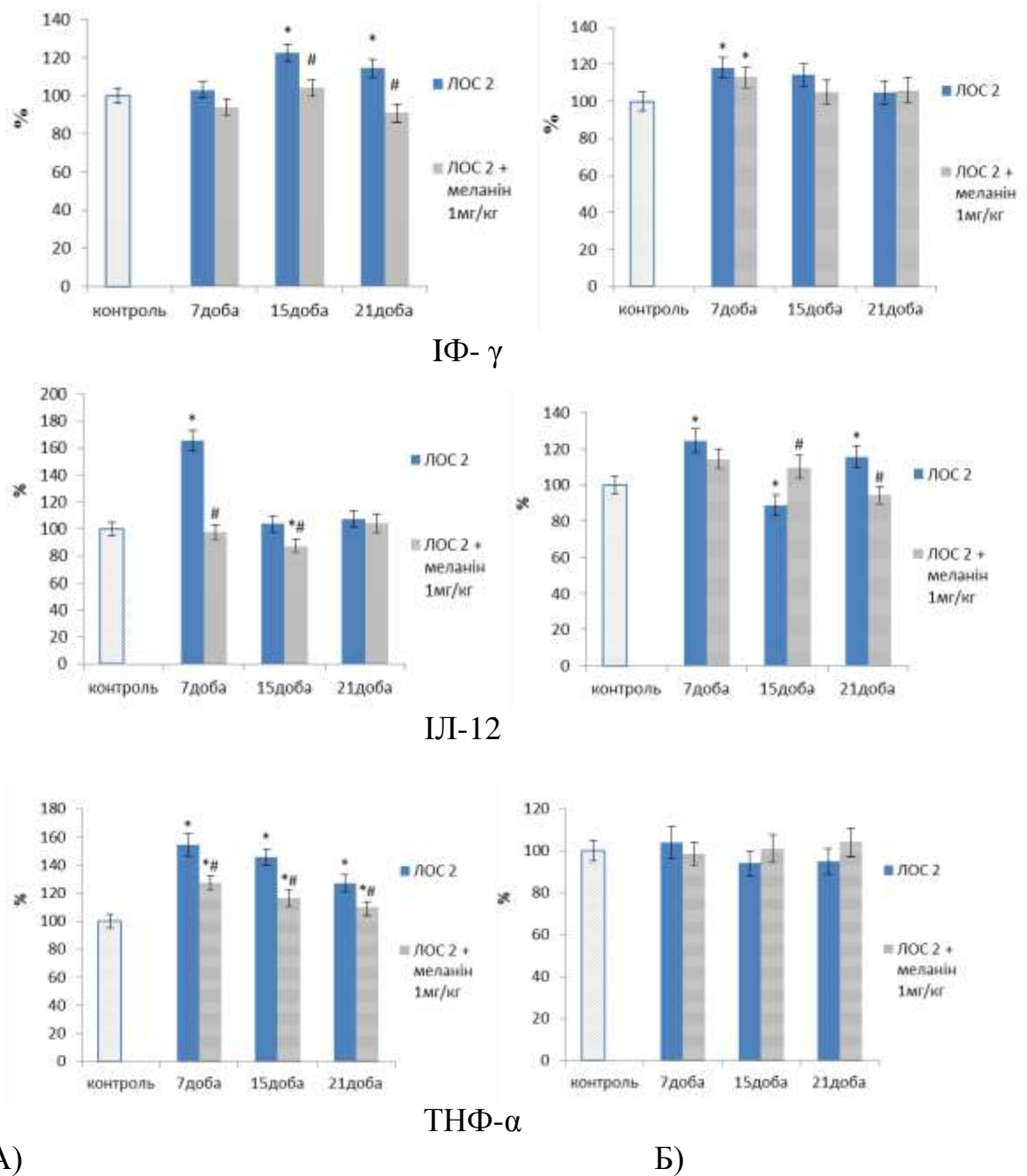


Рис. 3.2 Рівень прозапальних цитокінів (IF- $\gamma$ , IL-12, TNF- $\alpha$ ) у слизовій оболонці стравоходу (А) та сироватці крові (Б) щурів за умов ЛОС 2 та за введення меланіну в дозі 1 мг/кг, ( $M \pm m$ ,  $n=10$  для кожної групи), \* –  $p < 0,05$  порівняно з контролем; # –  $p < 0,05$  порівняно з групою ЛОС 2

Рівень IL-1 $\beta$  в сироватці крові при моделюванні ЛОС 2 зростав на 7 та 15 добу на 18,2% та 25% порівняно з контрольними значеннями. В тканинах

стравоходу рівень ІЛ-1 $\beta$  підвищувався на 7 добу на 30,4% та знижувався на 15 та 21 добу порівняно з контролем (рис. 3.3).

За умов введення меланіну значення ІЛ-1 $\beta$  в сироватці крові при моделюванні ЛОС 2 були нижчими порівняно з групою тварин, які не отримували меланін, але були вищі контрольних значень. Так, на 7 та 15 доби рівень цитокіну знижувався в сироватці крові на 12,5% та 14,5% відповідно, порівняно з групою ЛОС 2. В тканинах стравоходу концентрація ІЛ-1 $\beta$  за введення меланіну не зазнавала достовірних змін (рис. 3.3).

У розвитку запального процесу важливу функцію виконує фактор некрозу пухлини- $\alpha$  (ТНФ- $\alpha$ ), він стимулює проліферацію Т- і В-лімфоцитів, продукцію антитіл, підсилює синтез адгезивних молекул, активує синтез білків гострої фази, бере участь в реалізації як специфічного, так і неспецифічного імунітету [154]. Рівень ТНФ- $\alpha$  при моделюванні ЛОС 2 на 7, 15 та 21 добу не зазнавав достовірних змін в сироватці крові, порівняно з контрольними значеннями. За умов введення меланіну рівень ТНФ- $\alpha$  носив різнонаправлений характер.

Деякі дослідники включають в критерії несприятливого результату при сепсисі і підвищення концентрації ІЛ-6 [147,155]. В ході наших досліджень було показано підвищення рівню ІЛ-6, за умов ЛОС 2. За введення меланіну, спостерігали зниження рівню цитокіну, порівняно з групою ЛОС 2. Дане спостереження може свідчити про те, що введення меланіну знижує ризик септичних ускладнень [156]. Встановлено, що одним з факторів підвищення ІЛ-6 при опіковій травмі є зниження концентрації ІЛ-4 (негативна достовірна кореляція), тому рівень ІЛ-4 також розглядається, як прогностичний фактор виникнення ускладнень [155].

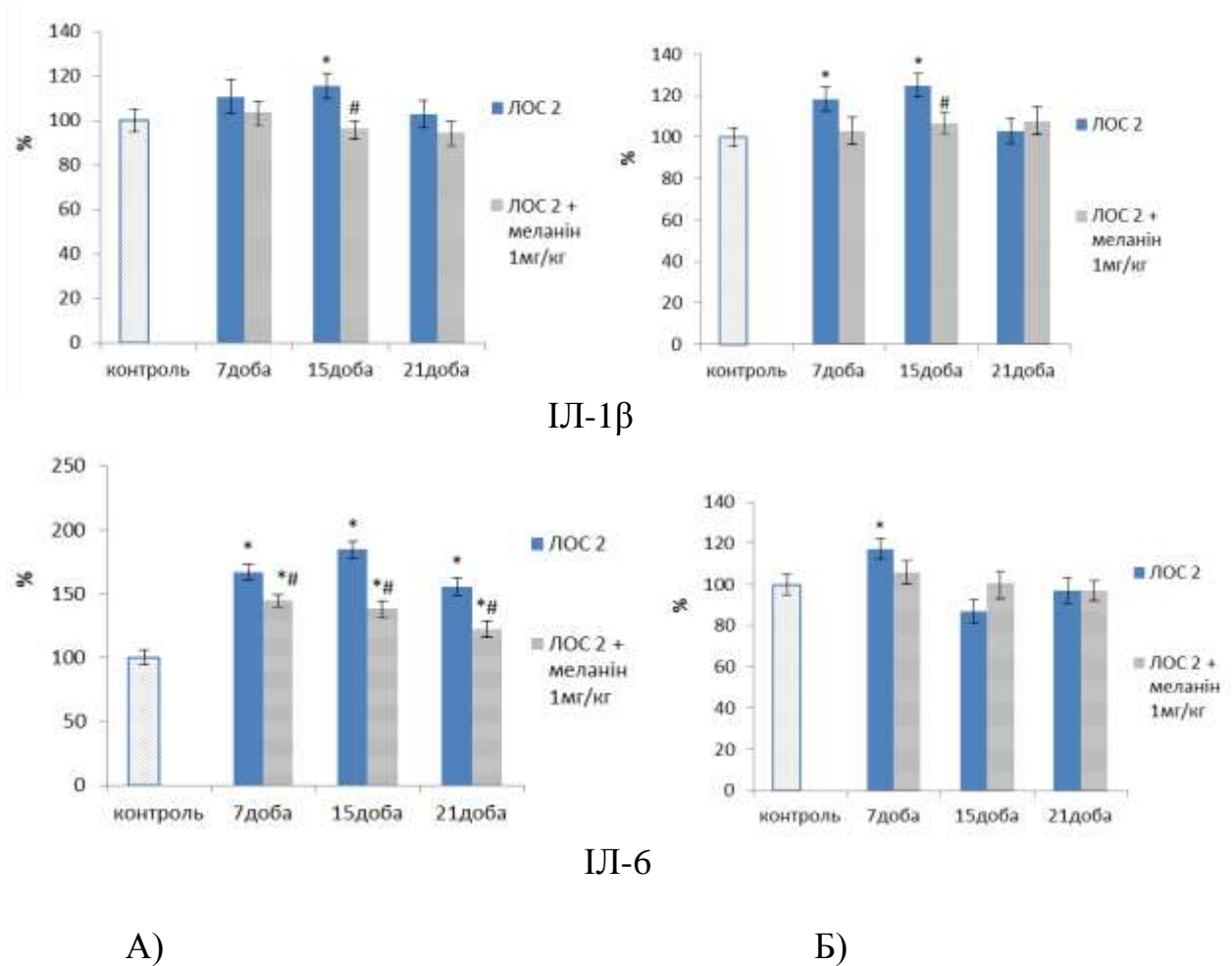
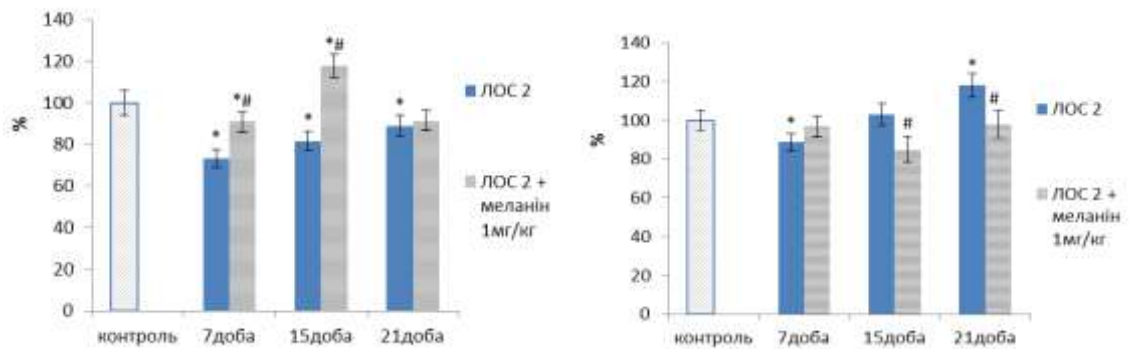


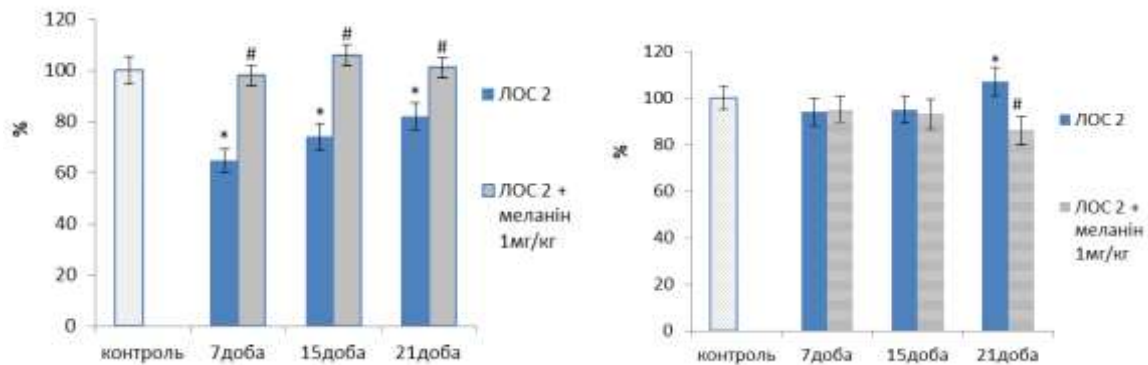
Рис. 3.3 Рівень прозапальних цитокінів (ІЛ-1 $\beta$  та ІЛ-6) в слизовій оболонці стравоходу (А) та сироватці крові (Б) щурів за умов ЛОС 2 та за введення меланіну в дозі 1 мг/кг, ( $M \pm m$ ,  $n=10$  для кожної групи), \* –  $p < 0,05$  порівняно з контролем; # –  $p < 0,05$  порівняно з групою ЛОС 2

Також нами були досліджені протизапальні інтерлейкіни до яких відносяться ІЛ-4, ІЛ-10, що регулюють специфічні імунні реакції і обмежують розвиток запалення (рис. 3.4). Вони синтезовані лімфоцитами та є антагоністами прозапальних цитокінів і володіють здатністю пригнічувати їх біологічну активність, зокрема, вони пригнічують проліферацію і відповідь Т-лімфоцитів на антигени, гальмують продукцію ІЛ-1, ФНП- $\alpha$ , оксиду азоту і простагландинів, зменшуючи, таким чином, запальні прояви [152, 157].

Було встановлено достовірне зниження протизапального цитокіну ІЛ-4 в сироватці крові за умов розвитку ЛОС 2 станом на 7добу на 11,2% порівняно з контрольними значеннями, на 15 та 21 добу концентрація ІЛ-4 підвищувалась на 5% та 18% порівняно з контрольними значеннями. В тканинах стравоходу відмічено зниження рівня досліджуваного цитокіну на 7, 15 та 21 добу на 26,8%, 18,3% та 11% відповідно, порівняно з контролем.



ІЛ-4



ІЛ-10

А)

Б)

Рис. 3.4. Рівень протизапальних цитокінів (ІЛ-4, ІЛ-10) в слизовій оболонці стравоходу стравоходу (А) та сироватці крові (Б) щурів за умов ЛОС 2 та за введення меланіну в дозі 1 мг/кг, ( $M \pm m$ ,  $n=10$  для кожної групи), \* –  $p < 0,05$  порівняно з контролем; # –  $p < 0,05$  порівняно з групою ЛОС 2

За ЛОС 2 рівень ІЛ-4 в тканинах стравоходу знижувався на 15 добу на 17% порівняно з контрольними значеннями. Деякі дослідники включають в критерії несприятливого результату при сепсисі зниження концентрації ІЛ-4 [152, 157]. За умов введення меланіну спостерігали підвищення ІЛ-4 переважно на 7 добу на 25% порівняно з показниками за ЛОС 2 (рис. 3.4). Тому, можна припустити, що введення меланіну знижує ризик септичних ускладнень.

Визначення вмісту ІЛ-10 у сироватці крові статевонезрілих щурів за ЛОС 2 показало недостовірні зміни, порівняно з контрольними значеннями. В тканинах стравоходу концентрація ІЛ-10 знижувалась на 7 добу на 35% порівняно з контролем, за введення меланіну концентрація ІЛ-10 підвищувалась на 7 добу на 50,9% порівняно з показниками вмісту за ЛОС 2 (рис. 3.4).

Отже, рівень деяких цитокінів в крові при опіковій травмі розглядається як патофізіологічна ланка ураження органів та розвитку поліорганної недостатності, сепсису [158]. Групою китайських дослідників була встановлена прогностична роль підвищення концентрації ІЛ-10, в період токсемії [147]. Саме високий рівень ІЛ-10 пов'язують з високим ризиком септичних ускладнень після опіків [159, 160].

Найважливішим фактором специфічного гуморального імунітету є імуноглобуліни (антитіла). Основну масу сироваткових імуноглобулінів (Ig) становить IgG (70- 80%), на частку IgA доводиться 10-15%, IgM - 5-10%. Імуноглобулін G (IgG) активується за імунної відповіді на повторну зустріч з антигеном. Дані антитіла забезпечують найбільш ефективний антибактеріальний і антитоксичний захист організму.

Доведено, що перебіг опікової хвороби в значній мірі залежить від змін в імунному стані потерпілої дитини. За даними літератури встановлено, що при опіку відбуваються зміни ланок гуморального імунітету. У роботі ми визначали в сироватці крові вміст імуноглобулінів класу G, оскільки вони мають важливе значення в протиінфекційному захисті, забезпечуючи пасивний імунітет в

ранньому віці. Імуноглобуліни класу G продукуються у відповідь на проникнення в організм більшості вірусів і бактерій, здатні агрегувати і пов'язувати невеликі розчинні білки, такі як бактеріальні токсини. У дітей із вкрай тяжкою опіковою хворобою визначається зниження вмісту IgG в стадії шоку. На стадії токсемії і септикотоксемії відомо, що вміст IgG поступово підвищується [161, 162].

Тому, доцільним було визначити вміст IgG в сироватці крові. Було показано що, за умов ЛОС 2 вміст IgG підвищувався на 7, 15 та особливо високими значення були на 21 добу на 51%, 26,7% та 126,7% відповідно порівняно з контрольними значеннями (рис. 3.5). Такі високі показники на 21 добу можуть свідчити про хронічний запальний процес при опіку стравоходу. За умов введення меланіну відзначено зниження вмісту IgG в сироватці крові на 7 та 21 добу порівняно з показниками у тварин з ЛОС 2 так, на 7 добу на 23,5%, на 21 добу на 44,1% (рис. 3.5).

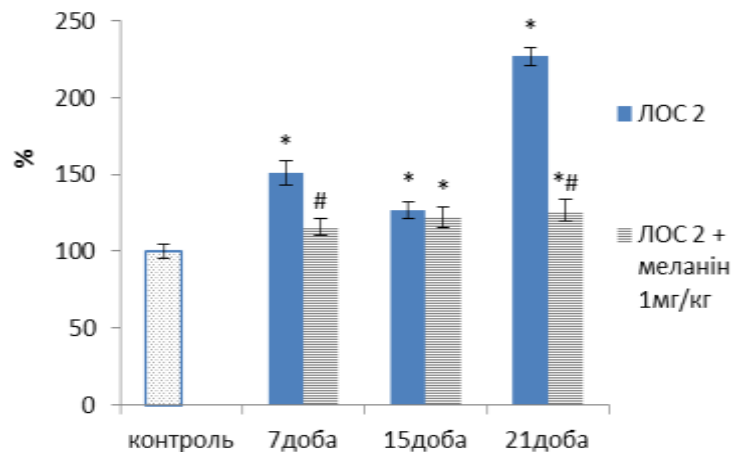


Рис. 3.5 Рівень IgG у сироватці крові щурів за умов ЛОС 2 та за введення меланіну в дозі 1 мг/кг, ( $M \pm m$ ,  $n=10$  для кожної групи), \* –  $p < 0,05$  порівняно з контролем; # –  $p < 0,05$  порівняно з групою ЛОС 2

Таким чином, розвиток ЛОС 2 ступеня характеризувався вираженим і тривалим підвищенням маркерних прозапальних цитокінів в крові (ІЛ-1 $\beta$ , ІЛ-

12, ІФ-гамма, ІЛ-6, ТНФ- $\alpha$ ) та IgG, і зниженням протизапальних інтерлейкінів (ІЛ-4, ІЛ-10), що може вказувати на розвиток запального процесу та свідчити про утворення гранульованої тканини, наслідком чого є формування рубців, ризик розвитку поліорганної недостатності, порушення репаративної регенерації та уповільнення загоєння опікової рани. Було встановлено, що при використанні меланіну скорочується період цитокінової активності в крові щурів, пришвидшується нормалізація деяких показників цитокінового профілю, що приводить до прискорення процесів загоєння опікової рани. Отримані дані змін цитокінів можуть вказувати на зменшення утворення гранульованої тканини, і як наслідок, зниження ризику формування рубців [156].

### **3.3 Рівень експресії мРНК генів *Ptgs2* (COX-2), *Tgfb1* у крові та тканинах стравоходу за умов лужного опіку стравоходу та за введення меланіну**

У попередніх розділах роботи було проведено дослідження змін біохімічних показників, стану антиоксидантної системи, дослідження імунної відповіді які зазнали змін за умов ЛОС 2. Тому, наступним етапом дослідження було підтвердити наявність запального процесу на молекулярному рівні а також активацію різноманітних молекул на рівні експресії генів та виявити, як впливає на ці процеси меланін.

Циклооксигенази / ендопероксид синтази простагландину (Cox / *Ptgs* 1 & 2) генерують простагландини, які відіграють роль у регуляції судинного тону, тромбозу, запалення та болю [163, 164]. Через їх критичну роль у регуляції запалення ферменти циклооксигенази є терапевтичними мішенями для нестероїдних протизапальних препаратів [165, 166, 167]. *Ptgs1* конститутивною ізоформою, тоді як *Ptgs2* є індукцибельною та активується при запаленні [163]. Попередні дослідження показали, що транскрипція *Ptgs2* ініціюється кількома факторами транскрипції, пов'язаними з каскадами запальних сигналів, включаючи NF- $\kappa$ B, AP-1, Sp1 та C / EBP [168]. Так, *Ptgs2* кодує

циклооксигеназу 2, фермент, що відповідає за синтез простагландину  $E_2$  з арахідонової кислоти. Також він задіяний у таких біологічних процесах як метаболізм жирних кислот, метаболізм ліпідів, біосинтез жирних кислот, біосинтез ліпідів, біосинтез та метаболізм простагландинів [169].

Було визначено рівень експресії генів *Ptgs2* в тканинах стравоходу та сироватці крові за умов ЛОС 2 та при застосуванні меланіну. Рівень експресії гена *Ptgs2* в тканинах стравоходу в групі тварин з ЛОС 2 був вищим у 6, 3,2 і 1,6 раза ( $p \leq 0,0001$ ) на 7, 15 і 21 добу загоєння відповідно в порівнянні з контролем.

У щурів, які вживали меланін, цей показник був в 1,3 та 1,7 раза ( $p \leq 0,0001$ ) нижчим на 7 і 15 добу відповідно, ніж у тварин другої групи (на 21 добу рівень мРНК зазначеного гена був на рівні контрольних значень), та виявився менш підвищеним відносно контролю: у 4,5, та 1,9 раза ( $p \leq 0,0001$ ) на 7 і 15 добу загоєння відповідно.

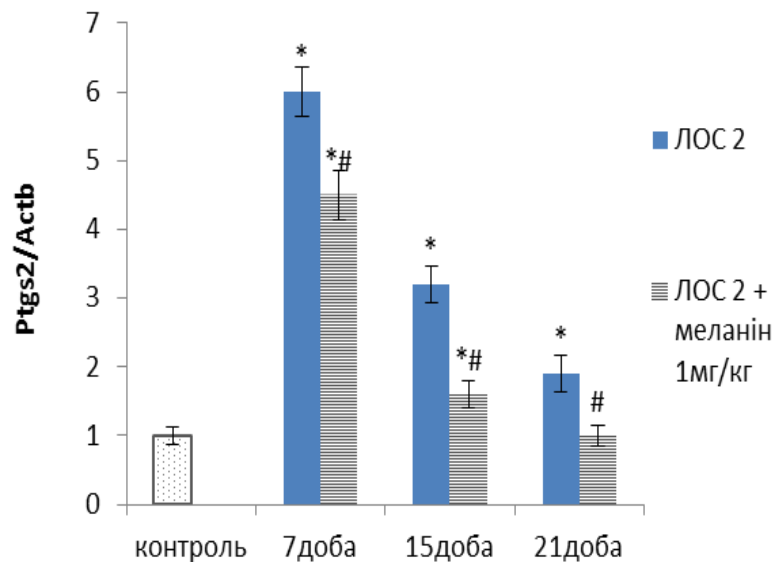


Рис. 3. 6. Відносний рівень експресії гену *Ptgs2* у тканинах стравоходу щурів за умов ЛОС 2 та введення меланіну;

\* –  $p < 0,05$  порівняно з контролем; # –  $p < 0,05$  порівняно з групою ЛОС 2 ( $M \pm m$ ,  $n=10$  для кожної групи)

Рівень експресії гена *Ptgs2* в крові, у групі тварин з ЛОС 2, був вищим у 3,1 і 2,0 раза ( $p \leq 0,0001$ ) на 7 і 15 добу загоєння відповідно в порівнянні з контролем. На 21 добу зазначений показник повертався до контрольних значень.

У щурів, які вживали меланін, цей показник був в 1,4 раза ( $p \leq 0,0001$ ) нижчим на 7 добу, ніж у тварин другої групи, та виявився менш підвищеним відносно контролю: у 2,3 раза ( $p \leq 0,0001$ ). І вже на 15 добу рівень експресії гена *Ptgs2* був на рівні контролю.

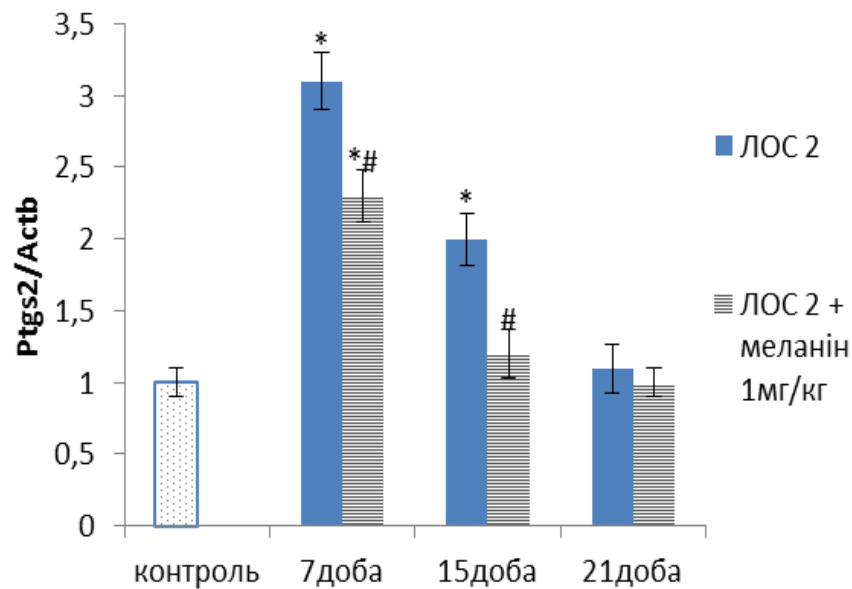


Рис. 3.7. Відносний рівень експресії гену *Ptgs2* у крові щурів за умов ЛОС 2 та введення меланіну;

\* –  $p < 0,05$  порівняно з контролем; # –  $p < 0,05$  порівняно з групою ЛОС 2 ( $M \pm m$ ,  $n=10$  для кожної групи)

Трансформаційний фактор росту бета (*Tgfb*) контролює широкий спектр клітинних реакцій, включаючи диференціювання, клітинну проліферацію, міграцію, апоптоз, позаклітинну реконструкцію та розвиток позаклітинного матриксу [170].

*Tgfb* грає важливу роль в процесі загоєння рани. Безпосередньо після ушкодження він у великій кількості вивільняється з дегранулюють тромбоцитів, виконуючи функцію хемоаттрактанта для лімфоцитів, фібробластів і нейтрофілів. Існують як мінімум три підвиди даного чинника: *Tgfb1*, -b2, -b3. Перші два є найважливішими стимуляторами синтезу колагену і протеогліканів, а також перешкоджають розпаду колагену. *Tgfb3* гальмує утворення сполучної тканини. У фібробластах, виділених з гіпертрофічних рубців, достовірно знижена експресія *Tgfb2*, тоді як в фібробластах келоїдних рубців знижена експресія *Tgfb3* [171].

Рівень експресії гена *Tgfb1* у тканинах стравоходу в групі тварин з ЛОС 2 був вищим у 6,9, 7 і 2,8 раза ( $p \leq 0,0001$ ) на 7, 15 і 21 добу загоєння відповідно в порівнянні з контролем.

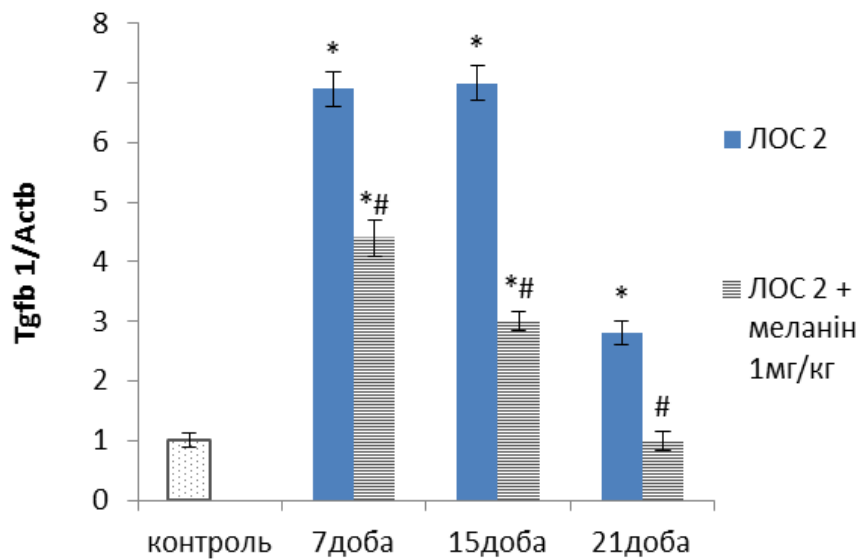


Рис. 3.8. Відносний рівень експресії гена *Tgfb1* у тканинах стравоходу щурів за умов ЛОС 2 та введення меланіну;

\* –  $p < 0,05$  порівняно з контролем; # –  $p < 0,05$  порівняно з групою ЛОС 2 (M $\pm$ m, n=10 для кожної групи)

У щурів, які вживали меланін, цей показник був в 1,6 та 2,3 раза ( $p \leq 0,0001$ ) нижчим на 7 і 15 добу відповідно, ніж у тварин другої групи (на 21 добу рівень мРНК зазначеного гена був на рівні контрольних значень), та виявився менш підвищеним відносно контролю: у 4,4, та 3 раза ( $p \leq 0,0001$ ) на 7 і 15 добу загоєння відповідно.

Рівень експресії гена *Tgfb1* в крові в групі тварин з ЛОС 2 був вищим у 3 та 2,9 раза ( $p \leq 0,0001$ ) на 7 і 15 добу загоєння відповідно в порівнянні з контролем (рис. 3.9). На 21 добу зазначений показник повертався до контрольних значень. У щурів, які вживали меланін, цей показник був в 1,4 раза ( $p \leq 0,0001$ ) нижчим на 7 добу, ніж у тварин другої групи та виявився менш підвищеним відносно контролю: у 2,1 раза ( $p \leq 0,0001$ ). На 15 добу рівень мРНК зазначеного гена був на рівні контрольних значень.

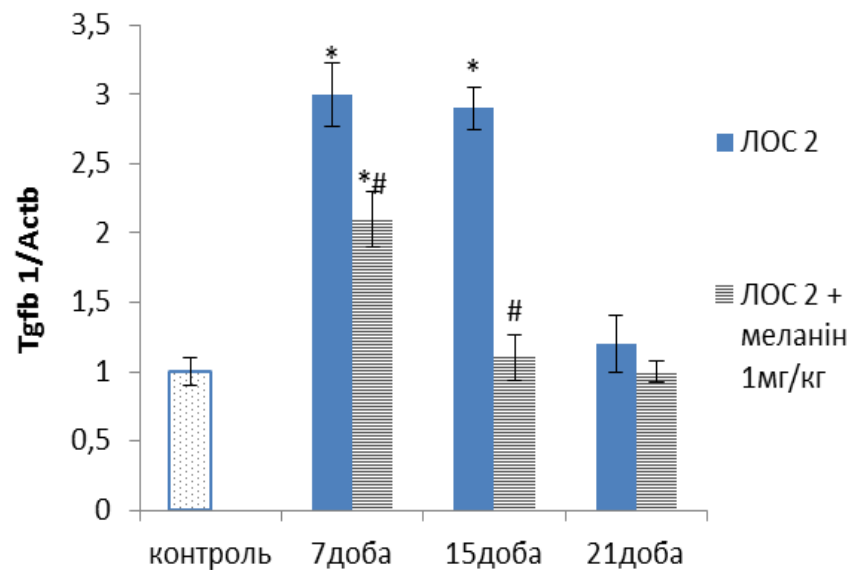


Рис. 3. 9. Відносний рівень експресії гена *Tgfb1* у крові щурів за умов ЛОС 2 та введення меланіну;

\* –  $p < 0,05$  порівняно з контролем; # –  $p < 0,05$  порівняно з групою ЛОС 2 ( $M \pm m$ ,  $n=10$  для кожної групи)

Таким чином, за умов ЛОС 2 рівень експресії генів *Ptgs2* та *Tgfb1* підвищувався переважно на 7 та 15 добу експерименту як в крові, так і в тканинах стравоходу, що вказує на розвиток запального процесу. При застосуванні меланіну спостерігалось зниження рівня експресії досліджуваних генів, що може вказувати на те, що меланін може знижувати запальний процес, а отже і пришвидшувати загоєння ранової поверхні після опіку.

#### **3.4 Білковий склад сироватки крові за умов лужного опіку стравоходу та за введення меланіну**

Відомо, що протеїни плазми здійснюють транспорт численних екзогенних та ендогенних метаболітів, беруть участь у зв'язуванні гормонів, ліпідів, жиророзчинних вітамінів тощо. Будучи амфотерними електролітами, вони відіграють важливу роль у підтриманні кислотно-лужного балансу організму, є факторами зсідання крові, антитілами, а також використовуються як пластичний матеріал для синтезу білків тканин. Основна маса білків плазми крові синтезується в клітинах печінки – альбуміни,  $\alpha$ -глобуліни, частина  $\beta$ -глобулінів, фібриноген, компоненти системи зсідання крові (II, V, VII, IX, X, XI фактори) більша частина  $\beta$ - та  $\gamma$ -глобулінів – у клітинах імунної системи [172].

Відомо, що інтенсивність і характер метаболізму білків в організмі тварин характеризується концентрацією їх складових. Співвідношення між фракціями білків крові за різних фізіологічних умов змінюється [173, 174]. Диспротеїнемія, що спостерігається під час багатьох захворювань, призводить до порушення гомеостазу та розвитку специфічних реакцій організм.

Аналіз електрофореграми білкового складу сироватки крові в контрольних зразках та пробах отриманих від тварин з ЛОС 2 та ЛОС 2 за введення меланіну показав наявність фракцій від 15 до 168 кДа (табл. 3.13).

Таблиця 3.13

**Відносний вміст білкових фракцій у сироватці крові щурів за ЛОС 2 та за введення меланіну, (мкг/мг білку),  $M \pm m$ ,  $n=5$  для кожної групи**

Білкові фракції м.м кДа	контроль	7 доба		15 доба		21 доба	
		ЛОС 2	ЛОС 2 + меланін	ЛОС 2	ЛОС 2 + меланін	ЛОС 2	ЛОС 2 + меланін
168	86,8 ± 2,5	143,0±00,9 *	74,2±2,1 <sup>*#</sup>	190,2±0,2 *	69±1,5 <sup>*#</sup>	183,8±5, 2*	55,1±2,8 <sup>*#</sup>
150	156,7±3,7	219,9±11,4 *	39,2±2,3 <sup>*#</sup>	275,0±10, 2*	41,9±1,5 <sup>*#</sup>	320,7±19 ,6*	56,1±2,1 <sup>*#</sup>
130	449,2±28, 9	326,4±9,2	47,1±2,8 <sup>*#</sup>	231,6±8,1 2*	142,4±1, 5 <sup>*#</sup>	73,2±7,4 *	26±0,8 <sup>*#</sup>
113	60,8±2,8	9,5±0,8	43,3±2,05 <sup>* #</sup>	62,4±2,8*	13,9±1,2 *#	30,6±1,4 *	14,5±2,8 <sup>*#</sup>
103	185,2±11, 7	21,8±2,6*	25,4±1,6*	33,7±1,7*	23,8±1,6 *#	13,6±0,0 7*	30,1±1,45 *#
89	126,0±9,1	6,2±0,2*	60,6±3,5 <sup>*#</sup>	9,8±0,4*	3,9±0,4 <sup>*#</sup>	5,02±0,1 *	50,2±2,7 <sup>*#</sup>
67	325±16,7	149,3±2,9*	349,7±7,2 <sup>* #</sup>	173,0±16, 9*	128,7±4, 8 <sup>*#</sup>	234,0±9, 9*	311,8±6,9 #
55	221,0±9,7	57,4±1,8*	54,1±2,5*	136,1±6,8 *	47,9±2,7 *#	128,2±4, 2*	63,4±2,2 <sup>*#</sup>
~40	145,0±0,9	40,0±0,6*	54,8±2,5 <sup>*#</sup>	139,0±3,2 *	20,1±1,8 *#	40,0±0,8 *	50,1±1,3 <sup>*#</sup>
~25	79,8±3,1	77,0±2,6*	50,1±2,1 <sup>*#</sup>	48±0,8*	5,3±0,08 *#	18,0±0,0 5*	53,7±0,8 <sup>*#</sup>
~15	74,5±1,9	68,3±1 *	81,4±1,8 <sup>*#</sup>	20,2±0,1 *	38,4±2,7 *#	69,81±0, 9 *	45,5±1,8 <sup>*#</sup>

\* –  $p < 0,05$  порівняно з контролем

# –  $p < 0,05$  порівняно з групою ЛОС 2

Було показано, що за умов ЛОС 2 спостерігалось прогресуюче зростання фракцій з м.м 168 та 150 кДа на всі доби експерименту, особливо високий вміст був на 21 добу, що перевищував контрольні значення в 2 рази для фракції м.м 168кДа та в 2 рази для фракції з м.м 150кДа. При застосуванні меланіну відзначалося зниження вмісту фракцій з м.м. 168 та 150 кДа як порівняно з ЛОС 2 так, і порівняно з контрольними значеннями.

Фракція з м.м. 67кДа, що можливо відповідає альбуміну за ЛОС 2 вміст якої знижувався на всі досліджувані доби так, на 7 добу вміст був нижчим за

контрольні значення на 54%, за введення меланіну відзначалося менш виражене зниження даної фракції порівняно з контролем, а також підвищення вмісту даної фракції в 2,3 раза на 7 добу порівняно з показниками за ЛОС 2. Зниження вмісту альбумінів, можливо, є наслідком підвищення проникності судинної стінки і трансудації їх з кров'яного русла, а також може свідчити про порушення функціонального стану печінки, оскільки саме вона є основним місцем синтезу альбумінів [175].

Зміни вмісту фракцій з м.м 55, 40,25 та 15 кДа мали різну динаміку як за умов ЛОС 2 так і при застосуванні меланіну. Вміст фракції з м.м. 40 кДа знижувався на 7 та 21 добу за умов ЛОС 2 в 3 раза порівняно з контролем. За умов ЛОС 2 фракція з м.м. 25 кДа знижувалась на 15 добу в 1,7 раза та на 21 добу в 4,4 раза порівняно з контрольними значеннями.

Отже, за умов ЛОС 2 відбувалися зміни у кількісному розподілі білкових фракцій сироватки крові, з підвищенням фракції, що може відповідати гамма-глобуліновій та зниженням фракції, що може відповідати альбуміновій.

### **3.5. Показники системи протеолізу за умов лужного опіку стравоходу та за введення меланіну**

Відновлення пошкодженої тканини - це складний і динамічний процес, що включає в себе і біохімічні, імунологічні зміни. У цьому процесі існує складна мережа з'єднань і взаємодій між медіаторами, клітинами крові та позаклітинним матриксом, що, врешті-решт, призводить до регенерації внутрішньої або зовнішньої поверхні тіла. Завдяки своїм властивостям меланін може бути використаний при лікуванні різних пошкоджень, таких як рани і опіки. Меланін як антиоксидант грає важливу роль у механізмах репарації тканин. Антиокислювальний механізм залежить від інгібування або запобігання окиснення або перетворення утворених гідропероксидних груп через окислювальну ланцюгову реакцію в нерадикальних продуктах [176].

Як було вказано вище, заживлення рани включає фазу запалення, формування грануляційної тканини та фазу реепітелізації. Етап формування грануляційної тканини та етап реепітелізації включає в себе інфільтрацію за допомогою макрофагів, формування грануляційної тканини шляхом утворення нових кровоносних капілярів, проліферацію фібробластів і трансформацію позаклітинного матриксу. На заключній стадії загоєння, грануляційна тканина змінюється на зрілу рубцеву тканину в результаті резорбції ексудату та активації процесу синтезу колагену. Процес зцілення залежить від індивідуальних особливостей організму, відновлювальної здатності організму та розміру опіку і може тривати від кількох тижнів до кількох місяці [177]. Синтез екстрацелюлярного матриксу та колагену залежить від активності процесів протеолізу а також від активності інгібіторів протеолізу, при порушеннях балансу між ферментами та їх інгібіторами може виникнути патологічне загоєння – хронічна рана або надмірне наростання рубцевої тканини. Тому, доцільно було розглянути процеси протеолізу за умов лужного опіку стравоходу та визначити як застосування меланіну впливає на ці процеси.

Відповідно до сучасних уявлень протеоліз розглядається як особлива форма біологічного контролю, що посідає провідне місце в реалізації різноманітних біохімічних процесів і швидкої фізіологічної відповіді організму на нестійкі умови ендо- та екзогенного середовища. Протеїнази, активні учасники системи протеолізу, виконують величезну кількість різноманітних функцій і контролюють практично всі ланки біологічних процесів, що протікають на молекулярному, клітинному, тканинному і органному рівнях [178]. Регуляторна роль протеолітичних ферментів здійснюється у двох формах: повного та обмеженого протеолізу. Повний протеоліз являє собою деградацію білка, розщеплення аномальних та пошкоджених білків. У той же час обмежений протеоліз вважається універсальним механізмом, відповідальним за утворення, інактивацію та модифікацію гормонів, ферментів та інших фізіологічно активних речовин. При деяких патологічних станах

відбувається надмірна активація протеолізу, що є важливою ланкою патогенезу деструктивних, запальних, алергійних реакцій, порушення процесів гемостазу, а також одним з факторів, що сприяє інвазії клітин злоякісних пухлин [179].

Реакціям протеолізу належить ключова роль не тільки в регуляції внутрішньоклітинного обміну білків, але і в таких процесах, як їх транслокація всередині і поза клітиною, утворення активних ферментів, гормонів та інших біологічно активних речовин. Надмірна активність протеолітичних ферментів обмежується білковими інгібіторами, що формують з ферментами стійкі інактивовані комплекси. Активовані ферменти часто самі виявляються активаторами інших білків, формуючи тим самим складні і багатокомпонентні активаційні каскади, що регулюють багато найважливіші шляхи метаболізму [180]. Зрозуміло, що порушення активаторно-інгібіторного балансу будь-якого з компонентів подібних каскадів неминуче позначиться на функціонуванні пов'язаних систем і всього організму в цілому, складаючи молекулярну основу безлічі патологій [181].

Опікова рана схильна до хронізації в зв'язку з довготривалим запальним процесом та високою протеолітичною активністю. Дослідження останніх років показали, що хронічні рани містять багато нейтрофілів, які секретують желатинази і еластази, що призводить до надмірної деградації і інактивації ранових чинників зростання. Незважаючи на те, що роль дисбалансу протеїназ-інгібіторної системи у розвитку опікових та післяопікових ускладнень активно досліджується, препарати для її цільової корекції за опіків до теперішнього часу не розроблені і стан протеїназ не враховується при проведенні фармакотерапії [180, 182].

В останні роки все більшу увагу приділяють протеолітичним процесам в організмі людини та їх ролі в патогенезі різних захворювань [180, 181]. Протеолітичні ферменти здатні викликати деградацію всіх компонентів позаклітинного матриксу тканин і судин, а їх рівень в крові регулюється складною системою білків-інгібіторів [183].

Трипсино-подібні серинові протеїнази залучені в числені біохімічні процеси, зокрема, вони беруть участь в лізісі білків позаклітинного матриксу: колагену, еластину, фібрину, міозину, тим самим сприяють ремоделюванню тканин. Однією з функцій трипсино-подібних серинових протеїназ є активація проферментів, що секретуються підшлунковою залозою [184]. Тому на першому етапі досліджень було проведено виділення трипсино-подібних серинових протеїназ з плазми крові щурів за умов ЛОС 2, та за умов введення меланіну. Показано, що концентрація трипсино-подібних серинових протеїназ в плазмі крові достовірно збільшувалась за умов ЛОС 2 на 7 добу на 71,6% та зменшувалась на 15 та 21 добу на 29,9% та 19,4% порівняно з контролем (рис. 3.10).

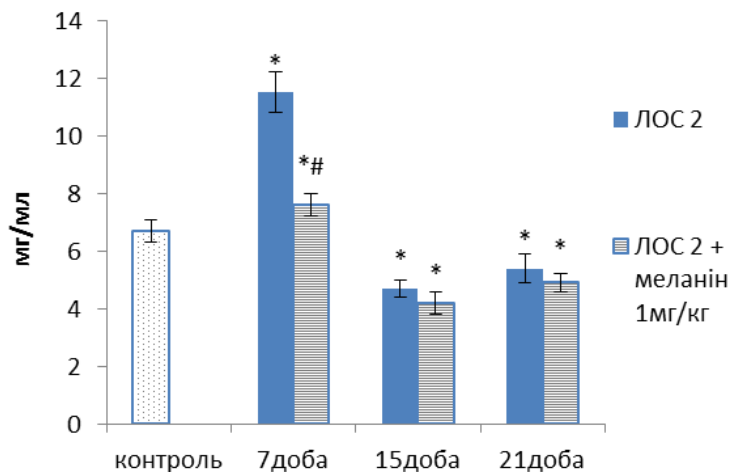


Рис. 3.10. Концентрація трипсино-подібних серинових протеїназ у плазмі крові за умов ЛОС 2 та за введення меланіну ( $M \pm m$ ,  $n=8$  для кожної групи), \*-  $p < 0,05$  порівняно до контролю; #-  $p < 0,05$  порівняно з групою ЛОС 2

За введення меланіну за ЛОС 2 концентрація трипсино-подібних серинових протеїназ була нижчою на 7 добу на 33,9% порівняно з лужним опіком стравоходу другого ступеня.

Зростання концентрації трипсино-подібних серинових протеїназ в плазмі крові щурів може бути пов'язано з розвитком оксидативного стресу в результаті

опіку стравоходу, що зумовлює пошкодження клітинних мембран і вихід протеаз в кровотік, а також можливим зниженням синтезу інгібіторів протеолізу [185]. Меланін, як антиоксидант, може знижувати активність перекисних процесів в організмі і, таким чином, може знижувати концентрацію трипсино-подібних серинових протеїназ.

При критичних станах відбувається порушення динамічної рівноваги між активністю протеолітичних ферментів та їх інгібіторами, що є важливою ланкою патогенезу багатьох захворювань (панкреатит, фібрози, онкологічні захворювання, тощо.) [186]. Проте в літературі відсутні дані щодо активності протеолітичних ферментів та інгібіторного потенціалу в кровотоці при опікових травмах стравоходу. Нами було визначено загальну активність протеолітичних ферментів у плазмі крові щурів за розвитку ЛОС різного ступеня тяжкості (рис. 3.11).

Загальна протеолітична активність у плазмі крові підвищувалась впродовж всього експерименту за лужного опіку стравоходу другого ступеня, на 7, 15 та 21 добу на 294%, 254% та 295% порівняно з контрольними значеннями. За введення меланіну протеолітична активність знижувалась на 7 добу експерименту за ЛОС 2 на 56% порівняно з показниками в тварин з ЛОС 2.

За умов ЛОС 2 загальна протеолітична активність в тканинах стравоходу зростала впродовж всього експерименту порівняно з контрольними значеннями на 7 добу на 96%, на 15 добу на 137%, на 21 добу на 65%. При застосуванні меланіну спостерігалася більш низька активність протеолітичної активності на 7, 15 та 21 добу на 31,6%, 32,6% та 31% відповідно, порівняно з показниками за ЛОС 2 (рис. 3.11).

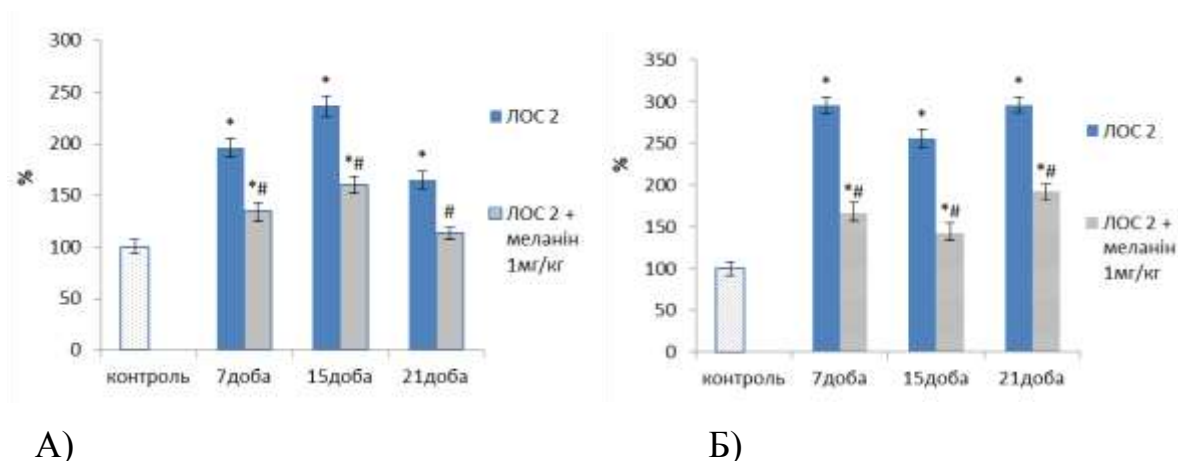


Рис. 3.11. Загальна протеолітична активність в тканинах стравоходу (А) та плазмі крові (Б) за умов ЛОС 2 та за введення меланіну ( $M \pm m$ ,  $n=8$  для кожної групи), \*-  $p < 0,05$  по відношенню до контролю; #-  $p < 0,05$  по відношенню до ЛОС 2

На етапі опікового шоку відбувається значна активація протеолітичних ферментів під впливом катехоламіну,  $Ca^{2+}$ , також у результаті гіпоксії та метаболічного ацидозу відбувається пошкодження клітинних мембран [187]. Меланін маючи антиоксидантні властивості мав позитивний вплив на цілісність мембран припиняючи в них процеси ПОЛ, тим самим зменшував кількість ферментів, які виходять з пошкоджених клітин.

Серед протеолітичних ферментів найбільш активними при процесах загоєння є серинові та металопротеїнази. Так, підвищення активності серинових протеїназ у позаклітинному середовищі розглядають як основну ланку за розвитку багатьох патологій при яких відбувається інфільтрація тканин нейтрофілами, що, відповідно, супроводжується запальною реакцією [188]. Найбільш типовими сериновими протеїназами є хімотрипсин, трипсин, плазмін, еластаза, урокіназа, калікреїн плазми крові та деякі фактори згортання крові [189]. З даних літератури відомо, що головною функцією матриксних металопротеїназ (ММП) є деградація компонентів екстрацелюлярного матриксу (ЕЦМ). Тому нами було визначено активність серинових та металопротеїназ у плазмі крові щурів за розвитку ЛОС 2.

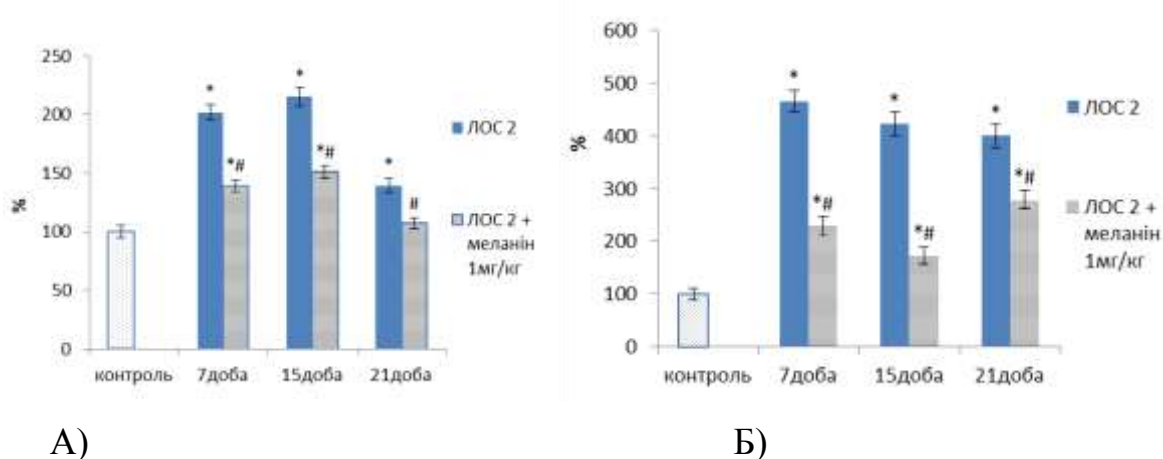


Рис. 3.12. Активність серинових протеїназ в слизовій оболонці стравоходу (А) та плазмі крові (Б) щурів за умов ЛОС 2 та за введення меланіну ( $M \pm m$ ,  $n=8$  для кожної групи), \*-  $p < 0,05$  по відношенню до контролю; #-  $p < 0,05$  по відношенню до ЛОС 2

Активність серинових протеїназ в плазмі крові підвищувалась за умов опіку стравоходу на 7, 15 та 21 добу, за ЛОС 2 в 4,7, 4,4 та 4,3 раза відповідно, порівняно з контрольними значеннями. За умов введення меланіну спостерігалася нижча активність серинових протеїназ в плазмі крові за ЛОС 2 на 15 добу в 2,6 раза порівняно з показниками в тварин з опіком (рис. 3.12).

За лужного опіку стравоходу другого ступеня спостерігалось підвищення активності ММП в плазмі крові на 7, 15 та 21 добу в 2,3, 2,3 та 2,7 раза відповідно, порівняно з контрольними значеннями. При застосуванні меланіну відбувалося зниження активності ММП в плазмі крові на 7 добу експерименту за ЛОС 2 в 1,6 раза порівняно з показниками в тварин з ЛОС 2.

При дослідженні активності металопротеїназ та серинових протеїназ в тканинах стравоходу було виявлено, що вона зростала впродовж всього експерименту порівняно з контрольними значеннями, так, для серинових протеїназ на 7 добу на 102%, на 15 добу на 115%, на 21 добу на 39%, для матриксних металопротеїназ активність підвищувалась на 7, 15 та 21 добу на 55,6%, 133% та 66,6%. При застосуванні меланіну відбувалося зниження

активності серинових протеїназ на 7, 15 та 21 добу на 31%, 29% та 22% відповідно, подібний результат спостерігався для матриксних металопротеїназ активність яких при застосуванні мелану знижувалась на 7 добу на 30%, на 15 добу на 38% та на 21 добу на 33% порівняно з показниками за ЛОС 2.

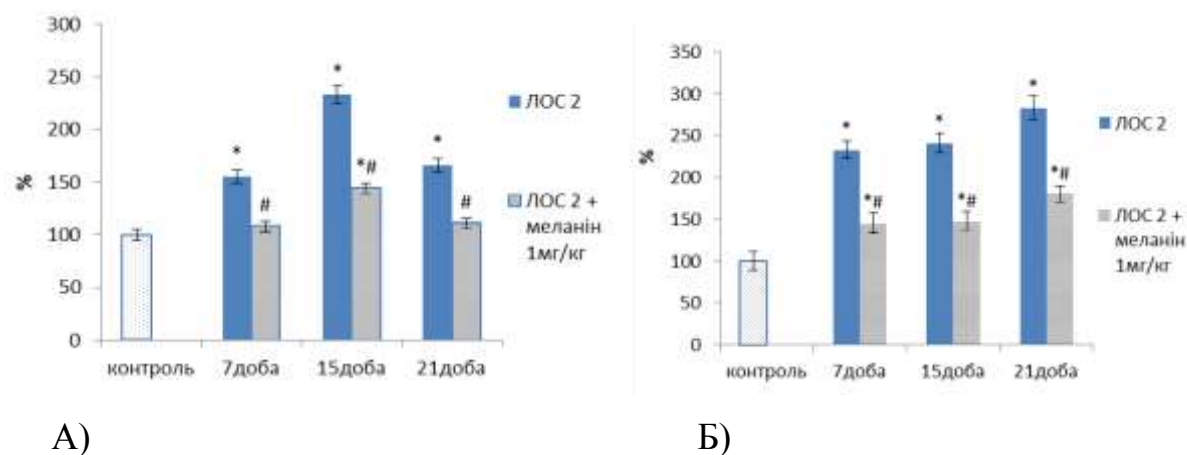


Рис. 3.13. Активність матриксних металопротеїназ в слизовій оболонці стравоходу (А) та плазмі крові (Б) щурів за умов ЛОС 2 та за введення меланіну ( $M \pm m$ ,  $n=8$  для кожної групи), \*-  $p < 0,05$  по відношенню до контролю; #-  $p < 0,05$  по відношенню до ЛОС 2

Висока активність ММП в уражених тканинах може свідчити про активний процес епітелізації ранової поверхні, особливо високі показники були на 15 добу, цей період характеризується активним ростом колагенових волокон та посиленою секрецією металопротеїназ, для забезпечення щільності грануляційної та нормальної епітелізації тканини. В той час, як високі показники активності ММП та серинових протеїназ на 21 добу за ЛОС 2 свідчать про хронізацію запального процесу. Меланін знижував активність ММП та серинових протеїназ можливо завдяки зниженню їх експресії та впливу на транскрипційні фактори, а також, завдяки зниженню запального процесу, а також як наслідок зниженням активності протеолітичних процесів.

Інгібітори протеолізу містяться в тканинах і крові і є одним з механізмів захисту організму від протеолітичних ферментів ендogenous і екзогенного походження. Порушення рівноваги протеїнази-інгібітори протеїназ призводять до виникнення різних патологічних станів [190]. Як відомо, на активність протеїназ впливає не тільки швидкість їх утворення, а й їх інактивация специфічними інгібіторами.

$\alpha 1$ -антитрипсин ( $\alpha 1$ -АТ) є глікопротеїном з М.м. 52-кДа, він є інгібітором серинових протеаз, який діє в першу чергу для пригнічення еластази нейтрофілів, тим самим захищаючи тканини від протеолітичної деградації [191].  $\alpha 1$ -АТ також функціонує в якості сильнодіючого протизапального і регуляторного білка, який може впливати на більшість запальних клітин. Показано, що  $\alpha 1$ -АТ знижує активність прозапальних цитокінів ІЛ-6, ІЛ-8, ІЛ-1b та ФНП-а, та сприяє активації протизапальних ІЛ-10, ІЛ-4 [192, 193].

$\alpha 2$ -макроглобулін ( $\alpha 2$ -МГ) є високомолекулярним глікопротеїном плазми (сироватки) крові з М.м. 72 кДа.  $\alpha 2$ -МГ бере участь в регуляції активності 4 класів протеїназ: серинових, тіолових, кислих і металопротеїназ. Макроглобуліни служать транспортерами регуляторних цитокінів до клітин, беруть участь в процесі і презентації антигенів, в передачі сигналу до клітки і в запуску каскаду внутрішньоклітинних реакцій [194]. Крім того, макроглобуліни в залежності від конформаційного стану модулюють апоптоз клітин, процеси згортання крові, ремоделювання тканин [195, 196].

Нами було досліджено активність  $\alpha 2$ -МГ та  $\alpha 1$ -АТ в плазмі крові дослідних щурів за умов ЛОС 2 ступеня та за введення меланіну в дозі 1мг/кг. Після моделювання ЛОС 2 було показано підвищення активності  $\alpha 1$ -АТ на 15 добу в 1,6 раза, порівняно з контролем (рис. 3.14). На 7 та 21 добу активність показника була на рівні контрольних значень. За ЛОС 2 за умов введення меланіну рівень  $\alpha 1$ -антитрипсину знижувався на 15 добу в 1,9 раза порівняно з групою тварин з ЛОС 2 (рис. 3.14).

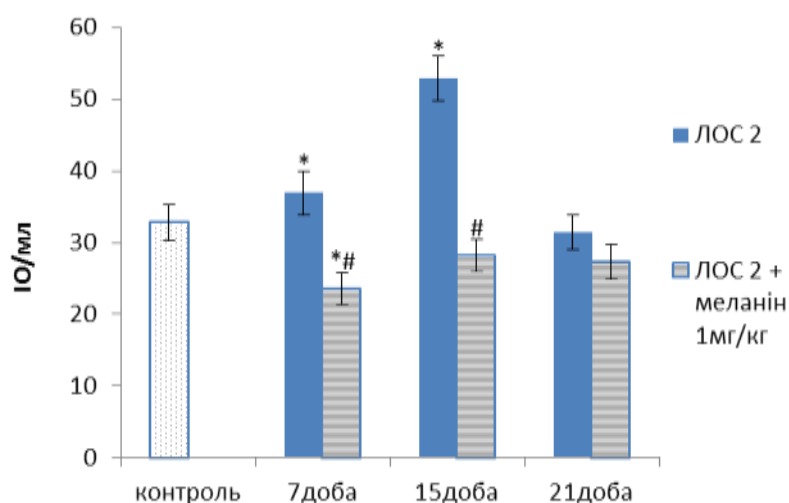


Рис. 3.14. Активність  $\alpha$ 1-антитрипсину в плазмі крові щурів за моделювання ЛОС 2 ступеня, та за введення меланіну ( $M \pm m$ ,  $n=10$  для кожної групи) , \*-  $p < 0,05$  по відношенню до контролю; #-  $p < 0,05$  по відношенню до ЛОС 2

У ході подальших досліджень нами встановлено, що за умов розвитку розвитку ЛОС 2 ступеня встановлено прогресуюче зростання активності  $\alpha$ 2-МГ впродовж всього експерименту. Слід зазначити, що активність даного інгібітору була найвищою на 21-шу добу та перевищувала контрольні значення в 1,9 раза. Меланін знижував активність  $\alpha$ 2-МГ за умов ЛОС 2 даного інгібітора на 7, 15 та 21 добу в 1,3; 1,6 та 1,5 раза відповідно порівняно з опіком стравоходу другого ступеня (рис. 3.15).

Підвищення загальної протеолітичної активності в плазмі крові щурів впродовж експерименту зумовлює компенсаторне підвищенням активності сироваткових інгібіторів. Підвищення активності  $\alpha$ 2-МГ може також свідчити про запальний процес. Але слід зазначити, що за розвитку ЛОС 2 ступеня відбувається підвищення активності  $\alpha$ 2-МГ та активності серинових протеїназ та матриксних металопротеїназ на 21 добу експерименту, що може свідчити про хронічний запальний процес, який розвивається у відповідь на пошкодження.

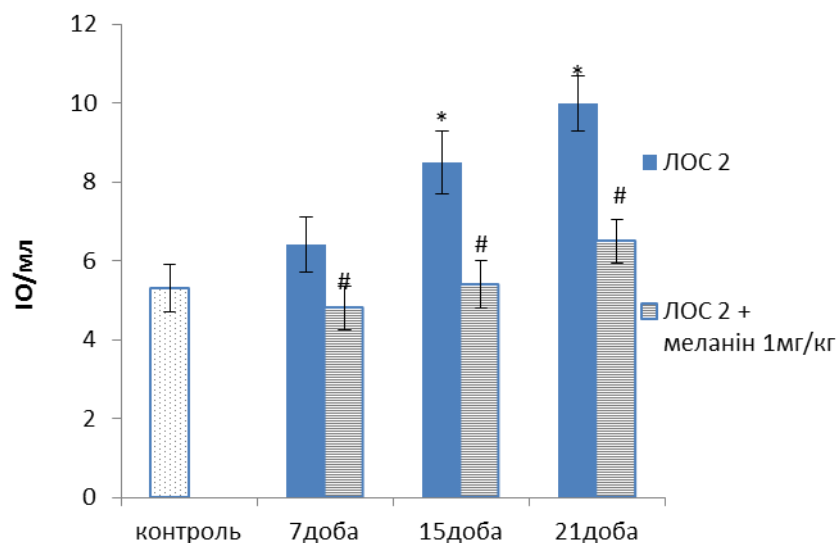


Рис. 3.15. Активність  $\alpha$ 2-макроглобуліну (IO/мл) в плазмі крові щурів за моделювання ЛОС 2 ступеня, та за введення меланіну ( $M \pm m$ ,  $n=10$  для кожної групи) , \*-  $p < 0,05$  по відношенню до контролю; #-  $p < 0,05$  по відношенню до ЛОС 2

За введення меланіну активність протеолітичних ферментів та їх інгібіторів знижувались та наближались до контрольних. Отримані дані можуть свідчити про вплив меланіну на нормалізацію процесів загоєння.

Основний фермент фібринолітичної системи - плазмін (ЕС 3.4.21.7) – циркулює в кровотоці у формі неактивного проферменту – плазміногену. Він є поліфункціональним білком, що задіяний в регуляції численних фізіологічних та патофізіологічних процесів: ремоделюванні тканин, репродукції, ангіогенезі, запаленні, інвазії пухлинних клітин та багатьох інших [197].

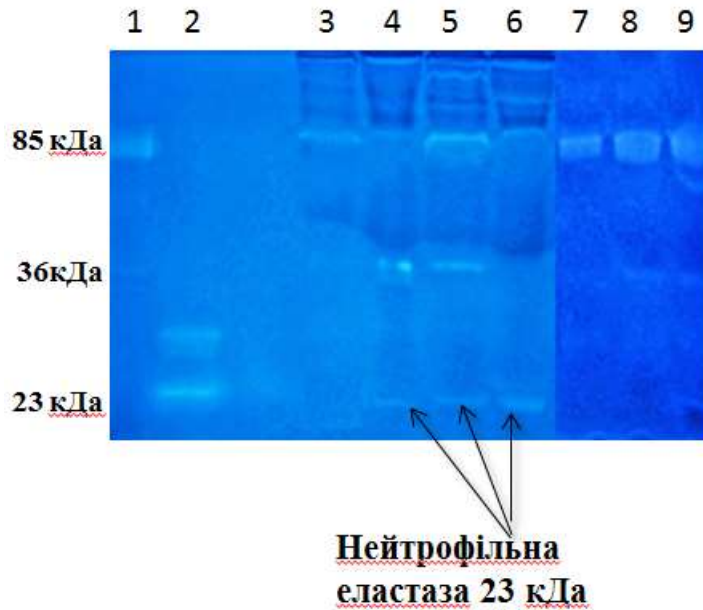


Рис. 3.16. Ензимограма трипсино-подібних серинових протеаз у плазмі крові за умов ЛОС 2 та за введення меланіну n=3

**1,2**-маркери; **3**-контроль; **4**- ЛОС 7 д.; **5**- ЛОС 15 д.; **6** –ЛОС 21 д.;  
**7**- ЛОС 7 д. +меланін; **8**- ЛОС 15 д. +меланін; **9**- ЛОС 21 д. +меланін  
 36 кДа – деградовані форми плазміну  
 23 кДа – нейтрофільна еластаза

При аналізі ензим-форезу трипсино-подібних серинових протеаз виявлено значну кількість низькомолекулярних активних протеолітичних ферментів, що утворились внаслідок деградації схильного до автолізу плазміну (рис. 3.16). При порівнянні треків плазм щурів з опіками стравоходу, треків контрольних щурів та треків плазм щурів з опіком стравоходу, яким вводили меланін видно, що низькомолекулярні похідні плазміну зустрічаються як за норми, так і за патології, однак ензим-форези у плазмі щурів з опіком істотно відрізняються від норми як за кількісним, так і за якісним вмістом низькомолекулярних похідних плазміну. Це може свідчити про посилення процесів, що можуть провокувати утворення деградованих форм плазміну/плазміногену в кровотоці.

Таблиця 3.14

**Якісний склад отриманих фракцій трипсино-подібних серинових протеїназ у плазмі крові за моделювання ЛОС 2 ступеня та за введення меланіну (n=3 для кожної групи)**

кДа	контроль	7 доба		15 доба		21 доба	
		ЛОС 2	ЛОС 2+меланін 1мг/кг	ЛОС 2	ЛОС 2+меланін 1мг/кг	ЛОС 2	ЛОС 2+меланін 1мг/кг
127	-	-	+	-	+	-	-
116	-	-	+	-	+	-	-
106	+	-	+	-	+	-	+
95	+	+	+	+	-	+	+
90	+	+	-	+	-	+	-
85 плазмін	+	+	+	+	+	+	+
75д.ф. плазміна	-	+	-	-	+	+	-
54д.ф. плазміна	-	-	+	-	+	-	-
43д.ф. плазміна	+	+	+	-	-	-	-
36міні-плазмін	-	+	-	+	+	-	+
23 еластаза	-	+	-	+	-	+	-

Фракції з М.м. 127, 116, 106, 95 та 90 кДа можливо відповідають комплексам трипсиноподібних ферментів плазми крові з іншими білковими молекулами. Фракція з М.м. 85 кДа відповідає плазміну, спостерігається підвищення його активності за ЛОС 2 на 15 добу, що перевищувало контрольні значення на 40% порівняно з контрольними значеннями. Фракція з М.м. 36 кДа можливо відповідає міні-плазміну який утворюється в результаті автолізу плазміну, ця фракція з'являлась за ЛОС 2, в контрольних пробах її не виявлено, це може свідчити про надмірну протеолітичну активність плазміну за умов

опіку, що призводить до його деградації. Також було показано, що за умов ЛОС 2 відбувається утворення низькомолекулярних фракцій з М.м 74, 54, 43, 36, 23 кДа. Фракція з М.м 23 кДа може відповідати еластазі, було показано наявність цієї фракції за умов ЛОС 2 на 21 добу (табл. 3.14).

Активність ферментів залежить від рівня експресії їх генів і від наявності активаторів і інгібіторів. ММП відносять до «індукованих» ферментів, транскрипція яких підпорядковується цілому ряду чинників (стероїдні і тиреоїдні гормони, цитокіни, фактори росту, хімічні агенти та ін.). Виняток становить ММП-2, експресія якої відбувається конститутивно. Експресія ММП подібна до експресією білків гострої фази і регулюється протизапальними цитокінами, такими як ФНП- $\alpha$ , ФНП- $\gamma$  і ІЛ-1 $\beta$  [198], бактеріальними ліпополісахаридами [199]. ММП є високоактивними ферментами, які деградують широкий спектр компонентів позаклітинного матриксу, включаючи глікопротеїни та протеоглікани. Для запобігання надмірного розкладання ЕЦМ існує декілька рівнів регуляторних механізмів для контролю активності ММП [200]. Кількість новосинтезованих ММП регулюється на рівні транскрипції, а протеолітична активність існуючих ММП контролюється, як активацією проферментів, так і пригніченням активних ферментів ендogenous інгібіторами,  $\alpha_2$ -МГ і тканинними інгібіторами металопротеїназ (ТІМП) [194].

Функціонування ММП при нормальних та патологічних загоєннях ран активно досліджується [198, 201]. Разом з цим, недостатньо експериментальних та клінічних даних стосовно ролі ММП у загоєнні післяопікових ран саме стравоходу та впливу на їх активність меланіну. Нами було визначено вміст ММП-1, ММП-2, ММП-3, ММП-8, ММП-9 та ТІМП-1 у сироватці крові та тканинах стравоходу, а також фактор росту фібробластів у тканинах стравоходу щурів після моделювання ЛОС 2 та на тлі введення меланіну.

ММП-1 (також відома як інтестинальна коллагеназа, фібробластів і коллагеназа I) синтезується фібробластами, хондроцитами, макрофагами, кератиноцитами, ендотеліальними клітинами і остеобластами. Синтез ММП-1

стимулюється різними агентами, включаючи цитокіни (наприклад, епідермальний фактор росту, ІЛ і ТНФ- $\alpha$ ). ММП-1 приймає участь в деградації колагенових ниток в процесі ремоделювання екстрацелюлярного матриксу. Після травми, ММП-1 експресується базальними кератиноцитами дистальних ділянок епідермісу декількох типів опікових уражень (ранової інфекційні рани, хронічні виразки, післяопікові рани) [202]. ММП-2 (желатиназа) перш за все експресується в мезенхімальних клітинах (головним чином в фібробластах) в період розвитку і регенерації тканини. Також синтезується нейтрофілами, макрофагами і моноцитами. ММП-2 разом з ММП-9 бере участь в деградації колагену IV типу, головного компонента базальних мембран і желатину (денатурованого колагену). ММП-2 може також руйнувати інші типи колагену (V, VII і X), еластин і фібронектин. Окрім цього, ряд авторів опублікували дані, які підтверджують участь ММП-2 та ММП-3 у загоєнні післяопікових ранах [203, 204].

За умов моделювання ЛОС 2 ступеня показано підвищення вмісту ММП-1 та ММП-2 в сироватці крові на 21 добу експерименту в 1,2 та 1,3 раза, порівняно з контрольними значеннями. За введення меланіну спостерігалось зниження вмісту даних металопротеїназ на 21 добу для ММП-1 в 1,25 раза, для ММП-2 в 1,4 раза порівняно з групою ЛОС 2.

У тканинах стравоходу за умов ЛОС 2 вміст ММП-1 був найбільш високим на 7 добу, що перевищувало контрольні значення в 1,3 раза, вміст ММП-2 був найбільш високий на 7 та 21 добу що перевищувало контрольні значення в 1,46 раза та 1,5 раза відповідно. При застосуванні меланіну спостерігалось зниження вмісту ММП-1 та ММП-2 особливо на 7 добу в 1,2 та 1,27 раза відповідно, порівняно з показниками за ЛОС 2 (рис. 3.17).

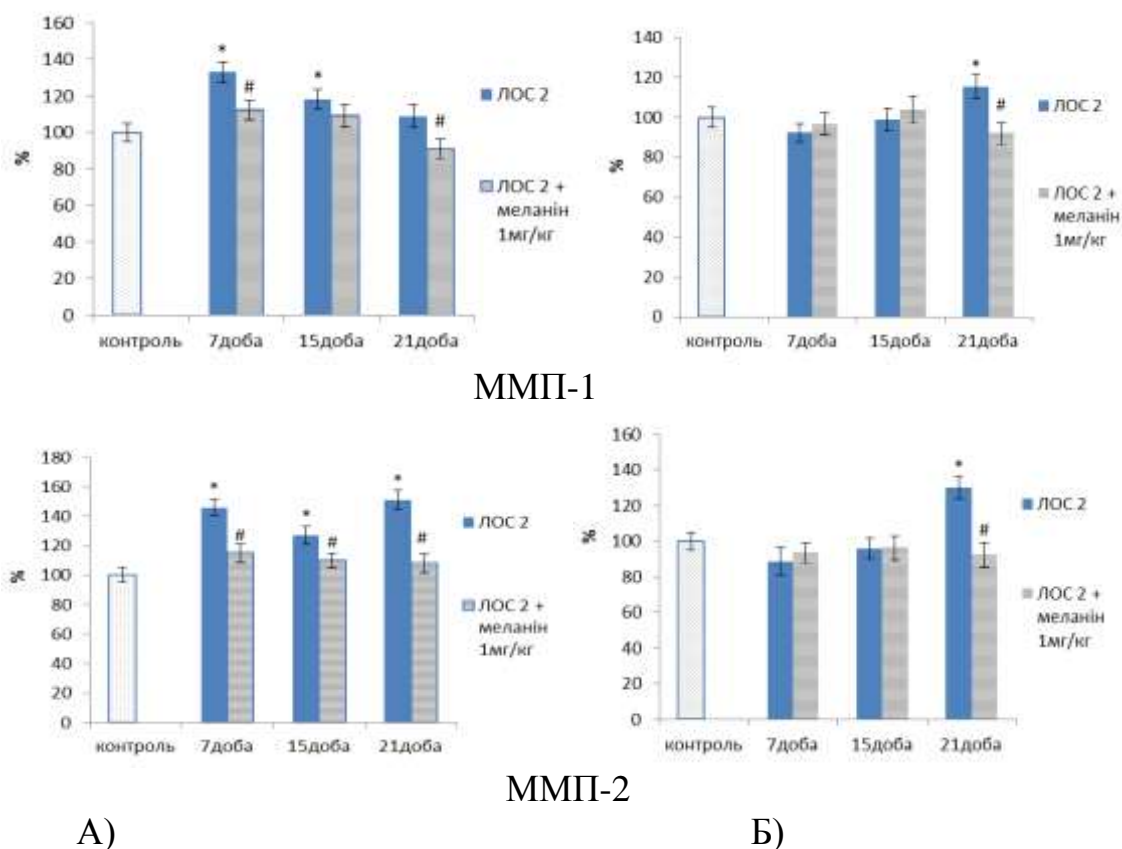


Рис. 3.17. Вміст матриксних металопротеїназ (ММП-1 та ММП-2) в слизовій оболонці стравоходу (А) та в сироватці крові (Б) щурів за умов ЛОС 2 та за введення меланіну ( $M \pm m$ ,  $n=10$  для кожної групи), \*-  $p < 0,05$  по відношенню до контролю; #-  $p < 0,05$  по відношенню до опіку

Матриксна металопротеїназа-3 (ММП-3), каталізує деградацію багатьох компонентів сполучної тканини, включаючи протеоглікани, колаген типів II, IV, IX і XI, ламінін і фібронектин. ММП-3 може також впливати на деградацію позаклітинного матриксу через активацію проколлагенази-1. Крім того, ММП-3 також може активувати інші ММП, такі як ММП-7 та ММП-9, що робить ММП-3 одним з головних учасників реконструкції сполучної тканини. Також ММП-3 залучається до загоєння рани, прогресування атеросклерозу та ініціації пухлинних клітин, а також ММП3 може брати участь в активації транскрипції [205].

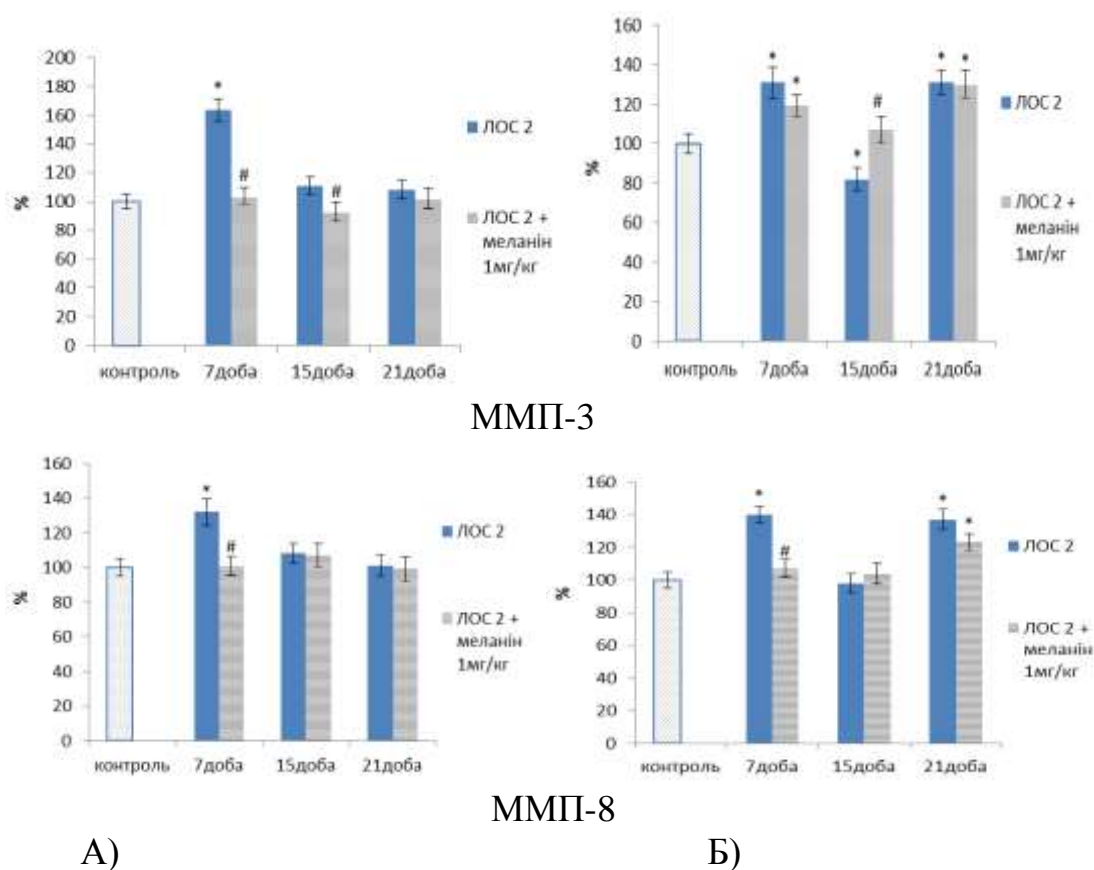


Рис. 3.18. Вміст матричних металопротеїназ (ММП-3 та ММП-8) в слизовій оболонці стравоходу (А) та в сироватці крові (Б) щурів за умов ЛОС 2 та за введення меланіну ( $M \pm m$ ,  $n=10$  для кожної групи), \* -  $p < 0,05$  по відношенню до контролю; # -  $p < 0,05$  по відношенню до опіку

Вміст ММП-3 у сироватці крові підвищувався за ЛОС 2 ступеня найвищі значення були на 7 та 21 добу добу, що перевищували контроль в 1,3 та 1,3 раза. За введення меланіну достовірних змін не виявлено. В тканинах стравоходу найбільш високим вміст був на 7 добу, що перевищувало контрольні значення в 1,64 раза. При застосуванні меланіну вміст ММП-3 в тканинах стравоходу знижувався та наближався до контрольних значень, так на 7 добу вміст ММП-3 знизився в 1,57 раза порівняно з показниками за ЛОС 2.

ММП-8 (також відома як нейтрофільна колагеназа) міститься в специфічних гранулах поліморфноядерних лейкоцитів у вигляді неактивного профермента [206]. Різні агенти, такі як ІЛ-1 і ІЛ-8, ТНФ- $\alpha$ , стимулюють

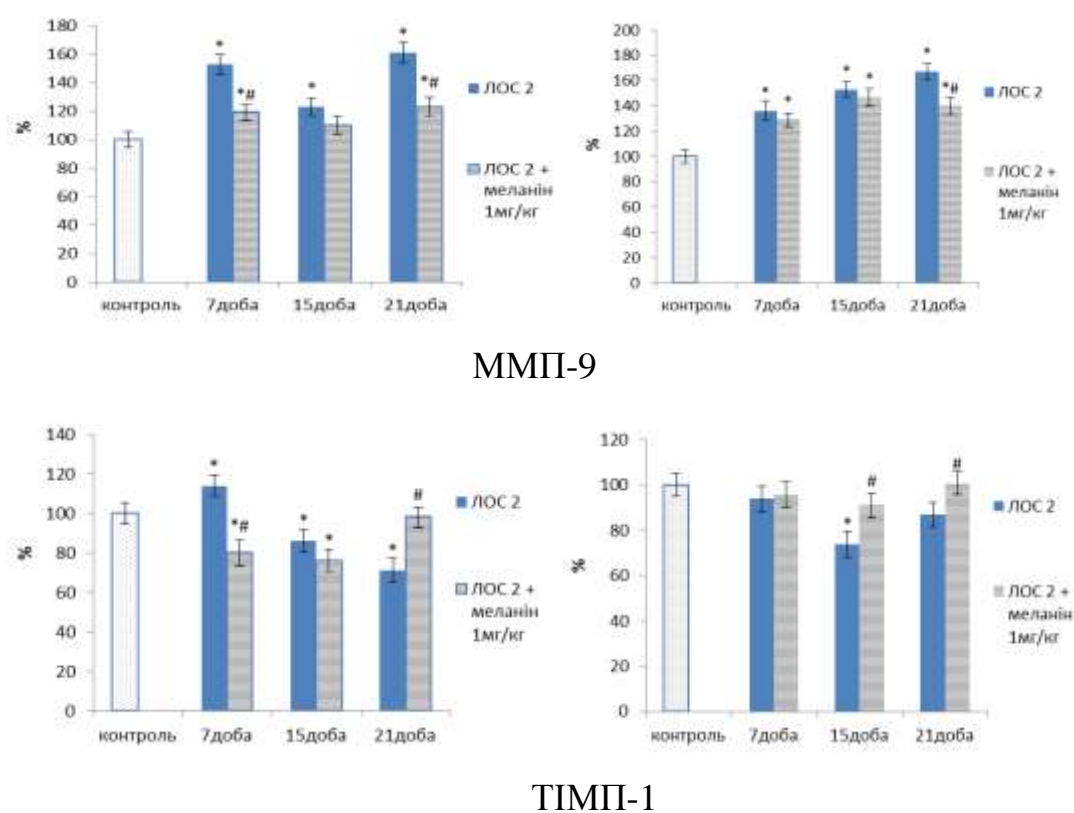
вивільнення з нейтрофілів ММП-8 - ключового ферменту, що починає руйнування позаклітинного матриксу, особливо при патологічних запальних процесах. ММП-8 може розщеплювати білки, такі як фибронектин, серпіни, а також пептиди типу ангіотензина і субстанції Р. [207].

За умов опіку підвищувався вміст ММП-8 у сироватці крові за ЛОС 2 ступеня на 7 та 21 добу в 1,4 та 1,35 раза, порівняно з контролем. За введення меланіну за ЛОС 2 ступеня спостерігалось зниження вмісту ММП-8 на 7 та 21 добу в 1,3 та 1,1 раза порівняно з опіком другого ступеня. Вміст ММП-8 в тканинах стравоходу підвищувався лише на 7 добу після ЛОС 2 в 1,32 раза порівняно з контролем. За введення меланіну відбувалось зниження вмісту ММП-8 у тканинах стравоходу на 7 добу в 1,3 раза порівняно з показниками за ЛОС 2 (рис. 3.18).

Джерелами ММП-9 є кератиноцити, моноцити, лейкоцити, макрофаги і фібробласти [203, 204]. Базальні рівні ММП-9 зазвичай низькі, її експресія може індукувати різними цитокинами / хемокінів, включаючи TNF- $\alpha$  (фактор некрозу пухлин-альфа), і головним чином-секретується запальними клітинами [204]. ММП-9 приймає участь у процесах запалення (так само, як і ММП-2, може мати про- і протизапальну активність), ремоделювання тканин і репарації, мобілізації матрикс-пов'язаних факторів росту і процесингу цитокінів. [204, 206, 207].

Вміст ММП-9 в сироватці крові прогресуюче зростає впродовж всього експерименту найвищі показники спостерігались за ЛОС 2 ступеня на 7, 15 та 21 добу, що перевищували контроль в 1,35; 1,5 та 1,7 раза. За введення меланіну вміст ММП-9 знижувався на 21 добу за ЛОС 2 в 1,2 раза порівняно з опіком стравоходу. В тканинах стравоходу вміст ММП-9 був високий на 7 та 21 добу що, перевищувало контрольні значення в 1,5 та 1,6 раза відповідно. За введення меланіну вміст ММП-9 знижувався але був вищим ніж контрольні значення, так на 7 та 21 добу в 1,28 та 1,3 раза відповідно порівняно з показниками за ЛОС 2.

Активність всіх ММП чітко контролюється та інгібується так званими інгібіторами тканинних металопротеїназ (ТІМП), які можуть блокувати руйнування екстрацелюлярного матриксу. Є чотири відомих ТІМП (ТІМП 1-4), всі ТІМП складаються з двох доменів, один домен в основному відповідальний за інгібування, в той час як інший домен може зв'язуватися з про-желатиназами, а також стимулювати клітинну проліферацію. ТІМП інгібують розвиток пухлини, метастазування і ангиогенез.



А)

Б)

Рис. 3. 19. Вміст ММП-9 та ТІМП-1 в слизовій оболонці стравоходу (А) та в сироватці крові (Б) щурів за умов ЛОС 2 та за введення меланіну ( $M \pm m$ ,  $n=10$  для кожної групи), \*-  $p < 0,05$  по відношенню до контролю; #-  $p < 0,05$  по відношенню до опіку

Тому, нами було визначено вміст тканинного інгібітора ММП (ТІМП-1) у сироватці крові та тканинах стравоходу після моделювання лужного опіку

стравоходу 2 ступеня та за введення меланіну. При опіку вміст ТІМП-1 в сироватці крові знижувався особливо на 15 та 21 добу за ЛОС 2 ступеня в 1,35 та 1,15 раза порівняно з контролем. Встановлено, що на 21 добу за введення меланіну вміст ТІМП-1 підвищувався порівняно з показниками при опіку в 1,2 раза. В тканинах стравоходу за ЛОС 2 вміст ТІМП-1 знижувався на 21 добу в 1,4 раза порівняно з контролем. За введення меланіну на 21 добу відбувалося підвищення вмісту даного показника в 1,37 раза порівняно з показниками за ЛОС 2 (рис. 3.19).

Фактори росту фібробластів (ФРФ) – це велике сімейство структурно схожих поліпептидів, які стимулюють мітоз багатьох різних типів клітин. Фактор росту фібробластів стимулює поділ фібробластів, судинних ендотеліальних клітин та кератиноцитів *in vitro*, формування нових судин та утворення грануляційної тканини [208].

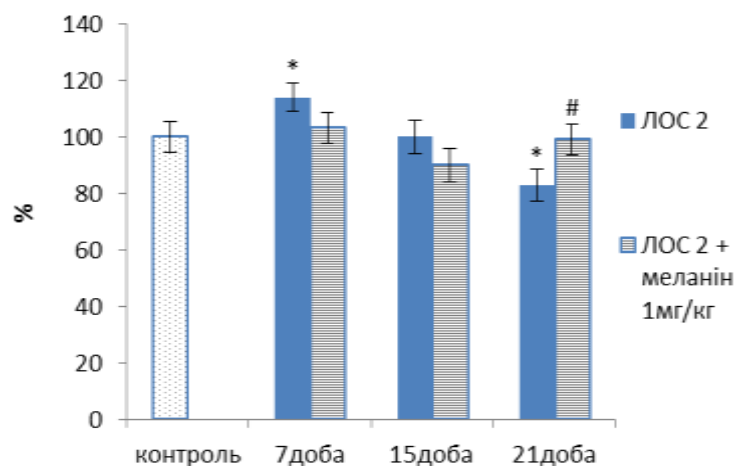


Рис. 3.20. Вміст фактору росту фібробластів в слизовій оболонці стравоходу щурів за умов ЛОС 2 та за введення меланіну ( $M \pm m$ ,  $n=10$  для кожної групи), \* -  $p < 0,05$  по відношенню до контролю; # -  $p < 0,05$  по відношенню до опіку

Фактор росту фібробластів є одним з первинних стимулів зростання неоваскуляризації грануляційної тканини, сприяють загоєнню ран і опіків,

ранні активації фактора росту фібробластів у багатьох спостереженнях запобігають виникненню сепсису, а також прискорюють загоєння опікових ран [209, 210].

Тому, доцільним було визначити рівень ФРФ в тканинах стравоходу за умов ЛОС 2 та при застосуванні меланіну. За ЛОС 2 рівень ФРФ знижувався на 21 добу в 1,2 раза порівняно з контролем. За введення меланіну на 21 добу рівень ФРФ підвищувався в 1,2 раза порівняно з показниками за ЛОС 2 та наближався до контрольних значень (рис. 3.20).

Також, було проведено аналіз ензимограми слизової оболонки стравоходу, що показав наявність білкових фракцій з молекулярними масами 92 та 20 кДа за умов ЛОС 2 та при застосуванні меланіну (рис. 3.21).

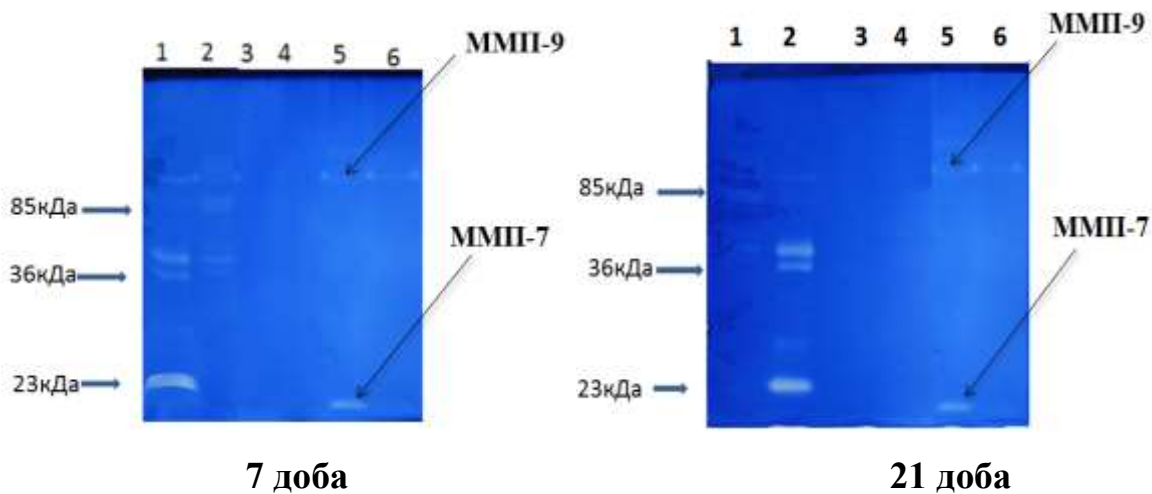


Рис. 3. 21. Ензимограма матриксних металопротеїназ в слизовій оболонці стравоходу за умов ЛОС 2 та за застосування меланіну  
1, 2-маркери; 3,4-контроль; 5- ЛОС 7д.; 6- ЛОС 7д + меланін

Білкова фракція з М.м. 92 кДа, ймовірно, відповідає ММП-9, що відноситься до класу желатиназ. ММП-9, або желатиназа В, має високу спорідненість до денатурованого колагену (желатину), але також здатна розщеплювати нативний колаген VI, V і XI типів, еластин. В залежності від місця розщеплення цих молекул ММП-9 може знижувати або підвищувати їх

біологічну активність [211, 212, 213]. Було показано, що за умов ЛОС 2 спостерігається наявність фракції, що може відповідати ММП-9 на всі досліджувані доби експерименту порівняно з контрольними значеннями, за введення меланіну активність ММП-9 знижувалась.

Також, на ензимограмі була виявлена фракція з М.м. 28 кДа, що може відповідати металопротеїназі-7 яка відноситься до класу матрилізинів. Активність ММП-7 була висока на 7 та 21 добу експерименту, за умов введення меланіну ми не спостерігали активність ММП-7 на 7 та 21 добу. Дана металопротеїназа одна з найменших мелатопротеїназ, що складається з про-домену та каталітичного домену. ММП-7 експресується за нормальних та патологічних умов [214]. Нещодавні дослідження вказують, що ММП-7 є одним з первинних прогностичних маркерів ракового переродження тканин стравоходу. Були проведені дослідження, в яких показано, що при злоякісних переродженнях клітин стравоходу достовірно підвищується експресія та активність ММП-7 [215, 216].

Таким чином, представлені дані показують, що за умов лужного опіку стравоходу відбувається порушення балансу між протеїназами та їх інгібіторами в плазмі крові. Показано зростання протеолітичної активності та активності інгібіторів протеїназ. Виявлено збільшення низькомолекулярних форм плазміну, що може свідчити про надмірну його активацію. Меланін в дозі 1мг/кг знижував активність протеїназ та їх інгібіторів. Аналіз молекулярних механізмів регуляції протеолітичних систем організму за умов опіку стравоходу, дозволить більш точно оцінювати ступінь опіку, можливі ускладнення та проводити більш точний моніторинг перебігу хвороби та ефективності лікування.

Ендогенна інтоксикація є одним з найважливіших критеріїв, що визначають важкість стану людини [217]. Причини розвитку синдрому умовно можна розділити на дві групи. Насамперед, це деструктивні процеси, в результаті яких в організмі людини накопичується надмірна кількість

проміжних і кінцевих продуктів обміну речовин, які викликають токсичну дію на найважливіші системи життєзабезпечення. Друга група - це порушення функціонального стану фізіологічних систем організму, відповідальних за зв'язування, інактивацію і елімінацію як природних метаболітів, так і токсичних продуктів.

При інтоксикації розрізняють токсини різної природи: специфічні, неспецифічні, медіатори імунних реакцій та ін. Специфічні токсини, які надходять з опікової рани є за своїм походженням денатурованими білками, фрагментами білкових молекул та комплексами ферментів з їх інгібіторами [218, 219]. Відомо, що рівень молекул середньої маси варіює залежно від метаболічного стану організму і, в якійсь мірі, слугує прогностичним критерієм порушення обмінних процесів [218].

Тому, доцільно було визначити вміст показників які з'являються в надмірних кількостях при синдромі ендогенної інтоксикації в крові та тканинах стравоходу та печінки, що може виникнути внаслідок лужного опіку стравоходу та оцінити яким чином меланін впливає на показники ендогенної інтоксикації за умов ЛОС 2.

До неспецифічних токсинів відносять МСМ, що утворюються при протеолітичному розщепленні білків плазми, біогенні аміни, компоненти кінінової системи, простагландини, ендоперекиси ліпідів, гідролази клітинного походження та ін. Рівень цих речовин є скринінгом азотемії, показником ступеня інтоксикації, уремії, і в цілому характеризує функціональний стан нирок [220, 221]. Аналіз проведених досліджень показав, що ЛОС 2 викликає підвищення рівня МСМ, за введення меланіну відбувалось зниження рівня МСМ.

За умов ЛОС 2 концентрація МСМ зростала в усіх досліджуваних зразках переважно на 7 добу, в сироватці крові на 42,1%, в тканинах стравоходу на 28,3%, порівняно з контрольними значеннями. Встановлено, що за введення меланіну відбувалось зниження концентрації МСМ на 7 добу в сироватці крові

на 51,6% та в слизовій оболонці стравоходу на 7,4% порівняно з показниками за ЛОС 2 (рис. 3.22).

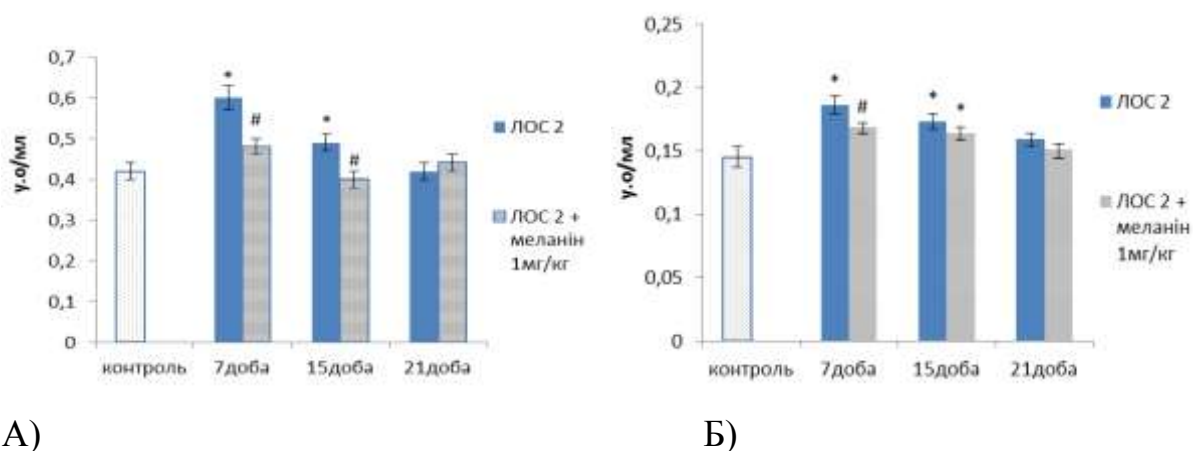


Рис. 3. 22. Вміст МСМ у сироватці крові (А) та слизовій оболонці стравоходу (Б) щурів за ЛОС 2 та за введення меланіну щурам з ЛОС 2;  $M \pm m$ ,  $n=10$  для кожної групи, \* –  $p < 0,05$  порівняно з контролем; # –  $p < 0,05$  порівняно з групою ЛОС 2

В ході дослідження опіку стравоходу встановлено підвищений рівень специфічних токсинів, а саме олігопептидів у сироватці крові, тканинах слизової оболонки стравоходу, введення меланіну в сприяло зниженню даного показника.

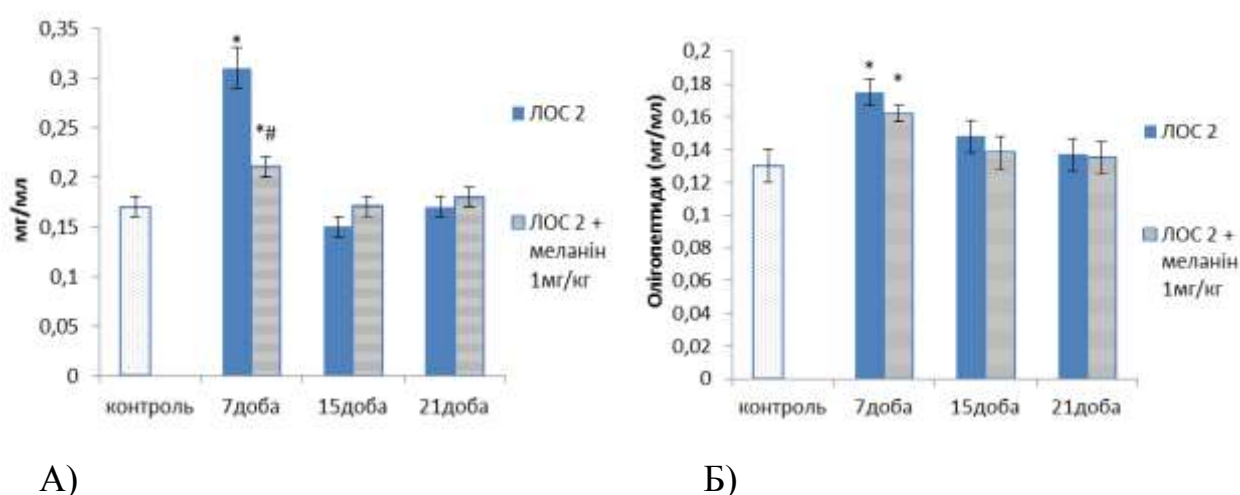


Рис. 3. 23. Концентрація олігопептидів у сироватці крові (А) та слизовій оболонці стравоходу (Б) щурів за ЛОС 2 та за введення меланіну щурам з ЛОС 2;  $M \pm m$ ,  $n=8$  для кожної групи, \* –  $p < 0,05$  порівняно з контролем; # –  $p < 0,05$  порівняно з групою ЛОС 2

Концентрація ОП за умов ЛОС 2 зростала в усіх досліджуваних зразках особливо на 7 добу, в сироватці крові на 82%, в тканинах стравоходу на 34,6%, порівняно з контрольними значеннями. Було показано, що за введення меланіну відбувалося зниження концентрації ОП на 7 добу в сироватці крові на 51,6% та в тканинах стравоходу на 7,4% порівняно з показниками за ЛОС 2 (рис. 3.23).

Таким чином, показано що за умов ЛОС 2 відбувається підвищення рівня МСМ та ОП у всіх досліджуваних зразках, максимальне підвищення даних показників спостерігається на 7 та 15 добу дослідження, що відповідає стадії токсемії та септикотоксемії. Підвищення концентрації МСМ та ОП може пояснюватись надмірною активацією протеолітичних процесів, що спричинює надмірне утворення різноманітних білків, фрагментацією білкових молекул внаслідок посилення окиснювальної модифікації білків, так і як компенсаторна реакція організму на патологічний процес.

Отже, було показано цитопротекторний вплив меланіну за рахунок зниження процесів ПОЛ та підвищення активності СОД, меланін впливав на продукцію цитокінів та нормалізував процеси протеолізу після ЛОС 2. Також меланін знижував експресію прозапальних генів *Ptgs2* та *Tgfb1*. Таким чином, можна припустити, що меланін має протизапальні та цитопротекторні властивості та має позитивний вплив на процеси загоєння.

## УЗАГАЛЬНЕННЯ ОТРИМАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ

За останні роки значно збільшилась частота опіків стравоходу різними хімічними речовинами. Дані статистики вказують, що опіки займають третє місце серед причин летальності у дітей до 3-х років. Після хімічного опіку у дітей в зв'язку з незрілістю тканинних структур стравоходу можуть виникнути ускладнення навіть при першому ступені опіку стравоходу. На сьогоднішній день, більшість досліджень присвячена саме зовнішнім опікам, тема внутрішніх опіків є недостатньо досліджена [1,2,4].

Після хімічного опіку у дітей у зв'язку з незрілістю тканинних структур стравоходу можуть виникнути ускладнення навіть при першому ступені опіку стравоходу. В клінічній медицині найчастіше відбувається механічне перенесення закономірностей перебігу опікової хвороби у дорослих в дитячу клініку, що не завжди відповідає дійсності тому, щоб знайти нові ефективні методи лікування, потрібно знати яка різниця між механізмами загоєння опіків стравоходу у дітей та дорослих [3, 4].

Ускладнення при загоєнні хімічного опіку стравоходу залежно від терміну виникнення, діляться на ранні (перфорація стравоходу, ерозії верхніх відділів шлунково-кишкового тракту, внутрішньо судинний гемоліз, аспіраційна пневмонія, сепсис) та пізні (рубцевий стеноз стравоходу, нервово-психічні розлади). Уникнути розвитку ускладнень дозволяє комплексний підхід в лікуванні, своєчасна та повноцінна терапія в гострому періоді хвороби, планомірний контроль перебігу захворювання в динаміці. До того ж, важливим є визначення точного ступеня ураження стравоходу, але навіть на основі результатів проведених ендоскопічних досліджень це інколи буває складно. Для встановлення точного ступеня ураження потрібні повторні ендоскопічні обстеження та ретельне спостереження в динаміці лікування. Ряд досліджень зосереджені на пошуку біомаркерів, які утворюються на різних стадіях опіків, а

результати таких досліджень сприяють більш глибокому розумінню механізмів загоєння ран [5, 6, 8, 9].

Хімічні опіки супроводжуються запальною реакцією, розвитком синдрому ендогенної інтоксикації та порушенням про/антиоксидантної системи. Внаслідок чого відбувається порушення репаративних процесів в тканинах стравоходу та перехід процесу ранового загоєння в хронічну форму, з формуванням надлишкової грануляційної тканини, часто з розвитком надмірного фіброзу, що веде до рубцевої контрактури і втрати повноцінних функцій органу [42, 43, 125].

Основною метою при лікуванні хімічних опіків стравоходу є запобігання утворенню рубцевої стриктури, зниження інтенсивності перебігу запального процесу та бактеріальної транслокації в тканини стравоходу. Основними загальноприйнятими методами лікування є застосування стероїдних препаратів, антирефлюксна терапія, різноманітні комбінації антибіотиків, а на більш пізніх періодах - розширення стравоходу (бужування), стентування, міотомія, які застосовуються для запобігання утворенню патологічного звуження стравоходу. На сьогодні, на фармацевтичному ринку препарати для лікування опіків мають вузько направлену дію, більшість з яких мають тільки антимікробну активність, але не впливають на процес загоєння рани. Крім того, ці засоби часто є токсичними для інтактних клітин, і можуть викликати алергічні реакції [12, 13, 14].

А отже, на сьогоднішній день, вкрай необхідним є деталізація процесу загоєння та пошук біомаркерів, які утворюються на різних стадіях опікової хвороби, що може сприяти більш глибокому розумінню механізмів загоєння ран, так і більш тонкому прогнозуванню виникнення післяопікових ускладнень. До того ж, такі дослідження мають і значне практичне значення, так як не дивлячись на значний прогрес у розвитку сучасної фармакології та наявного широкого арсеналу лікарських засобів для лікування опіків, необхідність у створенні нових препаратів залишається досить актуальною.

Перспективним є використання природних нетоксичних антиоксидантів в якості цитопротекторів. Лікарські рослини, багаті фенольними сполуками потенційно можуть впливати на прискорення загоєння опікових ран і захищати рану від бактеріальних інфекцій [78, 79, 80]. Аналіз сучасної літератури дозволяє стверджувати, що можливими перспективними засобами нормалізації процесу загоєння при хімічних опіках стравоходу є речовини природного походження на основі поліфенольних сполук. Однією з таких речовин є меланін продуцентом якого є дріжжеподібні гриби *Nadsoniella nigra* штам X1, що висіяні із зразків вертикальних скель о. Галіндез (Українська антарктична станція «Академік Вернадський»). В літературі є лише поодинокі згадки про вплив меланіну на процеси загоєння при зовнішніх опіках [19]. Але, при дослідженні впливу меланіну на інші патології було показано, що він володіє антиоксидантними властивостями, цитопротекторними, стреспротекторними, вираженою профілактично-лікувальною дією на розвиток виразакових уражень у слизовій оболонці шлунка [20, 21, 72, 77]. Таким чином, ми припустили, що меланін міг мати позитивний вплив на процеси загоєння при хімічному опіку стравоходу та поєднував би в собі універсальні властивості попереджуючи розвиток після опікових ускладнень.

Одним з основних діагностичних критеріїв тяжкості ЛОС є визначення біохімічних показників сироватки крові, що корелює з функціональним станом організму та ступенем метаболічних порушень за умов досліджуваної патології [110, 111].

Тому, на першому етапі наших досліджень ми провели визначення основних біохімічних показників в сироватці крові за умов ЛОС та при застосуванні меланіну. Згідно отриманих нами результатів, було показано, що за ЛОС спостерігалось зниження концентрації загального білка та альбуміну, підвищення продуктів азотистого обміну сечовини та креатиніну, підвищення активності АСТ, АЛТ та лужної фосфатази, змінювались показники іонного обміну. За введення меланіну відбувалося підвищення концентрації загального

білка та альбуміну, що може свідчити про його відновлюючу функцію на клітини печінки, зниження концентрації сечовини та креатиніну, що може свідчити про нормалізацію функцій нирок, знижувалась активність печінкових ферментів АСТ, АЛТ та лужної фосфатази, а також відбувалася нормалізація іонного обміну що може свідчити про його відновлюючу функцію на клітинну мембрану.

Для підтвердження ступеня опіку а також для оцінки впливу меланіну на процеси загоєння після опіку стравоходу було проведено гістологічне дослідження.

Після моделювання ЛОС 2 у відповідній групі спостерігалися ураження слизової оболонки (епітелію, власної пластинки) та м'язової оболонки стравоходу щурів, активне запалення, що проявлялось у збільшенні інфільтрації лейкоцитами на 1 добу досліджень, порівняно з контрольними щурами. При дослідженні гістологічних зразків на 7 добу у групах з ЛОС 2 виявили продовження активного запалення та присутність інфільтрації лейкоцитами, окрім цього відбувалося патологічне приростання серозної оболонки стравоходу до тканин трахеї. За введення меланіну було помітне зниження інфільтрації лейкоцитами всіх 3-х оболонок стравоходу та як наслідок нижчий рівень запалення порівняно з показниками у тварин з ЛОС 2.

На 15 добу за ЛОС 2 зафіксували зниження загальної лейкоцитарної інфільтрації, а за умов введення меланіну присутність лейкоцитів було повністю знівельована. Також, за ЛОС 2 на 15 добу спостерігали хаотичне укладання і збільшення волокон колагену в підслизовій основі стравоходу, що може бути передумовою патологічного процесу загоєння та початковою фазою розвитку фіброзу, причому при застосуванні меланіну відмічали подібне депонування колагенових волокон в меншій мірі.

На 21 добу досліджень, за ЛОС 2 було відзначено відновлення цілісності епітелію слизової оболонки, залишкову інфільтрацію лейкоцитами та збільшення шару підслизової оболонки, яке відбувається за рахунок

патологічного розростання екстрацелюлярного матриксу, тобто варто зазначити, що повноцінної регенерації стравоходу не відбувалось. У групах з ЛОС 2 при застосуванні меланіну відбувалося майже повне відновлення уражених тканин з незначним розростанням сполучної тканини в підслизовій основі.

Оксидативний стрес є однією із причин ускладнень процесів загоєння за опіків [127, 130]. Проведені нами дослідження виявили та довели, що за ЛОС відбувається підвищення вмісту продуктів перекисного окиснення (ТБК-активних речовин, малонового діальдегіду), знижувалась активність СОД та підвищувалась активність синтази оксиду азоту (індуцибельної та ендотеліальної), що може свідчити про надмірну продукцію активних форм кисню, на фоні зниженої активності СОД та пошкодження клітинних мембран. При застосуванні меланіну відбувалося зниження вмісту продуктів перекисного окиснення а також підвищення активності СОД і зниження активності ендотеліальної та індуцибельної синтази оксиду азоту, що може вказувати на менше пошкодження клітинних мембран а отже і швидші процеси загоєння.

За опіків відбувається активація імунної ланки, що характеризується в першу чергу змінами рівня прозапальних цитокінів [147, 149, 151]. Було показано підвищення вмісту прозапальних цитокінів за умов ЛОС 2, а також IgG показники якого перевищували контроль на 126,7%, такі високі показники можуть свідчити про хронічний запальний процес при опіку стравоходу. Вміст протизапальних цитокінів знижувався за умов ЛОС 2. Рівень цитокінів при опіковій травмі розглядається як патофізіологічна ланка ураження органів та розвитку поліорганної недостатності та сепсису. У зв'язку з цим, доцільною є імунологічна і метаболічна корекція в лікуванні опікових хворих. При застосуванні меланіну відбувалося зниження запального процесу знижувався вміст прозапальних цитокінів а також IgG та підвищувався вміст протизапальних цитокінів, що характеризує процес загоєння.

Наступним етапом нашого дослідження було підтвердити наявність запального процесу на рівні експресії прозапальних генів та визначити як впливає на ці процеси меланін за ЛОС 2.

Фермент каскаду арахідонової кислоти циклооксигеназа / ендопероксид синтаза простагландину (*Cox / Ptgs 1 & 2*) генерує простагландини, які є медіаторами запалення, відіграють роль у формуванні рубців та уповільнюють загоєння рани. *Ptgs1* є конститутивною ізоформою, тоді як *Ptgs2* є індукційною та активується при запальних процесах [168, 169]. При надмірній експресії та активації трансформаційного фактору росту бета (*Tgfb*) відбувається утворення рубцевої тканини. В нормі *Tgfb* контролює широкий спектр клітинних реакцій, включаючи диференціювання, клітинну проліферацію, міграцію, апоптоз, позаклітинну реконструкцію та розвиток позаклітинного матриксу [170, 171].

Були отримані дані щодо рівня експресії генів циклооксигенази *Ptgs2* ферменту який активує синтез простагландинів та трансформуючого фактору росту *Tgfb1* який впливає на процеси загоєння рани, але при надмірній активації відповідає за утворення фіброзної тканини. Рівень експресії генів *Ptgs2* та *Tgfb1* був підвищеним за умов ЛОС, що свідчить про активний запальний процес. При застосуванні меланіну спостерігалось зниження рівня експресії досліджуваних генів і вже на 15 добу наближення до контрольних значень.

Зважаючи на вищезазначені результати представляє певний інтерес дослідження потенційних змін білкового складу сироватки крові та протеолітичного потенціалу стравоходу та плазми крові, як факторів, що можуть коректувати процес загоєння опіків стравоходу.

При аналізі електрофореграми сироватки крові у щурів за умов ЛОС 2 та при застосуванні меланіну не виявлено якісних змін білкових фракцій, але були встановлені їх кількісні зміни. На електрофореграмі білкового складу сироватки крові в контрольних зразках та пробах отриманих від тварин з ЛОС 2 та за введення меланіну спостерігалися фракції з М.м. від 15 до 168 кДа. Було

показано, що за умов ЛОС 2 спостерігалось прогресуюче зростання фракцій з М.м 168 та 150 кДа на всі доби експерименту, особливо високий вміст був на 21 добу, що перевищував контрольні значення в 2 рази для фракції М.м 168кДа та в 2 рази для фракції з М.м 150 кДа. При застосуванні меланіну відзначалося зниження вмісту фракцій з М.м. 168 та 150 кДа як порівняно з ЛОС 2 так, і порівняно з контрольними значеннями. Фракція з М.м. 67 кДа, що можливо відповідає альбуміну за ЛОС 2 вміст якої знижувався на всі досліджувані доби так, на 7 добу вміст був нижчим за контрольні значення на 54%, за введення меланіну відзначалося менш виражене зниження даної фракції порівняно з контролем, а також підвищення вмісту даної фракції в 2,3 рази на 7 добу порівняно з показниками за ЛОС 2. Зміни вмісту фракцій з М.м 55, 40, 25 та 15 кДа мали різну динаміку як за умов ЛОС 2 так і при застосуванні меланіну. Вміст фракції з М.м. 40 кДа знижувався на 7 та 21 добу за умов ЛОС 2 в 3 рази порівняно з контролем. За умов ЛОС 2 фракція з М.м. 25 кДа знижувалась на 15 добу в 1,7 рази та на 21 добу в 4,4 рази порівняно з контрольними значеннями.

Синтез екстрацелюлярного матриксу та колагену залежить від активності процесів протеолізу а також від активності інгібіторів протеолізу, при порушеннях балансу між ферментами та їх інгібіторами може виникнути патологічне загоєння. Опікова рана схильна до хронізації в зв'язку з довготривалим запальним процесом та високою протеолітичною активністю [177, 179]. Дослідження останніх років показали, що хронічні рани містять багато нейтрофілів, які секретують желатинази і еластази, що призводить до надмірної деградації і інактивації ранових чинників зростання. Незважаючи на те, що роль дисбалансу протеїназ-інгібіторної системи у розвитку опікових та післяопікових ускладнень активно досліджується, препарати для її цільової корекції за опіків до теперішнього часу не розроблені і стан протеїназ не враховується при проведенні фармакотерапії [182, 184, 185].

У ході дослідження протеолітичної ланки було показано, що за ЛОС 2 відбувається зростання протеолітичної активності, активності серинових та

матриксних металопротеїнах, висока активність яких на 15 добу може свідчити про активний процес відновлення ранової поверхні, тоді як високі показники на 21 добу свідчать про патологічний процес загоєння та перехід запального процесу в хронічну форму. Відмічено підвищення концентрації трипсиноподібних ферментів, аналізуючи склад яких було відмічено значну кількість низькомолекулярних похідних плазміну, що утворились внаслідок деградації схильного до автолізу плазміну.

Було досліджено активність інгібіторів протеолітичних ферментів  $\alpha 2$ -МГ та  $\alpha 1$ -АТ, виявлено, що за ЛОС 2 відбувається зростання активності досліджуваних інгібіторів. Підвищення загальної протеолітичної активності в плазмі крові щурів впродовж експерименту зумовлює компенсаторне підвищенням активності сироваткових інгібіторів. Підвищення активності  $\alpha 2$ -МГ може також свідчити про запальний процес. Але слід зазначити, що за розвитку ЛОС 2 ступеня відбувається підвищення активності  $\alpha 2$ -МГ та активності серинових та металопротеїназ на 21 добу експерименту, що може свідчити про хронічний запальний процес, який розвивається у відповідь на пошкодження. За введення меланіну активність протеолітичних ферментів та їх інгібіторів знижувались та наближались до контрольних. Отримані дані можуть свідчити про вплив меланіну на нормалізацію процесів загоєння.

Вище було показано, що за ЛОС 2 відбувається активація прозапальних цитокінів, підвищене утворення вільних радикалів а також зростання протеолітичної активності, тому цікаво було визначити як змінюється активність ММП за ЛОС 2 ступеня а також як меланін впливає на активність ММП. Аналіз показників вмісту матриксних металопротеїназ показав значне підвищення вмісту ММП як в сироватці крові так і в тканинах стравоходу, зниження вмісту ТІМП-1 та фактору росту фібробластів. При застосуванні меланіну відбувалося зниження вмісту ММП та підвищення вмісту ТІМП-1 та фактору росту фібробластів.

Також, отримані результати показали, що за ЛОС 2 утворюється на 7 та 21 добу фракція з М.м. 28 кДа, що може відповідати ММП-7 яка відноситься до класу матрилізинів. Нещодавні дослідження вказують, що ММП-7 є одним з первинних прогностичних маркерів ракового переродження тканин стравоходу. Були проведені дослідження, в яких показано, що при злоякісних переродженнях клітин стравоходу достовірно підвищується експресія та активність ММП-7 [215, 216]. За умов застосуванні меланіну даної фракції не спостерігалось.

В ході дослідження опіку стравоходу встановлено підвищений рівень специфічних токсинів, а саме олігопептидів та молекул середніх мас, що свідчать про ендogenous інтоксикацію за ЛОС 2. При застосуванні меланіну спостерігалось зниження рівня ендogenous токсинів.

Отже, було показано цитопротекторний вплив меланіну за рахунок зниження процесів ПОЛ та підвищення активності СОД, меланін впливав на продукцію цитокінів та нормалізував процеси протеолізу після ЛОС 2. Також меланін знижував експресію прозапальних генів *Ptgs2* та *Tgfb1*. Таким чином можна припустити, що меланін володіє протизапальними та цитопротекторними властивостями та має позитивний вплив на процеси загоєння.

## ВИСНОВКИ

Результати, отримані у дисертаційній роботі, поглиблюють існуючі уявлення про біохімічні особливості процесів загоєння лужного опіку стравоходу та показують перспективність використання меланіну, як речовини, що сприяє загоєнню опіку стравоходу.

1. Встановлено, що за умов ЛОС 2 відбуваються зміни ключових біохімічних показників у сироватці крові та спостерігається порушення про-антиоксидантної рівноваги у бік інтенсифікації вільнорадикальних процесів. Так, відзначалося підвищення вмісту дієнових кон'югатів (в 6,6 раза), iNOS активності (в 1,4 раза) та знижувалась СОД активність (в 1,9 раза).

2. Виявлено, що за умов ЛОС 2 у сироватці крові та слизовій оболонці стравоходу підвищувався вміст прозапальних (ІЛ-12 у 1,7 раза; ІЛ-6 у 1,8 раза) та знижувався вміст протизапальних (ІЛ-10 у 1,5 раза; ІЛ-4 у 1,4 раза) цитокінів. Спостерігалось підвищення вмісту імуноглобулінів класу G у 2,3 раза на 21 добу.

3. Показано підвищення рівня експресії залучених до розвитку запалення генів *Ptgs2* та *Tgfb1* у крові (в 3,1 раза та 3 раза, відповідно) та тканинах стравоходу (в 6 раза та 6,9 раза, відповідно) за умов ЛОС 2.

4. Визначено, що за умов ЛОС 2 у сироватці крові та слизовій оболонці стравоходу значно зростали активність протеолітичних ферментів (в 2,4 раза на 15 добу), концентрація трипсино-подібних серинових протеїназ (в 1,7 раза на 7 добу), вміст матриксних металопротеїназ та активність інгібіторів протеолітичних ферментів ( $\alpha$ 1-антитрипсин в 1,9 раза на 15 добу,  $\alpha$ 2-макроглобулін в 1,9 раза на 21 добу). Знайдено значне зростання кількості деградованих форм плазміногену/плазміну в плазмі крові та певні зміни якісного складу білків в сироватці крові.

5. За застосування меланіну відзначалася нормалізація біохімічних показників та швидші терміни відновлення ушкоджених тканин стравоходу, зниження концентрації продуктів ПОЛ (ТБК-активних речовин в 2,5 раза) та

підвищення СОД активності (в 1,3 раза), зниження вмісту прозапальних цитокінів (ІЛ-12 в 1,6 раза; ІЛ-6 в 1,3 раза) та підвищення вмісту протизапальних цитокінів (ІЛ-10 в 1,5 раза; ІЛ-4 в 1,5 раза), порівняно з показниками за умов ЛОС 2.

6. Спостерігалось зниження активності протеолітичних процесів в сироватці крові та слизовій оболонці стравоходу за введення меланіну, а також знижувалися рівень експресії генів *Ptgs2* та *Tgfb1* у крові (в 1,4 та 1,4 раза, відповідно) та тканинах стравоходу (в 1,7 та 2,3 раза, відповідно) порівняно з показниками за умов ЛОС 2.

**СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ**

1. Дігтяр В. А., Барсук О. М., Камінська М. О., Гладкий О. П., Галаган А. А. Лікування хімічних опіків стравоходу у дітей. *Paediatric Surgery*. 2017; 3(56): 54-56.
2. Dash S., Bhojani J., Sharma S. A Rare Case of Anal and Perianal Chemical Burn in a Child due to Potassium Permanganate Crystals Drug. *Saf Case Rep*. 2018 Dec; 5: 10-15.
3. Moore, E., Bennet, K., Dietrich, M. & Wells, N. The Effect of Directed Medical Play on Young Children's Pain and Distress During Burn Wound Care. *Journal of Pediatric Health Care*. 2015; 29(3): 265–273.
4. Dhopte A., Tiwari V. K., Patel P., Bama R. Epidemiology of pediatric burns and future prevention strategies—a study of 475 patients from a high-volume burn center in North India. *Burns Trauma*. 2017; 5: 1.
5. Brown TS., Safford S., Caramanica J., Elster EA. Biomarker use in tailored combat casualty care. *Biomark Med*. 2010; 4: 465–73.
6. Chromy BA, Eldridge A, Forsberg JA, Brown TS, Kirkup BC, Jaing C, et al. Wound outcome in combat injuries is associated with a unique set of protein biomarkers. *J Transl Med*. 2013; 11: 281.
7. Hahm G., Eldridge A., Forsberg JA., Brown TS., Kirkup BC., Elster E., et al. Proteomic sample preparation for blast wound characterization. *Proteome Sci*. 2014; 12: 10.
8. Hyland EJ., D'Cruz R., Menon S., Chan Q., Harvey JG., Lawrence T., La Hei E., Holland AJ. Prospective, randomised controlled trial comparing Versaje hydrosurgery and conventional debridement of partial thickness paediatric burns. *Burns*. 2015 Jun; 41(4): 700-7.
9. Mirastschijski U., Sander J.T., Zier U., Rennekampff H.O., Weyand B., Vogt P.M. The cost of post-burn scarring. *Ann Burns Fire Disasters*. 2015; 28(3): 215–222.

10. Pastar I., Stojadinovic O., Yin NC., Ramirez H., Nusbaum AG., Sawaya A., et al. Epithelialization in wound healing: a comprehensive review. *Adv Wound Care*. 2014; 3: 445–64.
11. Ribeiro MP, Espiga A, Silva D, Baptista P, Henriques J, Ferreira C, et al. Development of a new chitosan hydrogel for wound dressing. *Wound Repair Regen* 2009; 17: 817-24.
12. Jin Y, Ling PX, He YL, Zhang TM. Effects of chitosan and heparin on early extension of burns. *Burns* 2007; 33: 1027-31.
13. Dai T, Tanaka M, Huang YY, Hamblin MR. Chitosan preparations for wounds and burns: Antimicrobial and wound-healing effects. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2011; 9: 857-79.
14. Travis TE, Mauskar NA, Mino MJ, Prindeze N, et al. Commercially available topical platelet-derived growth factor as a novel agent to accelerate burn-related wound healing. *J Burn Care Res* 2014; 35: 321-9.
15. Liu L, Yu Y, Hou Y, Chai J, Duan H, Chu W, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells transplantation promotes cutaneous wound healing of severe burned rats. *PloS One* 2014; 9: 88348.
16. Liaudanskas M., Viskelis P., Raudonis R., Kviklys D., Uselis N., Janulis V. Phenolic composition and antioxidant activity of *Malus domestica* leaves. *Sci. World J.* 2014; 306217.
17. Bahramsoltani R., Farzaei M.H., Rahimi R. Medicinal plants and their natural components as future drugs for the treatment of burn wounds: An integrative review. *Arch. Dermatol. Res.* 2014; 306: 601–617.
18. Alov P., Tsakovska I., Pajeva I. Computational studies of free radical scavenging properties of phenolic compounds. *Curr. Top. Med. Chem.* 2015; 15: 85–104.
19. Taburets OV., Morgaienko OO., Kondratiuk TO., Beregova TV., and Ostapchenko LI. The Effect of "Melanin-Gel" on the Wound Healing. *RJPBCS*. 2016; 7(3): 2031.

20. Чижанська Н.В., Цирюк О.І., Берегова Т.В. Рівень кортизолу в крові щурів до та після стресу на фоні дії меланіну. Вісник проблем біології і медицини. 2007; 1: 40-44.
21. Голишкін Д. В., Фалалєєва Т. М., Непорада К. С., Берегова Т. В. Вплив меланіну на стан слизової оболонки шлунка та реакцію гіпоталамо-гіпофізарно-наднирковозалозної осі за умов дії гострого стресу. Фізіологічний журнал. 2015; 61 № 2: 65-72.
22. Smolle C., Cambiaso-Daniel J, Forbes A, Wurzer P. Recent Trends in Burn Epidemiology Worldwide: A Systematic Review. *Burns*. 2017; 43(2): 249–257.
23. Міністерство охорони здоров'я України; <http://moz.gov.ua>
24. Contini S, Scarpignato C. Caustic injury of the upper gastrointestinal tract: A comprehensive review. *World J Gastroenterol*. 2013; 19(25): 3918-3930.
25. Arévalo-Silva C, Eliashar R, Wohlgeleinter J, Elidan J, Gross M. Ingestion of caustic substances: a 15-year experience. *Laryngoscope*. 2006; 116: 1422-1426.
26. Hawksworth JS, Stojadinovic A, Gage FA, Tadaki DK, Perdue PW, Forsberg J, et al. Inflammatory biomarkers in combat wound healing. *Ann Surg*. 2009; 250:1002–7.
27. Nahm G, Glaser JJ, Elster EA. Biomarkers to predict wound healing: the future of complex war wound management. *Plast Reconstruct Surg*. 2011; 127: 21–65.
28. Forsberg JA, Potter BK, Polfer EM, Safford SD, Elster EA. Do inflammatory markers portend heterotopic ossification and wound failure in combat wounds? *Clin Orthop Relat Res*. 2014; 472: 2845–54.
29. Widgerow AD, King K, Tussardi IT, Banyard DA, Chiang R, Awad A, et al. The burn wound exudate – an under-utilized resource. *Burns*. 2015; 41:11–7.
30. Vandenplas I. Management of Benign Esophageal Strictures in Children *Pediatr Gastroenterol Hepatol Nutr*. 2017; 20(4): 211–215.
31. Türkyilmaz Z, Sönmez K, Karabulut R, et al. Mitomycin C decreases the rate of stricture formation in caustic esophageal burns in rats. *Surgery* 2009; 145:219-25.

32. Ocakci A, Kanter M, Cabuk M, et al. Role of caffeic acid phenetyl ester, an active component of propolis, against NaOH-induced esophageal burns in rats. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2006; 70: 1731-9.
33. Senturk E, Pabuscu E, Sen S, et al. Comparison of mitomycin-c and heparin affects in experimental corrosive esophagitis on rats. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2011; 75:785-9.
34. Kay M, Wyllie R. Caustic ingestions in children. *Curr Opin Pediatric* 2009; 21: 651-4.
35. Nakajima Y., Nakano Y., Fuwano S. et al., "Effects of three types of Japanese honey on full-thickness wound in mice," *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013; 11.
36. Neub A., Houdek P., Ohnemus U., Moll I., and Brandner J. M., "Biphasic regulation of AP-1 subunits during human epidermal wound healing," *Journal of Investigative Dermatology*. 2007; 127 (10): 2453–2462.
37. 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,"*TheScientificWorldJournal*. 2011; 11: 766–787.
38. Nayak B. S., Pinto Pereira L. M., "Catharanthus roseus flower extract has wound-healing activity in Sprague Dawley rats," *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2006; 6, 41.
39. Rawat S., Gupta A. "Development and study of wound healing activity of an ayurvedic formulation," *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2011; 1 (1):. 26–28.
40. Barrientos S., Stojadinovic O., Golinko M. S., Brem H., Tomic-Canic M., "Growth factors and cytokines in wound healing,"*Wound Repair and Regeneration*. 2008; 16 (5): 585–601.
41. Reinke JM, Sorg H. Wound repair and regeneration. *Eur surg res Eur chirurgische Forschung Recherches chirurgicales eu*. 2012; 49: 35–43.

42. Miller MC, Nanchahal J. Advances in the modulation of cutaneous wound healing and scarring. *BioDrugs*. 2005; 19: 363–81.
43. Hettiaratchy Sh., Dziewulski P. Pathophysiology and types of burns. *BMJ*. 2004 Jun 12; 328(7453): 1427–1429.
44. William A. Wells Zones and rings in wound healing. *J Cell Biol*. 2001 Aug 20; 154(4): 675.
45. Vijay MD; Devgan, Lara BA; Bhat, Satyanarayan PhD; Milner, Stephen M. The Pathogenesis of Burn Wound Conversion. *Annals of Plastic Surgery*: 2007; 59 (1): 109-115.
46. Tiwari VK. Burn wound: how it differs from other wounds? *Indian J Plast Surg*. 2012; 45: 364–73.
47. Gurtner GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT. Wound repair and regeneration. *Nature*. 2008; 453: 314–21.
48. Reinke JM, Sorg H. Wound repair and regeneration. *Eur Surg Res*. 2012; 49: 35–43.
49. Daniel T1, Thobe BM, Chaudry IH, Choudhry MA, Hubbard WJ, Schwacha MG. Regulation of the postburn wound inflammatory response by gammadelta T-cells. *Shock*. 2007; 28(3): 278-83.
50. Глуткин А. В., Ковальчук В. И Термический ожог кожи у детей раннего возраста Монография. Гродно ГрГМУ 2016; 180.
51. Andre´ Prauchner C. Oxidative stress in sepsis: Pathophysiological implications justifying antioxidant co-therapy. *Burns*. 2016; 09: 23
52. Yu J, Gao X, Chen X, Jin X, Zhang N, Xue Y, Zhou X. Dynamics of monocyte surface receptors after burns: a pilot study. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2016 Jul-Sep; 30(3): 749-753.
53. Dipietro LA, Reintjes MG, Low QE, Levi B, Gamelli RL. Modulation of macrophage recruitment into wounds by monocyte chemoattractant protein-1. *Wound Repair Regen*. 2001 Jan-Feb; 9(1): 28-33.

54. Werner S, Krieg T, Smola H. Keratinocyte–fibroblast interactions in wound healing. *J Invest Dermatol.* 2007; 127: 998–1008.
55. Gill S.E., Parks W.C. Metalloproteinases and their inhibitors: regulators of wound healing. *Int Journ. Biochem. Cell. Biol.* 2008; 40, № 6 (7): 1334 – 1347.
56. Александрова А.В. Влияние доксицилина на общую протеолитическую активность при экспериментальном лечении термического ожога. *Таврійський медико-біологічний вісн.* 2012; №3, 1(59): 15-17.
57. Sledge G.W. Jr. VEGF-targeting therapy for breast cancer. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia.* 2005; 10 (4): 319 – 323.
58. Шойхет Я. Н., Кореновский Ю.В., Мотин Ю.Г. Роль матриксных металлопротеиназ при воспалительных заболеваниях легких. *Проблемы клинической медицины.* 2008; 3: 99–102.
59. Абаев Ю.К. Биология заживления острой и хронической раны *Медицинские новости.* 2003; 6: 3-10.
60. Widgerow AD. Cellular/extracellular matrix cross-talk in scar evolution and control. *Wound Repair Regen.* 2011; 19: 117–33.
61. Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med.* 1999;341:738.
62. Lo CH, Akbarzadeh S, McLean C, Ives A, Paul E, Brown WA, Cleland H. Wound healing after cultured epithelial autografting in patients with massive burn injury: A cohort study. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2018; 13.
63. Matthew P. R, Leopoldo C. C Burn wound healing and treatment: review and advancements / *Critical Care – 2015; 12*
64. Фісталь Е.Я., Козинець Г.П., Самойленко Г.Є. *Комбустіологія.* 2004; 184.
65. Ocaici A, Kanter M, Cabuk M, et al. Role of caffeic acid phenetyl ester, an active component of propolis, against NaOH-induced esophageal burns in rats. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2006; 70: 1731-9.
66. Kiyani G, Aktas S, Ozel K, et al. Effects of hyperbaric oxygen therapy on caustic esophageal injury in rats. *J Pediatr Surg.* 2004; 39: 1188-93.

67. Türkyilmaz Z, Sönmez K, Karabulut R, et al. Mitomycin C decreases the rate of stricture formation in caustic esophageal burns in rats. *Surgery* 2009; 145: 219-25.
68. Kilincaslan H., Ozgun H., Elif Kilic K. Beneficial Effects of Methylene Blue on the Acute Phase of Corrosive Esophageal Burn in Rats. *European journal of pediatric surgery*. 2014; 7.
69. Greenhalgh D. G. Sepsis in the burn patient: a different problem than sepsis in the general population. *Burns & Trauma*. 2017; 10.
70. Church D, Elsayed S, Reid O, Winston B, Lindsay R. Burn wound infections. *Clin Microbiol Rev*. 2006; 19: 403-34.
71. Jansen JO, Lord JM, Thickett DR, Midwinter MJ, McAuley DF, Gao F. Clinical review: Statins and trauma — a systematic review. *Crit Care* 2013; 17:227.
72. Сенюк О. Ф., Горовой Л. Ф., Паламар Л. А. Влияние меланин-глюканового комплекса, выделенного из грибов трутовика, на продолжительность жизни самок мышей линии ICR. *Пробл. старения и долголетия*. 2014; 23 (1): 11–27.
73. Kazi A., Daniel K.G., Smith D.M., Kumar Q.P. Inhibition of the proteasome activity, a Novel mechanism as sociated with the tumor cell apoptosis in ducing abIlity of genistein. *Biochem. Pharmacol*. 2003; 66: 965–976.
74. Yoo H.G., Lee B.H., Kim J.S., Chun. O.K., S.I. Коо, D.O Kim *Lithospermum erythrorhizo* next ract protects keratinocyte sand fibroblasts agains toxidative stress. *J. Med. Food*. 2014; 17: 1189–1196.
75. Samoylenko A., Hossain J.A., Mennerich D., Kellokumpu S., Hiltunen J.K. Nutritional counter measure star getting reactive oxygen species in cancer From mechanisms to biomarkers and clinical evidence. *Antioxid. RedoxSignal*. 2013; 19: 2157–2196.
76. Andjelković M., Meulenaer B., Depaemelaere G., Socaciu C., Verloo M., Verhe R. Iron chelation properties of phenolic acids bearing catechol and galloyl groups. *FoodChem*. 2006; 98: 23–31.
77. Голишкін Д. В., Фалалеева Т. М., Кухарський В. М., Чижанська Н. В., Берегова Т. В. Вплив меланіну на ураження в слизовій оболонці шлунка щурів,

- викликані методом нервово-м'язового напруження за Сельє. Вісник проблем біології і медицини. 2010; 1: 47-52.
78. Carletti G., Nervo G., Cattivelli L. Flavonoids and Melanins: A Common Strategy across Two Kingdoms. *Int. J. Biol. Sci.* 2014; 10: 1159
79. Watt R, Bothma JP, Meredith P. The supramolecular structure of melanin. *Soft Matter.* 2009; 5:3754-3760.
80. Eisenman HC, Casadevall A. Synthesis and assembly of fungal melanin. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2012; 93: 931–940.
81. Meredith P., Sarna T. The physical and chemical properties of eumelanin *Pigment Cell Res.* 2006; 19, № 6: 572-594.
82. Собко В.М., Мартинюк В.С., Гудкова Д.О. Протекторна дія меланіну на пероксид-індуковане ушкодження та запрограмовану загибель тимоцитів в умовах впливу електромагнітного поля частотою 8 Гц. *Фізика живого.* 2010; 18 (1): 65-70.
83. Дружина М.О., Пухова Г.Г., Бурлака А.П., Жданова Н.М., Сидорик Є.П. Процеси перекисного окиснення в системі крові та їх корекція меланіном у тварин в зоні впливу аварії на Чорнобильській АЕС. *Укр. радіол. журн.* 1994; 4: 271—273.
84. Ozato K, Tsujimura H, Tamura T. Toll-like receptor signaling and regulation of cytokine gene expression in the immune system. *Biotechniques, Suppl.* 2002; 66.
85. Кухарський В.М., Чижанська Н.В., Цирюк О.І. Про залучення рецепторів активації проліферації периксисом гама в механізм антивиразакової дії меланіну, виділеного з антарктичних дріжджів. *Український антарктичний журнал.* 2009; 8: 370-373
86. Резніков О. Г., Соловйов А. І., Добреля Н. В., Стефанов О. В.. Біоетична експертиза до клінічних та інших наукових досліджень, що виконуються на тваринах. 2006; 28.

87. Раєцька Я. Б., Іщук Т. В., Савчук О. М. Експериментальна модель лужного опіку I та II-го ступеню стравоходу у статевонезрілих щурів. Науковий вісник Чернівецького університету. Біологія (Біологічні системи). 2014; 1: 39 – 44.
88. Кишкун А. А. Клиническая лабораторная диагностика: учебное пособие. ГЭОТАР-Медиа, 2010; 971.
89. Медведев В.В. Клиническая лабораторная диагностика – Справочник, Издательство:Гиппократ. 2007; 360.
90. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976; 7: 248–54.
91. Збірник методичних рекомендацій з використання тест наборів фірми виробника «Human». [http://www.human.de/en/productNew/Clinical\\_Chemistry/Reagents\\_and\\_Consumables/Multipurpose\\_Reagents.php](http://www.human.de/en/productNew/Clinical_Chemistry/Reagents_and_Consumables/Multipurpose_Reagents.php)
92. Лилли Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия. М: Мир. 1969; 647.
93. Гаврилов В.Б., Гаврилова А.Р., Хмара Н.Ф. Измерение диеновых конъюгатов в плазме крови по УФ-поглощению гептановых и изопропанольных экстрактов. Лабораторное дело. 1988; 2: 60-63.
94. Орехович В.Н. Современные методы в биохимии. М: Медицина, 1977; 62-68.
95. Чевари С., Чаба И., Секей Й. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологических материалах // Лабораторное дело. 1985; 11: 678-681.
96. Королюк М.А. Метод визначення каталазної активності в біологічному матеріалі. Лабораторна справа. 1988; 31-34.
97. Salter M. Richard G. Knowles, Salvador Moncada. Widespread tissue distribution, species distribution and changes in activity of Ca<sup>2+</sup>-dependent and Ca<sup>2+</sup>-independent nitric oxide synthases. FEBS Letters. 1991; 291, № 1: 145–149.

98. So Chin Y, Kailash N. Pandey, Jin Shi S. Increased activity and expression of Ca<sup>2+</sup>-dependent NOS in renal cortex of ANG II-infused hypertensive rats. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*. 1999; 277, № 5: 797–804.
99. Boyde T.R. Mohammed Rahmatullah. Optimization of conditions for the colorimetric determination of citrulline, using diacetyl monoxime. *Analytical Biochemistry*. 1980; 107 (2): 424–431.
100. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. 1970; 227: 680–685.
101. Савчук О. М. Вивчення білок-білкових взаємодій у системі гемостазу з використанням методу ензим-електрофорезу. *Медична хімія*. 2010; 12, №1: 60–67.
102. Magdeldin S., Moser A. *Affinity Chromatography. Principles and Applications*. Amersham Pharmacia Biotech AB. 2012; 26.
103. Hummel B. C. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*. 1956; 37: 1393–1995.
104. Нартикова В. Ф., Пасхина Т. С. Унифицированный метод определения активности  $\alpha$ 1-антитрипсина и  $\alpha$ 2-макроглобулина в сыворотке (плазме) крови человека. *Вопросы мед. химии*. 1979; 4: 494–499.
105. Габриэлян НИ, Левицкий ЭР, Дмитриев ФФ. Скрининговый метод определения средних молекул в биологических жидкостях. Москва: Медицина. 1985; 35.
106. Crowther J. R. *The ELISA Guidebook*. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc., 2001; 436.
107. Chomczynski P., Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidiniumthiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem*. 1987; 162 (1): 156-159.
108. Брандт З. *Статистические методы анализа наблюдений*. Москва: Мир, 1975; 312.

109. Раєцька Я. Б., Іщук Т.В, Савчук О.М., Остапченко Л.І. Відтворення експериментальної моделі хімічного опіку стравоходу I ступеня у щурів. Медична хімія. 2013; 15, № 4: 30-34.
110. Karaman İ., Orhan Koç, Ayşe Karaman Evaluation of 968 children with corrosive substance ingestion. *Indian J Crit Care Med.* 2015; 19(12): 714–718.
111. Öztörün Cİ., Demir S. The outcomes of becoming a pediatric burn center in Turkey. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg.* 2016; 22(1): 34.
112. Самойленко Г. Е. Ожоги у детей. Здоровье ребенка. 2006; №1.
113. Сухомлин Т.А., Басараб Я.О. Вплив препарату ліпін на показники вуглеводного обміну при опіковій хворобі. Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісник української медичної стоматологічної академії. 2014; 4 (48).
114. Chibishev A, Simonovska N, Shikole A. Post-corrosive injuries of upper gastrointestinal tract. *Prilozi.* 2010;31:297–316.
115. Contini S, Scarpignato C. Caustic injury of the upper gastrointestinal tract: a comprehensive review. *World J Gastroenterol.* 2013;19:3918–3930.
116. Gökakın AK, Atabey M, Deveci K, Sancakdar E. The effects of sildenafil in liver and kidney injury in a rat model of severe scald burn: a biochemical and histopathological study. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg.* 2014 Sep;20(5):319-27
117. Brenner M., Hearling. V.G. The protective role of melanin against UV damage in human skin. *Photochem Photobiol.* 2008; 84(3): 539-549.
118. Романовская В.А., Таширев А.Б., Шилин С.О., Черная Н.А. Устойчивость к УФ излучению микроорганизмов, изолированных из наскальных биотопов Антарктики. *Мікробіологічний журн.* 2010; 72, № 3: 8–14.
119. Racca S. A. Spaccamiglio, P. Esculapio, G. Abbadessa, L. Cangemi, F. DiCarlo, et al. Effects of swim stress and alpha-MSH acute pre-treatment on brain 5-HT transporter and corticosterone receptor. *Pharmacol Biochem Behav.* 2005; 81(4): 894-900.

120. Chornenka N. M., Raetska YA.B, Savchuk O. M., Torgalo E.O., Beregova T. V., Ostapchenko L.I. Correction Parameters of Endogenous Intoxication in Experimental Burn Disease at the Stage of Toxemia. RJPBCS. 2016; 7(5): 1042.
121. Голишкін Д. В., Фалалєєва Т. М., Чижанська Н. В., Берегова Т. В., Остапченко Л. І. Особливості лейкоцитарної формули крові щурів за умов стрес-індукованих ерозивно-виразакових уражень шлунка та профілактичного введення меланіну. Український антарктичний журнал. 2015; 14: 114.
122. Gokakin A. K., K. Deveci, A. Kurt, BC. Karakus, C. Duger. The protective effects of sildenafil in acute lung injury in a rat model of severe scald burn: A biochemical and histopathological study. Burns. 2013; 39: 1193.
123. Чорненька Н., Раєцька Я., Савчук О., Остапченко Л. Біохімічні зміни в сироватці крові щурів за умов експериментальної опікової хвороби та їх корекція меланіном. Проблеми регуляції фізіологічних функцій. 2016; 2(21): 44-49.
124. Yi Songa, Rui Zengb, Lingli Hua, Katherine G. In vivo wound healing and in vitro antioxidant activities of *Bletilla striata* phenolic extracts. Biomedicine & Pharmacotherapy. 2017; 93: 451–461.
125. Акымышын, М.М., Кuz'mina, N.V., Sachko, R.G. Актывність ензимів антиоксидантного захисту в репродуктивних органах корів за норми та патології. Nauk. visnyk LNUVMBT im. S.Z. G'zhyts'kogo. L'viv. 2014; 2(59): 3–9.
126. Lavryshyn Y., Varkholyak I.S. The biological significance of the antioxidant defense system of animals body Y Scientific Messenger LNUVMBT named after S.Z. Gzhytskyj. 2016; 2 (66): 18.
127. Netyukhailo L.G., Sukhomlin T.A., Basarab Ya.A., Bondarenko V.V., Kharchenko S.V. The state of the antioxidant system of the internal organs in rats during burn disease. Bulletin of Siberian Medicine. 2014; 13(3): 51–56.
128. Carletti G., Nervo G., Cattivelli L. Flavonoids and Melanins: A Common Strategy across. Two Kingdoms. Int. J. Biol. Sci. 2014; 10.

129. Pourcel L, Routabout JM, Cheynier V, Lepiniec L, Debeaujon I. Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions. *Trends Plant Sci.* 2007; 12:29–36.
130. Parihar A1, Parihar MS, Milner S, Bhat S. Oxidative stress and anti-oxidative mobilization in burn injury. *Burns.* 2008 Feb;34(1):6-17.
131. Horton JW. Free radicals and lipid peroxidation mediated injury in burn trauma: the role of antioxidant therapy. *Toxicology.* 2003 Jul 15;189(1-2):75-88.
132. Latha B., Babu M. The involvement of free radicals in burn injury: a review. *Burns.* 2001 Jun; 27(4): 309-17.
133. Netyukhailo L.G., Sukhomlin T.A., Basarab Ya.A., Bondarenko V.V., Kharchenko S.V. The state of the antioxidant system of the internal organs in rats during burn disease. *Bulletin of Siberian Medicine.* 2014; 13 (3): 51–56.
134. Jutkiewicz-Sypniewska J., Zembroń-Lacny A., Puchała J., Szyszka K., Gajewski P. Oxidative stress in burnt children. *Advances in Medical Sciences.* 2006; 51:316-320.
135. Досвядчинська М. Р., Антоняк Г. Л. Пероксидне окиснення ліпідів та активність антиоксидантних ензимів у клітинах легень щурів за щодобового введення афлатоксину В1. *Біологія тварин.* 2012; 14(2): 108-112.
136. Sahib A. S., Al-Jawad F. H., and Alkaisy A. A., Effect of antioxidants on the incidence of wound infection in burn patients. *Annals of Burns and Fire Disasters.* 2010; 23 (4): 199–205.
137. Bishop A. Role of oxygen in wound healing. *Journal of Wound Care.* 2008; 17 (9): 399–402.
138. Haghdoost F., Mehdi Baradaran M., Mahdavi, Zandifar A. Pistacia atlantica Resin Has a Dose-Dependent Effect on Angiogenesis and Skin Burn Wound Healing in Rat. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.* 2013; 8.
139. Rawlingson A. Nitric oxide, inflammation and acute burn injury. *Burns.* 2003; 29 (7): 631–640.

140. Li Y., Zheng J., Bird IM., Magness RR. Effects of pulsatile shear stress on signaling mechanisms controlling nitric oxide production, endothelial nitric oxide synthase phosphorylation, and expression in ovine fetoplacental artery endothelial cells. *Endothelium*. 2005 Jan-Apr;12(1-2):21-39.
141. Xu HL., Liu MD., Yuan XH., Liu CX. Suppression of cortical TRPM7 protein attenuates oxidative damage after traumatic brain injury via Akt/endothelial nitric oxide synthase pathway. *Neurochem Int*. 2018 Jan; 112: 197-205.
142. Eduardo D. Costa, Bruno A. Rezende, Steyner F. Cortes, Virginia S. Lemos, Neuronal Nitric Oxide Synthase in Vascular Physiology and Diseases. *Front Physiol*. 2016; 7: 206.
143. Mees B., Wagner S., Ninci E., Tribulova S., Martin S. Endothelial Nitric Oxide Synthase Activity Is Essential for Vasodilation During Blood Flow Recovery but not for Arteriogenesis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2007; 27: 1926–1933.
144. Kobayashi Y. The regulatory role of nitric oxide in proinflammatory cytokine expression during the induction and resolution of inflammation. *Journal of Leukocyte Biology*. 2010; 88: 1157-1161
145. Abo El-Noor MM, Elgazzar FM, Alshenawy HA. Role of inducible nitric oxide synthase and interleukin-6 expression in estimation of skin burn age and vitality. *J Forensic Leg Med*. 2017 Nov; 52: 148-153.
146. Paunel-Görgülü, A., T. Kirichevska, T. Lögters et al. Molecular mechanisms underlying delayed apoptosis in neutrophils from multiple trauma patients with and without sepsis. *Mol. Med*. 2012; 18 (1): 325-335.
147. Zhou J., J.J. Tu, Y. Huangetal. 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; 28 (2): 111-115.
148. Zmushko EI, Belozero ES, Mitin Yu Clinical immunology. Guidelines for doctors. 2001; 574.

149. Belardelli F. Role of interferons and other cytokines in the regulation of the immune response. *APMIS*. 1995; 103 (3): 161-179.
150. Kovalenko O. M., Mahltsev D. V., Kazmirchuk V. E., Kovalenko A. O. Studying of the cytokines dynamics in the injured persons in severe burns for estimation of a state severity and prognosis. *Clinical Surgery*. 2014; 2.
151. Pileri D., Accardo Palombo A., D'Amelio et al. L. Concentrations of cytokines IL-6 and IL-10 in plasma of burn patients: their relationship to sepsis and outcome. *Ann. BurnsFireDisasters*. 2008; 21 (4): 182-185.
152. Polikarpov AV., Persky E. E. Comparative study of the dynamics of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokine levels in skin burns *razlichnoy prirody* Bulletin of the University of Kharkiv. Series: Biology. 2011; 971 (14):27-32.
153. Wigenstama E., Elfsmarka L., Buchtab A., Jonasson S. Inhaled sulfur dioxide causes pulmonary and systemic inflammation leading to fibrotic respiratory disease in a rat model of chemical-induced lung injury [Author linksopenoverlay panel](#), *Toxicology*. 2016; 368: 28-36.
154. Bradley JR. TNF-mediated inflammatory disease. *J Pathol*. 2008 Jan; 214(2):149-60.
155. Pileri, D. A. Accardo Palombo, L. D'Amelio et al. Concentrations of cytokines IL-6 and IL-10 in plasma of burn patients: their relationship to sepsis and outcome *Ann. BurnsFireDisasters*. 2008; 21 (4): 182-185.
156. Chornenka N.M., YA.B Raetska, O.M. Savchuk, T.V Koval, T.V. Beregova, L.I. Ostapchenko. Cytokine profile indicators in rat blood serum in a model of esophagus burn induced by antioxidant chemical preparation *Biomed Res Ther* 2017; 4(9): 1591-1606.
157. Messingham, K.A.; Heinrich, S.A.; Kovacs, E.J. Estrogen restores cellular immunity in injured male mice via suppression of interleukin-6 production. *Journal of Leukocyte Biology* 2001; 70: 887–895.

- 158 Agay, D. M. Andriollo-Sanchez, R. Claeyssetal. Interleukin-6, TNF-alphaand interleukin-1 beta levels in blood and tissue in severely burned rats. *Eur. CytokineNetw.* 2008; 19 (1): 1-7.
159. Lyons, A., Kelly J.L., Rodricketal M.L. Major injury induces increased production of interleukin-10 by cells of the immune system with a negative impact on resistance to infection. *Ann. Surg.* 1997; 226 (4):450-458.
160. Napolitano, L.M., Campbell C. Nitric oxide inhibition normalizes splenocyte interleukin-10 synthesis in murine thermal injury. *Arch. Surg.* 1994; 129 (12): 1276-1282.
161. Батаев Х.М. Лечение ожоговых и рубцовых стенозов глотки и шейного отдела пищевода у детей: Дис.канд. Мед. Наук. М 2001.
162. Roberts DM, Jones RB, Smith RM, Alberici F, Kumaratne DS. Immunoglobulin G replacement for the treatment of infective complications of rituximab-associated hypogammaglobulinemia in autoimmune disease: a case series. *J Autoimmun.* 2015 Feb; 57: 24-9.
163. Kim J., Vaish V., Feng M., Field K., Chatzistamou I., Shim M. Transgenic expression of cyclooxygenase-2 (COX2) causes premature aging phenotypes in mice. *Aging.* 2016 Oct; 8(10): 2392–2405.
164. Kawahara K, Hohjoh H, Inazumi T, Tsuchiya S, Sugimoto Y. Prostaglandin E2-induced inflammation: Relevance of prostaglandin E receptors. *Biochim Biophys Acta.* 2015 Apr; 1851(4): 414-21
165. Zarghi A., Arfaei S. Selective COX-2 Inhibitors: A Review of Their Structure-Activity Relationships. *Iran J Pharm Res.* 2011; 10(4): 655–683.
166. Rainsford KD. Anti-inflammatory drugs in the 21st century. *Subcell Biochem.* 2007; 42: 3-27.
167. Blain H., Jouzeau JY., Netter P., Jeandel C. Non-steroidal anti-inflammatory agents with selective inhibitory activity on cyclooxygenase-2. Interest and future prospects. *Rev Med Interne.* 2000 Nov; 21(11): 978-88.

168. Newton R., Lieske M.E., Kuitert M., Bergmann Ian M., Adcock P., Barnes J. Evidence for Involvement of NF- $\kappa$ B in the Transcriptional Control of COX-2 Gene Expression by IL-1 $\beta$ . *BBRC*. 1997; 1(8): 28-32.
169. Hellmann J., Tang Y., Zhang MJ., Hai T., Bhatnagar A., Srivastava S., Spite M. Atf3 negatively regulates Ptgs2/Cox2 expression during acute inflammation. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2015 Jan-Mar; 116-117
170. Baugé C., Cauvard O, Leclercq S, Galéra P, Boumédiene K. Modulation of transforming growth factor beta signalling pathway genes by transforming growth factor beta in human osteoarthritic chondrocytes: involvement of Sp1 in both early and late response cells to transforming growth factor beta. *Arthritis Res Ther*. 2011 Feb; 13(1): 23.
171. Bock O., H. Yu, S. Zitron et al. Studies of transforming growth factors beta 1-3 and their receptors I and II in fibroblast of keloids and hypertrophic scars. *Acta Derm. Venereol*. 2005; 85 (3): 216-220.
172. Larsson A., Hansson L. Plasma Protein Fractions in Healthy Blood Donors Quantitated by an Automated Multicapillary Electrophoresis System *Journal of Chromatographic Science*. 2006; 44.
173. Overmann J. Blood Proteins and Acute Phase Proteins Interpretation of Equine Laboratory Diagnostics. 2017; 04.
174. Ермолаев В.А. Динамика белковых фракций крови при заживлении гнойных ран *Вестник УГСХА*. 2010; 2(12).
175. Chornenka NM, Raetska YA. B, Savchuk OM, Kompanets IV, Beregova TV, and Ostapchenko LI. Effect of different doses of melanin in the blood protein changes in rats under alkaline esophageal burns. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*. 2017; 8(1): 261-270.
176. Zeng-Yu Yao, Jian-Hua Qi. Comparison of Antioxidant Activities of Melanin Fractions from Chestnut Shell. *Molecules*. 2016; 21: 487.

177. Wang Y., Beekman J., Hew J., Jackson S., Issler-Fisher AC. Burn injury: Challenges and advances in burn wound healing, infection, pain and scarring. *Adv Drug Deliv Rev.* 2018; 123: 3-17.
178. Ishchuk TV, Savchuk AM., Rayetska YB, Vereshchaka VV, Ostapchenko LI. Proteinase functioning of mucous membrane of esophagus after chemical burn. *Physiological journal.* 2015; 5: 61-67.
179. Sarrazy V., Bill F., Micallef L. Mechanisms of pathological scarring: Role of myofibroblasts and current developments. *Wound Repair Regen.* 2011; 1: 10–15.
180. Magali de Bruyna B., J. Vandoorena, Ugarte-Berzala E. The molecular biology of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in inflammatory bowel diseases. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology.* 2016; 3: 22-29.
181. Sarrazy V., Bill F., Micallef L. Mechanisms of pathological scarring: Role of myofibroblasts and current developments. *Wound Repair Regen.* 2011; 1: 10–15.
182. Chornenka N., Valetska K., Rayetska Ya., Ostapchenko L. Correction of melanin proteolytic activity in the conditions of modeling alkali burns of the esophagus. *Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kyiv. Series: Problems of Physiological Functions Regulation.* 2017; 22 (1): 51-58.
183. Aciksari K., Teoman Yanar H., Hepgul G. The Effect of Beta-Aminopropionitrile and Prednisolone on the Prevention of Fibrosis in Alkali Esophageal Burns: An Experimental Study. *Gastroenterology Research and Practice.* 2013; 12: 7-11.
184. Lewis E.C. Expanding the clinical indications for a(1)-antitrypsin therapy. *Mol. Med.* 2012; 18: 957-970.
185. Davies P. L., Spiller O. B., Beeton M. L. Relationship of proteinases and proteinase inhibitors with microbial presence in chronic lung disease of prematurity. *Thorax.* 2010; 65(3): 246–251.

186. Gordiienko Iu. A., Babets Y. V., Kulinich A. O. Activity of trypsin-like enzymes and gelatinases in rats with doxorubicin cardiomyopathy. *Ukrainian Biochemistry Journal*. 2014; 6: 139–146.
187. Fystal E. J., Kozinets G., Samoilenko G.E. *Kombustology*. Donetsk. 200; 271.
188. Bian F., Pelegriano F., Pflugfelder S. Desiccating Stress-Induced MMP Production and Activity Worsens Wound Healing in Alkali-Burned Corneas. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2015; 56: 4908–4918.
189. Barrett A., Woessner F., Rawling N. *Handbook of Proteolytic Enzymes*. London. 2012; 2: 4104.
190. Bergin D.A, Hurley K, McElvaney N.G, Reeves E.P. Alpha-1 antitrypsin: a potent anti-inflammatory and potential novel therapeutic agent. *Arch Immunol Ther Exp*. 2012; 60: 81–97.
191. McCarthy C., Reeves E.P., McElvaney N.G. The Role of Neutrophil JIs in Alpha-1 Antitrypsin Deficiency. *Ann Am Thorac Soc*. 2016; 4:13.
192. Cosio M.G., Bazzan E., Rigobello C. Alpha-1 Antitrypsin Deficiency: Beyond the Protease/ Antiprotease Paradigm. *Ann Am Thorac Soc*. 2016; 4:12.
193. Baraldo S., Turato G., Lunardi F., Bazzan E., Schiavon M., Ferrarotti I., Molena B., Cazzuffi R., Damin M., Balestro E. Immune activation in a1-antitrypsin-deficiency emphysema: beyond the proteaseantiprotease paradigm. *Am J Respir Crit Care Med*. 2015; 191: 402–409.
194. Pott G.B., Chan E.D., Dinarello C.A., Shapiro L. J.  $\alpha$ 1-Antitrypsin is an endogenous inhibitor of proinflammatory cytokine production in whole blood. *Leukoc Biol*. 2009; 85: 886–895.
195. Lin V.K., Wang S.-Y., Boetticher N.C. Alpha(2) macroglobulin, a PSA binding protein, is expressed in human prostate stroma. *Prostat*. 2005; 63: 299–308.
196. Ahmed A. Rehman, Haseeb Ahsan, Fahim H. Khan. J. Alpha-2- macroglobulin: A physiological guardian. *Cell Physiol*. 2013; 228(8): 1665–1675.

197. Krasnobryzha E.M, Savchuk O.N, Platonov T.N, Volkov G.L. Role of tissue plasminogen activator and its inhibitor in the functioning of hemostasis under normal and pathological. *Ukrainian Biochemical Journal*. 2004; 76: 28
198. Trujillo Piso D. Y., Ribeiro A. P., Silva M. L. Effects of antiproteolytic agents on corneal epithelial viability and matrix metalloproteinase-2 and metalloproteinase-9 activity in alkaliburned corneas of rats. *Veterinary Ophthalmology*. 2014; 17: 23–31.
199. Kolaczowska E., Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat. Rev. Immunol*. 2013; 13: 159–175.
200. Neely A., Clendening C., Gardner J. Gelatinase activity in keloids and hypertrophic scars. *Wound Rep Reg*. 1999; 7: 166–171.
201. Peled Z. M., Phelps E. D., Updike D. L. Matrix metalloproteinases and the ontogeny of scarless repair: the other side of the wound healing balance. *Plast Reconstr Surg*. 2002; 3: 801–811.
202. Krejner A, Litwiniuk M, Grzela T. Matrix metalloproteinases in the wound microenvironment: therapeutic perspectives Dove Medical Press. 2016; 3: 29-39.
203. Yang Y., Wei D., Xia ZF. Clinical investigation in the expression of matrix metalloproteinase 2 mRNA in the hyperplastic scar in burn patients. *Zhonghua Shao Shang Za Zhi*. 2005 Feb; 21(1): 43-5.
204. Voronkina I.V, Kokorin K.V, Chulikov O.V, Paramonov B.A, Blinova M.I, Pinaev G.P. Matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 of wound and burn exudates and their effect on extracellular matrix proteins *Tsitologiya*. 2003; 45(1): 43-50.
205. Caley Matthew P., Martins Vera L.C., Edel A. O'Toole. Metalloproteinases and Wound Healing *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2015 Apr 1; 4(4): 225–234.
206. Steffensen B., Häkkinen L., Larjava H. Events of Wound-Healing – Coordinated Interactions Among Matrix Metalloproteinases (MMPs), Integrins, and Extracellular Matrix Molecules. *Cromb*. 2001; 5: 373–378
207. Reif S. Matrix Metalloproteinases 2 and 9 Are Markers of Inflammation but Not of the Degree of Fibrosis in Chronic Hepatitis C. *Digestion*. 2005; 2: 124-128.

208. Wu J., Huang GT, He W, Wang P, Tong Z, Jia Q, Dong L, Niu Z, Ni L. Basic fibroblast growth factor enhances stemness of human stem cells from the apical papilla. *J Endod.* 2012 May; 38(5): 614-22.
209. Liu LY., Hou YS., Chai JK., Hu Q., Duan HJ. Basic fibroblast growth factor/vascular endothelial growth factor in the serum from severe burn patients stimulates the proliferation of cultured human umbilical cord mesenchymal stem cells via activation of Notch signaling pathways. *J Trauma Acute Care Surg.* 2013 Nov; 75(5): 789-97.
210. Rousseau AF., Damas P., Ledoux D., Cavalier E. Effect of cholecalciferol recommended daily allowances on vitamin D status and fibroblast growth factor-23: an observational study in acute burn patients. *Burns.* 2014 Aug; 40(5): 865-70.
211. Nagy B., Szélig L., Rendeki S., Loibl C., Rézmán B., Lantos J., Bogár L. Dynamic changes of matrix metalloproteinase 9 and tissue inhibitor of metalloproteinase 1 after burn injury. *J Crit Care.* 2015 Feb; 30(1): 162-6.
212. Yang L, Zheng Z, Zhou Q, Bai X, Fan L, Yang C, Su L, Hu D. miR-155 promotes cutaneous wound healing through enhanced keratinocytes migration by MMP-2. *J Mol Histol.* 2017 Apr; 48(2): 147-155.
213. Weremijewicz A., Matuszczak E., Sankiewicz A., Tylicka M., Komarowska M., Matrix metalloproteinase-2 and its correlation with basal membrane components laminin-5 and collagen type IV in paediatric burn patients measured with Surface Plasmon Resonance Imaging (SPRI) biosensors. *Burns.* 2018 Jun; 44(4): 931-940.
214. Zhu L., Zheng X., Du Y., Xing Y., Xu K., Cui L. Matrix metalloproteinase-7 may serve as a novel biomarker for cervical cancer. *Onco Targets Ther.* 2018 Jul 20; 11: 4207-4220.
215. Miao S., Zhou SY., Han CS., Zhang LN., Sun HB., Yang B. Clinicopathological significance of matrix metalloproteinase-7 protein expression in esophageal cancer: a meta-analysis. *Drug Des Devel Ther.* 2015 Jul 20; 9: 3729-40.
216. Garalla HM., Lertkowitz N., Tizlavicz L., Reisz Z., Holmberg C. Matrix metalloproteinase (MMP)-7 in Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma:

expression, metabolism, and functional significance. *Physiol Rep.* 2018 May; 6(10): 13683.

217. Matveev SB., Spiridonova TG., Klychnikova EV., Nikolaeva NI., Smirnov SV., Golikov PP. Criteria for assessment of endogenous intoxication in burn trauma *Klin Lab Diagn.* 2003 Oct; (10): 3-6.

218. Нетюхайло Л.Г. Механізми опікової хвороби та обґрунтування застосування препарату «Кріохор» для її лікування : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня доктора мед. наук : спец. 14.03.04 "Патологічна фізіологія". 2007; 34 .

219. Kozinets G.P, Osadchaia O.I, Tsygankov V.P, Isaenko N.P, Zhernov A.A, Boiarskaia A.M. Correction of metabolic hypoxia in patients with severe burn injury and septic toxemia. *Klin Khir.* 2012, Dec; (12): 38-42.

220. Bondarenko V.V, Netyuhaylo L.G, Avetikov D.S., Average mass molecules in the tissues of the salivary glands in experimental burn disease. *Taurian Medical and Biology.* 2012; 3(1): 49-50.

221. Suhomlin T.A. Biochemical changes in lung tissues under the experimental burn disease and their correction *Lipin.* 2015; 118.

**Список публікацій здобувача за темою дисертації:**

1. **Chornenka N.M.** Correction Parameters of Endogenous Intoxication in Experimental Burn Disease at the Stage of Toxemia / Chornenka N.M, Raetska YA. B, Savchuk OM, Torgalo EO, Beregova TV, and Ostapchenko LI. // Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. – 2016. – V.5: №7. (Особистий внесок здобувача – планування експерименту, аналіз результатів, підготовка статті до друку).
2. **Чорненька Н.М.** Біохімічні зміни в сироватці крові щурів за умов експериментальної опікової хвороби та їх корекція меланіном. / Чорненька Н.М, Раєцька Я., Савчук О., Остапченко Л. // Проблеми регуляції фізіологічних функцій. – 2016. – Т. 2 (21). С. 41 (Особистий внесок здобувача – визначення біохімічних показників, аналіз результатів та написання статті).
3. **Chornenka N. M.** Effect of different doses of melanin in the blood protein changes in rats under alkaline esophageal burns. / Chornenka N. M, Raetska YA. B, Savchuk OM, Kompanets IV, Beregova TV, and Ostapchenko LI. // Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences RJPBCS. – 2017. – V.8 (1). - P. 261 (Особистий внесок здобувача – проведення частини експериментальних досліджень, інтерпретація результатів та написання статті).
4. **Chornenka N. M.** Correction of melanin proteolytic activity in the conditions of modeling alkali burns of the esophagus./ Chornenka N. M, K. Valetska, Ya. Rayetska, L. Ostapchenko.// Taras Shevchenko National University of Kyiv. Series: Problems of Physiological Functions Regulation. – 2017. – V. 22. - P.1 . (Особистий внесок здобувача – проведення частини експериментальних досліджень, отримання результатів та написання статті).
5. **Chornenka N.M.** Cytokine profile indicators in rat blood serum in a model of esophagus burn induced by antioxidant chemical preparation. / Chornenka N.M., Ya. B. Raetska, T.V Koval, O.M Savchuk, T. VBeregova, L.I. Ostapchenko //Biomed

Res Ther. – 2017/ - V.4(9). – P. 1591-1606 (Особистий внесок здобувача – визначення вмісту цитокінів, обрахування результатів).

6. **Чорненька Н.М,** Іщук Т.В, Раєцька Я. Б Корекція показників ендогенної інтоксикації при експериментальній опіковій хворобі в стадії токсемії X Міжнародна конференція молодих науковців «Біологія: Від молекули до біосфери» 2-4 грудня 2015р с. 21

7. **Чорненька Н.М,** Мунько О.А, Раєцька Я. Б Рівень цитокінів при опіку стравоходу першого ступеня у щурів за умов введення препарату меланін Конференція студентів та молодих науковців «Шевченківська Весна» 6-8 квітня 2016р м. Київ с.138

8. **Чорненька Н.М,** Пятківська Н., Іщук Т.В, Раєцька Я.Б Корекція показників ендогенної інтоксикації при моделюванні лужного опіку стравоходу I ступеня у статевонезрілих щурів XII міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології» Збірник тез, 16-19 квітня 2016 року, м.Львів с.50

9. **Чорненька Н.М,** Дмитрик. В.В, Раєцька Я.Б Вплив антиоксидантного препарату на метаболічні процеси при моделюванні опіку стравоходу у щурів XI Міжнародної конференції молодих учених Харків; 29 листопада – 2 грудня 2016 с. 9

10. **Chornenka NM,** Raetska YA. B Correction of infectious-inflammatory process in experimental burn disease of stage septic toxemia 2nd Prague European Days of Internal Medicine December 1–2, 2016 Prague p. 32

11. **Chornenka NM,** Raetska YA. B, Savchuk OM Dynamics Change of Proteolytic Activity under Experimental Burns of the Esophagus and Correction of Melanin PHOENIX 2017, the second edition of our International Medical Students' Conference 22-26 March, 2017, p. 192

12. **Чорненька Н.М** Савчук О.М Порухення протеолітичних процесів при моделюванні лужного опіку стравоходу та їх корекція меланіном IV

Міжнародний медико-фармацевтичний конгрес студентів і молодих учених «Інновації та перспективи сучасної медицини», ВІМСО 2017 Чернівці с. 59

13. **Чорненька Н.М** Раєцька Я.Б Савчук О.М Рівень матриксних металопротеїназ у сироватці крові щурів за лужного опіку стравоходу за умов введення меланіну XIII Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів молодь і поступ біології Львів, 25 – 27 квітня 2017 с. 59

14. **Чорненька Н.М**, П'ятківська Н.В, Раєцька Я.Б Показники азотистого обміну за лужного опіку стравоходу за умов введення меланіну Сучасні проблеми біології, екології та хімії V Міжнародна науково-практична конференція, ЗНУ 26-28 квітня 2017 р., Запоріжжя, с. 173

15. **Чорненька Н.М**, Мунько О.М, Раєцька Я.Б Вплив меланіну на рівень цитокінів у сироватці крові щурів за опіку стравоходу першого ступеня XIII Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів молодь і поступ біології Львів, 25 – 27 квітня 2017 Київ с. 40

16. **Chornenka NM**, Raetska YA. B, Savchuk OM Activity of trypsin-like enzymes at alkaline burn of the esophagus and in the application of melanin 14th Horizons in molecular biology Max Planck Institute for Biophysical Chemistry in Göttingen, Germany 11-14 September 2017

17. **Chornenka NM**, Raetska YA. B, Savchuk OM The proteolytic system disbalance under chemical burn of the esophagus in use of melanin 25th International Student Congress Of (bio)Medical Sciences 4-8 June 2018, Netherlands, p. 244

### **Апробація результатів дисертації.**

Основні результати дисертаційної роботи доповідалися та обговорювалися на: X Міжнародна конференція молодих науковців «Біологія: Від молекули до біосфери» (Харків, 2015), Шевченківська весна: конференція студентів, аспірантів та молодих вчених (Київ, 2016), XI Міжнародній конференції молодих учених «Біологія: від молекули до біосфери» (Харків, 2016), XII

міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології» (Львів, 2016), 2nd Prague European Days of Internal Medicine (Prague, 2016), IV Міжнародний медико-фармацевтичний конгрес студентів і молодих учених «Інновації та перспективи сучасної медицини» (Чернівці, 2017), XIII Міжнародній науковій конференції "Молодь і поступ біології" (Львів, 2017), Шевченківська весна: конференція студентів, аспірантів та молодих вчених (Київ, 2017), PHOENIX, International Medical Students' Conference (India, 2017), V Міжнародна науково-практична конференція, ЗНУ (Запоріжжя, 2017), 14th Horizons in molecular biology Max Planck Institute for Biophysical Chemistry (Germany, 2017), 25th International Student Congress Of (bio)Medical Sciences (Netherlands, 2018)