Міністерство освіти і науки України
Київський національний університет імені Тараса Шевченка

ЧОРНЕНЬКА НАТАЛІЯ МИКОЛАЇВНА

УДК: 616.329-001.37-053

ПРОЦЕСИ ЗАГОЄННЯ ЛУЖНОГО ОПІКУ СТРАВОХОДУ У ЩУРІВ ЗА УМОВ ВВЕДЕННЯ МЕЛАНІНУ

03.00.04-біохімія

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2018

Дисертацією є рукопис

Роботу виконано на кафедрі біохімії Навчально-наукового центру «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка МОН України

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор
Савчук Олексій Миколайович,
Київський національний університет імені Тараса Шевченка МОН України,
завідувач кафедри біохімії
ННЦ «Інститут біології та медицини»

Офіційні опоненти: доктор біологічних наук, доцент
Калачнюк Лілія Григорівна,
Національний університет біоресурсів і природокористування України МОН України,
професор кафедри біохімії і фізіології тварин
імені академіка М.Ф.Гулого

доктор біологічних наук, старший науковий співробітник
Король Леся Вікторівна
Інститут нефрології НАМН України
завідувач лабораторії біохімії Державної установи «Інститут нефрології НАМН України»

Захист дисертації відбудеться “29” січня 2019 року о 16:00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.001.24 Київського національного університету імені Тараса Шевченка за адресою: м. Київ, проспект Академіка Глушкова, 2, ННЦ «Інститут біології та медицини», ауд. 434

Поштова адреса: 01601, м. Київ, вул. Володимирська, 64/13, Київський національний університет імені Тараса Шевченка, ННЦ «Інститут біології та медицини», спеціалізована вчена рада Д 26.001.24

З дисертацією можна ознайомитись у науковій бібліотеці ім. М.М. Максимовича Київського національного університету імені Тараса Шевченка за адресою: м. Київ, вул. Володимирська, 58
Автореферат розісланий “27“ грудня 2018 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради Д 26.001.24 Н. Г. Ракша

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

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 [Digtyar V. et al, 2017; Suvashis D. et al, 2018]. Уникнути розвитку ускладнень дозволяє комплексний підхід в лікуванні, своєчасна та повноцінна терапія в гострому періоді хвороби, планомірний контроль перебігу захворювання в динаміці [Moore K. et al, 2015; Dhopte A. et al, 2015]. 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 [Brown T. et al, 2010; Chromy B.et al, 2013; Hahm G. et al, 2014].

У дітей після хімічного опіку стравоходу ускладнення можуть виникнути навіть за умов першого ступеня опіку. Саме незрілість тканин та недосконаліть захисних реакцій в ранньому віці у дітей є головними причинами патологічних післяопікових розладів та тривалого відновлення структури тканин. [D'Cruz R. et al, 2015; Sander J. et al, 2015]. 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 [Pastar I. et al, 2014; Dhopte A. et al, 2015]. 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 [Ribeiro M. et al, 2009], що містять природні глікозаміноглікани, хітин, які запобігають розвитку опікової травми [Jin Y. et al, 2007], мають антимікробні властивості [Dai T. et al, 2011] сприяють проліферації фібробластів та ангіогенезу. Також дієвим є включення факторів росту фібробластів у гель [Travis T. et al, 2014] та застосування стовбурових клітин [Liu L. et al, 2014] для більш швидкого відновлення уражених тканин. Перспективним є використання природних нетоксичних антиоксидантів у якості цитопротекторів [Liaudanskas

M. et al, 2014]. Лікарські рослини, багаті фенольними сполуками потенційно можуть впливати на прискорення загоєння опікових ран і захищати рану від бактеріальних інфекцій [Bahramsoltani R. et al, 2014; Alov P. et al, 2015]. 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 дрижджоподібні гриби *Nadsoniella nigra* штам Х1, 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 [Taburets O. et al, 2016]. Дослідження впливу меланіну на інші патології показали, що він має антиоксидантні, цитопротекторні та стреспротекторні властивості [Чижанська Н., 2007; Голишкін Д., 2015]. 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 трипсино-подібних серинових протеїназ), електрофоретичні (аналіз білкових фракцій

сироватки крові, якісного складу трипсино-подібних 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.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали та методи досліджень

Досліди проводили на білих нелінійних статевонезрілих щурах масою 90-110 г. Тварин утримували на стандартному раціоні віварію з дотриманням міжнародних рекомендацій про проведення медично-біологічних досліджень з використанням тварин згідно з «Загальними принципами роботи на тваринах», затвердженими І 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).

Всі больові процедури та операції проводились під загальним наркозом із застосуванням тіопенталу натрію (BiochemieGmbH/Austria). Лужний опік стравоходу (ЛОС) моделювали використовуючи розчин 20% NaOH, що відповідає 2-му ступеню опікового ураження [Раєцька Я.Б., 2013]. Контрольним щурам вводили відповідний об'єм води для ін'єкцій. Щурів розділяли на 3 групи : 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

починаючи з 2-ї доби експерименту вводили меланін перорально в дозі 1мг/кг, впродовж 14 діб. Продуцентом меланіну, використаних в наших дослідженнях, були дріжджоподібні гриби *Nadsoniella nigra* штам Х1, що висіяні із зразків вертикальних скель о. Галіндез. Тварин виводили з експерименту на 7, 15 та 21 добу. Вибір термінів дослідження обумовлений розвитком патоморфологічних процесів за хімічних опіків стравоходу [Ванцян Э, Тощаков Р, 1971; Фисталь Е, 2004]. Сироватку крові отримували згідно [Luka C, 2013], гомогенати слизової оболонки стравоходу - відповідно до рекомендацій [Бездробный Ю, 1979; Рыбальченко В, 1988]. Визначення біохімічних показників у сироватці крові проводили за допомогою біохімічного аналізатора Humalyser 3000 з використанням стандартних тест-наборів. Визначення вмісту дієнових кон'югатів проводили спектрофотометрично згідно [Костюк В.А., 1984], ТБК-активних продуктів визначали за реакцією з тіобарбітуровою кислотою [Стальная И., 1977]. Супероксиддисмутазну активність визначали відповідно до методу [Сирота Т.В., 1999]. Визначення активності NO-синтази засноване на комбінації класичного методу [Salter M., 1991] та його модифікації [Chin Y., et al, 1999], пристосованої до спектрофотометричного вимірювання кінцевого продукту реакції – L-цитруліну. Визначення концентрації білка проводили за методом [Bradford M., 1976]. Визначення цитокінового профілю, вмісту, імуноглобулінів класу G, металоматричних протеїназ (ММП), тканинного інгібітора ММП (ТІМП-1), фактору росту фібробластів у сироватці крові та слизовій оболонці стравоходу щурів здійснювали за допомогою методу ІФА за загальною методикою для розчинних білків [Crowther J., 2001]. Кількісний та якісний склад протеїнових фракцій сироватки крові щурів досліджували за допомогою методу диск-електрофорезу за присутності додецилсульфату натрію [Laemmli U., 1970]. Фракціонування трипсино-подібних серинових протеїназ плазми крові проводили методом афінної хроматографії використовуючи в якості сорбенту бензамедин-сефарозу [Magdeldin S., 2012]. Для аналізу отриманої фракції трипсино-подібних серинових протеїназ плазми крові та наявності ММП в тканинах слизової оболонки стравоходу використовували метод ензим-електрофорезу [Ostapchenko L., et al, 2011]. Загальну протеолітичну активність аналізували методом визначення казеїнолітичної активності з наступними модифікаціями. Для селективного визначення активності ММП та серинових протеїназ до реакційної суміші додавали до кінцевої концентрації 2 мМ етилендіамінтетраацетат (ЕДТА) або 2 мМ фенілметилсульфоніл флуорид (ФМСФ), відповідно [Hummel B., 1959]. Визначення інгібіторної активності α1-антитрипсину (α1-АТ) та α2-макроглобуліну (α2-МГ) проводили за [Нартикова В., 1979]. Визначення вмісту молекул середніх мас (МСМ) проводили за [Габриелян Н., 1982]. В роботі використовували гістологічні методи дослідження [Лили Р.,1969]. Експресію генів у крові та тканинах стравоходу визначали методом ПЛР зі зворотною транскрипцією. Екстракцію РНК проводили фенольним методом [Chomczynski P., 1987]. Отримання кДНК та полімеразну ланцюгову активність визначали згідно з [Maniatis T., 1984]. Статистичну обробку результатів проводили за

допомогою програмного забезпечення Statistica 7.0 та TotalLab 2.10. Основні статистичні показники підраховували шляхом обчислення середнього арифметичного значення (M), стандартної середньої арифметичної похибки (m). Різницю показників оцінювали параметричними методами варіаційної статистики ANOVA. Для визначення достовірності відмінностей між двома вибірками використовували критерій Стьюдента (t). При цьому, достовірними вважались різниці при $p<0,05$ [Брандт Т., 1975].

Результати досліджень та їх обговорення

Нами було змодельовано лужний опік стравоходу другого ступеня у статевонезрілих щурів. Проведені гістологічні дослідження у групах щурів з ЛОС 2 та у групі, якій вводили меланін дозволили виявити, що за умов ЛОС 2 на 1 добу (рис. 1 Б) відбувалися ураження слизової оболонки (епітелію, власної пластинки) та м`язової оболонки стравоходу щурів, запальний процес, що супроводжувався інфільтрацією лейкоцитами (рис. 1 А). На 7 добу у групах з ЛОС 2 (рис. 1 В) виявили присутність інфільтрації лейкоцитами. За введення меланіну (рис. 1 Е) було помітне зниження інфільтрації лейкоцитами, порівняно з показниками у тварин з ЛОС 2.

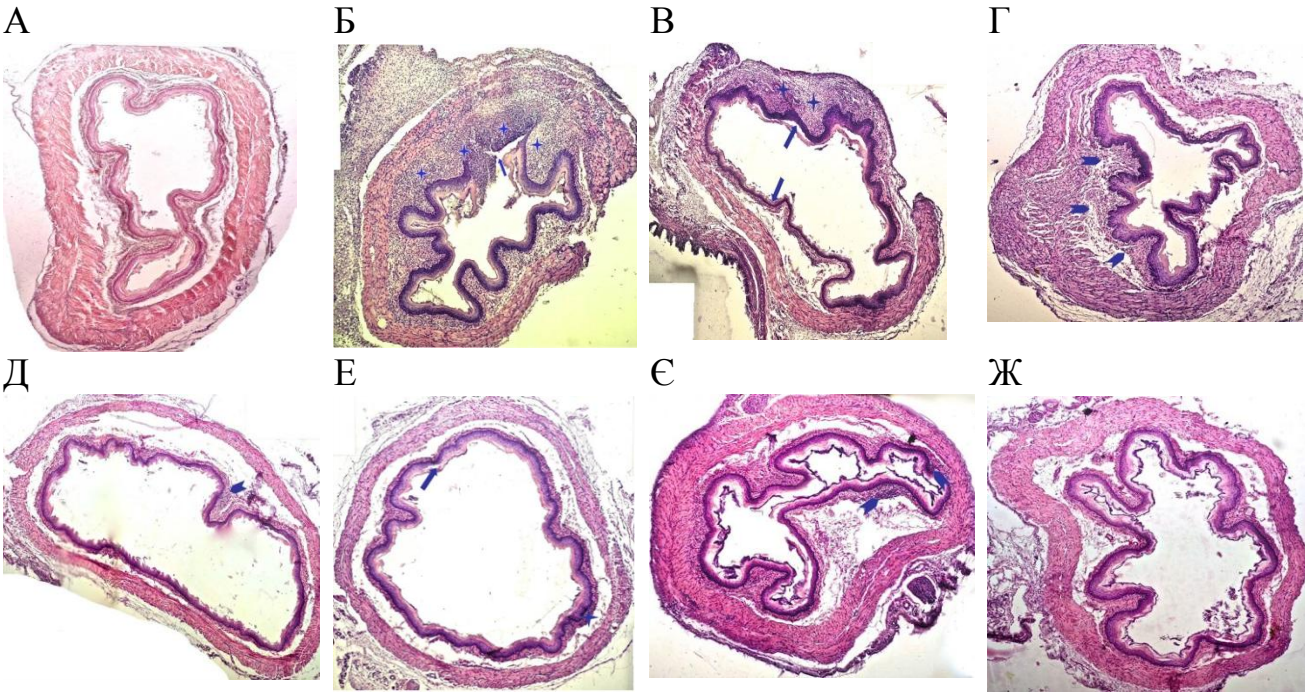


Рис. 1. Мікрофотографія тканин стравоходу контрольних щурів, щурів з ЛОС 2 та за умов введення меланіну. А – контроль; Б – ЛОС (1 доба); В – ЛОС (7 доба); Г – ЛОС (15 доба); Д – ЛОС (21 доба); Е – ЛОС (7 доба) + меланін; Є – ЛОС (15 доба) + меланін; Ж – ЛОС (21 доба) + меланін. Забарвлення гематоксилін-еозином,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

На 15 добу за умов ЛОС 2 (рис. 1 Г) було зафіксовано зниження загальної лейкоцитарної інфільтрації, а за умов введення меланіну присутність лейкоцитів була незначною (рис. 1 Є). На 21 добу досліджень, за ЛОС 2 (рис. 1 Д) було відзначено відновлення цілісності епітелію слизової оболонки, залишкову інфільтрацію лейкоцитами та збільшення шару підслизової оболонки, яке відбувається за рахунок патологічного розростання екстрацелюлярного матриксу. У групах з ЛОС 2 за введення меланіну (рис. 1 Ж) відбувалося майже повне відновлення уражених тканин з незначним розростанням сполучної тканини в підслизовій основі.

Як відомо, хімічні опіки можуть супроводжуватись тривалими порушеннями обмінних процесів [Gökakın A., 2014], тому одним з найбільш інформативних тестів щодо виявлення тяжкості стану за умов ЛОС 2 є визначення біохімічних показників. Нами було досліджено ключові біохімічні показники сироватки крові щурів на різних термінах експерименту у щурів з ЛОС 2 та за умов введення меланіну в дозі 1 мг/кг (табл. 1). Встановлено, що за умов ЛОС 2 концентрація загального білка та альбуміну знижувалась, активність ферментів аланінамінотрансферази (АЛТ), аспартатамінотрансферази (АСТ) була вищою в 2,5 та 1,3 раза відповідно на 7 добу. Дані результати можуть вказувати на деструктивні зміни у клітинах печінки за умов ЛОС 2, зокрема порушення цілісності клітинних мембран гепатоцитів.

Таблиця 1

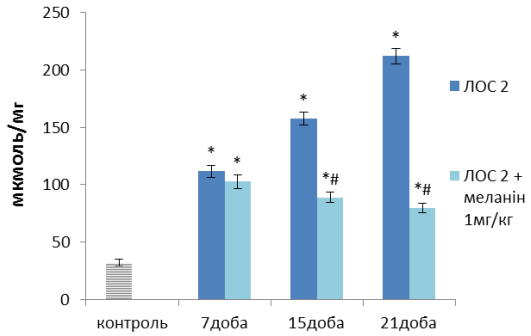
Основні біохімічні показники та показники водно-електролітного балансу у сироватці крові щурів за умов ЛОС 2 та за введення меланіну (M±m, n=10)

	контроль		7 доба	15 доба	21 доба
Загальний білок (г/л)	65,01±0,8	ЛОС 2	41,2±1,0*	60,5±0,7*	67,3±0,8*
		ЛОС 2 + меланін	63,5±0,9$^{\#}$	61,4±1,5*	62,7±0,8*$^{\#}$
Альбумін (г/л)	37,5±2,5	ЛОС 2	23,6±1,1*	29±0,7*	31±0,8*
		ЛОС 2 + меланін	29,5±1,2*$^{\#}$	35,2±1,3$^{\#}$	32,2±0,7*
АСТ (Од/л)	55,5±1,1	ЛОС 2	70,1±2,3*	63,1±2*	56,3±1,2
		ЛОС 2 + меланін	62,3±1,4*$^{\#}$	48,4±2*$^{\#}$	39,7±2,1*$^{\#}$
АЛТ (Од/л)	27,7±0,9	ЛОС 2	71,1±2,2*	64±2,3*	43±2,0*
		ЛОС 2 + меланін	55,7±1,0*$^{\#}$	50,8±1,0*$^{\#}$	47,7±1,5*$^{\#}$
Сечовина (мг/дл)	36,2±0,2	ЛОС 2	46,4±0,4*	44,9±0,5*	42,1±0,8*
		ЛОС 2 + меланін	39,2±1,3*$^{\#}$	34,2±1,1*$^{\#}$	40,1±1,0*
Креатинін (мкмоль/л)	88±2,1	ЛОС 2	145,01±2,1*	120±2,9*	110±1,9*
		ЛОС 2 + меланін	93,4±1,2*$^{\#}$	94±1,36*$^{\#}$	89,7±1,4$^{\#}$
Na^+ (ммоль/л)	156,2±1,1	ЛОС 2	148±1,3*	141±1,5*	150±1,1*
		ЛОС 2 + меланін	149,4±1,1*	150,6±1,3*$^{\#}$	152,1±1,3*
Cl^- (ммоль/л)	110±1,1	ЛОС 2	98,4±1,5*	101,8±1,3*	103,6±1,4*
		ЛОС 2 + меланін	104,8±1,5*$^{\#}$	105,2±1,0*$^{\#}$	107,2±1,3*$^{\#}$

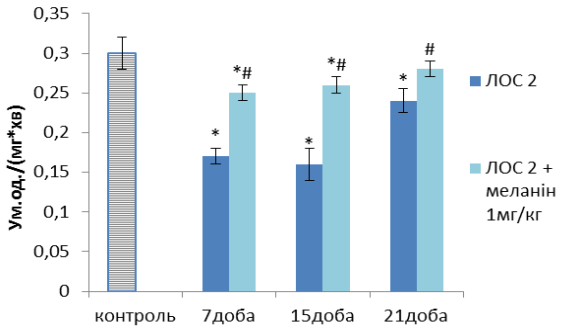
* – $p<0,05$ порівняно з контролем; $^{\#}$ – $p<0,05$ порівняно з ЛОС 2

Концентрація сечовини та креатиніну в сироватці крові щурів з ЛОС 2 була підвищеною в 1,3 та 1,6 раза відповідно на 7 добу, що може вказувати на ураження нирок. Концентрація натрію та хлору знижувалась за умов ЛОС 2 переважно на 7 добу експерименту. За застосування меланіну щурам з ЛОС 2 спостерігали підвищення концентрації загального білка та альбуміну, зниження активності АЛТ та АСТ, концентрації сечовини та креатиніну, підвищення концентрації натрію та хлору у порівнянні з показниками за умов ЛОС 2.

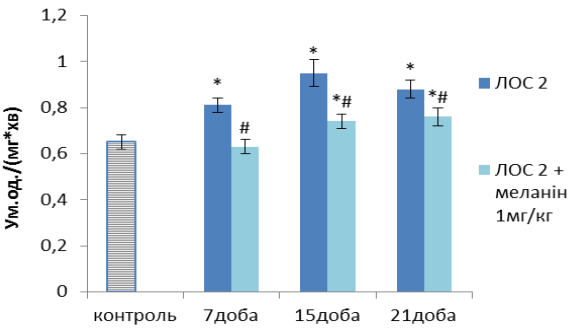
Оксидативний стрес є однією із причин ускладнень процесів загоєння за умов опіків [Netyukhailo L., 2014]. Нами було показано зростання вмісту дієнових кон'югатів (ДК) за умов ЛОС 2, що перевищувало контроль на 21 добу в 6,6 раза (рис. 2А). Показано, що за умов ЛОС 2 відбувається підвищення активності індуцибельної синтази оксиду азоту (iNOS) у всі досліджувані доби порівняно з контролем (рис. 2В). За розвитку оксидативного стресу через утворення надмірної кількості вільних радикалів, відбувається порушення роботи ферментів антиоксидантного захисту. Встановлено, що за умов ЛОС 2 знижувалась СОД активність на 7 та 15 добу у 1,8 та 1,9 раза відповідно порівняно з контролем (рис. 2Б). Встановлено, що введення меланіну сприяло зниженню концентрації ДК на 15 та 21 доби, також знижувалась активність iNOS, що була нижчою в 1,5 раза на 15 добу ніж за умов ЛОС 2. Показано, що у щурів з ЛОС 2 за введення меланіну СОД активність була вищою у 1,5 та 1,6 раза на 7 та 15 добу відповідно, порівняно з показниками за ЛОС 2. Таким чином, за умов введення меланіну спостерігається нормалізація про-антиоксидантного балансу.



А)



Б)



В)

Рис. 2. Вміст дієнових кон'югатів (А), СОД активність (Б) та активність індуцибельної синтази оксиду азоту (В) у сироватці крові щурів за умов ЛОС 2 та за введення меланіну; M±m, n=10
* – p<0,05 порівняно з контролем
# – p<0,05 порівняно з групою ЛОС 2

За опіків відбувається активація імунної ланки, що характеризується змінами рівня прозапальних цитокінів (рис. 3). Аналіз рівня прозапальних цитокінів показав, що вміст ІЛ-6 у щурів з ЛОС 2 був вищим у 1,8 раза на 15

добу, ІЛ-12 у 1,7 раза на 7 добу, інтерферону гамма (ІФ-γ) у 1,2 раза на 15 добу, порівняно з контролем. У групі щурів з ЛОС 2, яким вводили меланін, вміст прозапальних цитокінів був нижчим, так вміст ІЛ-6 був нижчим в 1,3 раза на 15 добу порівняно з групою ЛОС 2. Встановлено, що вміст протизапальних цитокінів у сироватці крові щурів з ЛОС 2 був нижчим порівняно з контрольною групою, на 15 добу рівень ІЛ -4 у 1,4 раза, ІЛ-10 у 1,3 раза. У групі щурів з ЛОС 2 яким вводили меланін вміст протизапальних цитокінів був вищим, порівняно з тваринами з ЛОС 2, які не отримували меланін, а саме на 15 добу у 1,4 та 1,4 раза для ІЛ-4 та ІЛ-10 відповідно (рис. 3). Було показано підвищення вмісту IgG у сироватці крові за умов ЛОС 2 показники якого перевищували контроль на 21 добу в 2,3 раза, що може свідчити про перехід запального процесу у хронічну форму. У групі щурів з ЛОС 2, яким вводили меланін цей показник був на 21 добу у 1,8 раза нижчим порівняно з щурами з ЛОС 2.

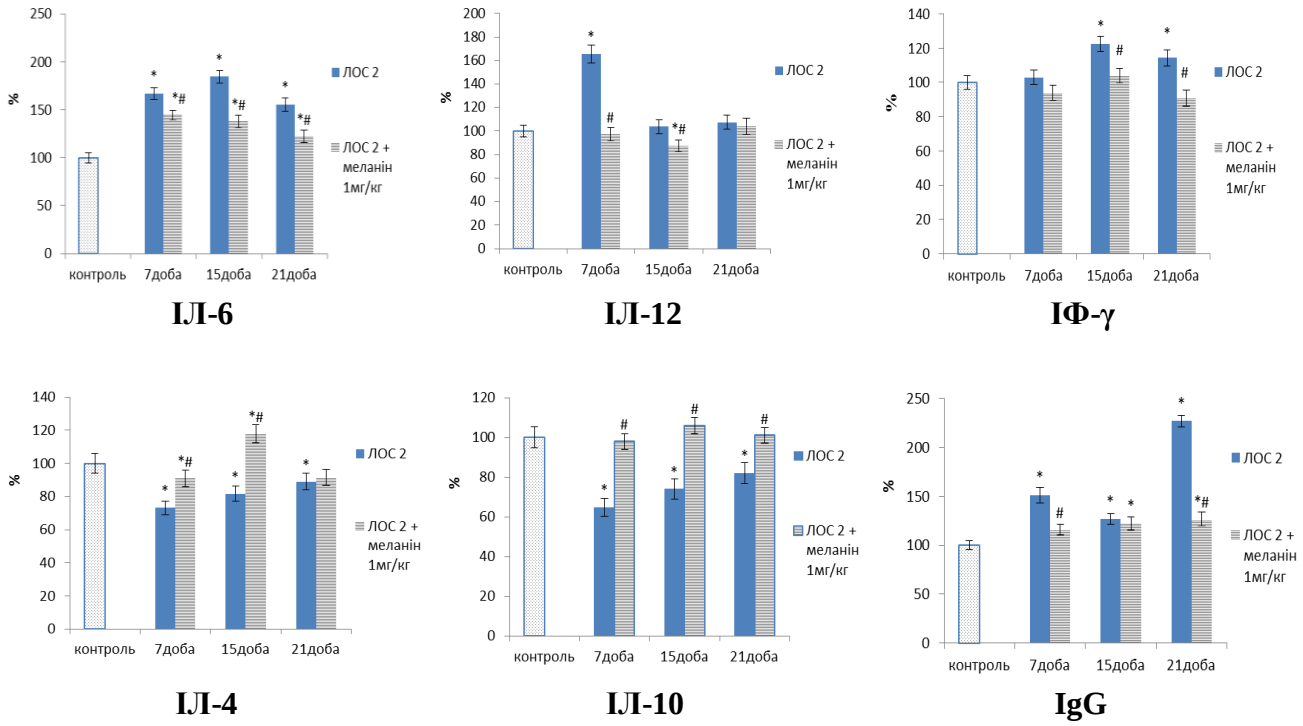
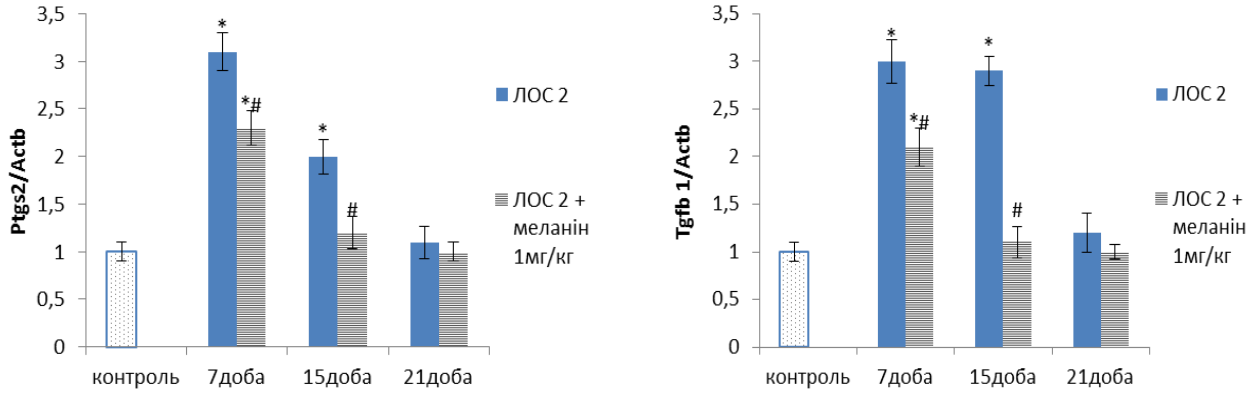


Рис. 3. Відносний вміст прозапальних цитокінів (ІЛ-6, ІЛ-12, ІФ-γ), протизапальних цитокінів (ІЛ-10, ІЛ-4) у слизовій оболонці стравоходу та IgG у сироватці крові щурів за умов ЛОС 2 та за введення меланіну; M±m, n=10
* – $p<0,05$ порівняно з контролем; # – $p<0,05$ порівняно з групою ЛОС 2

Наступним етапом нашого дослідження було, дослідити експресію прозапальних генів, що в свою чергу може слугувати тригером розвитку запального процесу, а також визначити чи впливає на ці процеси меланін. Ензим каскаду арахідонової кислоти циклооксигеназа/ендопероксид синтаза простагландину (*Ptgs 2*) генерує простагландини, які є медіаторами запалення та за надмірної активації відіграють роль у формуванні рубців [Ferrer M., 2018]. *Ptgs2* є індуцибельною ізоформою та активується за умов запальних процесів

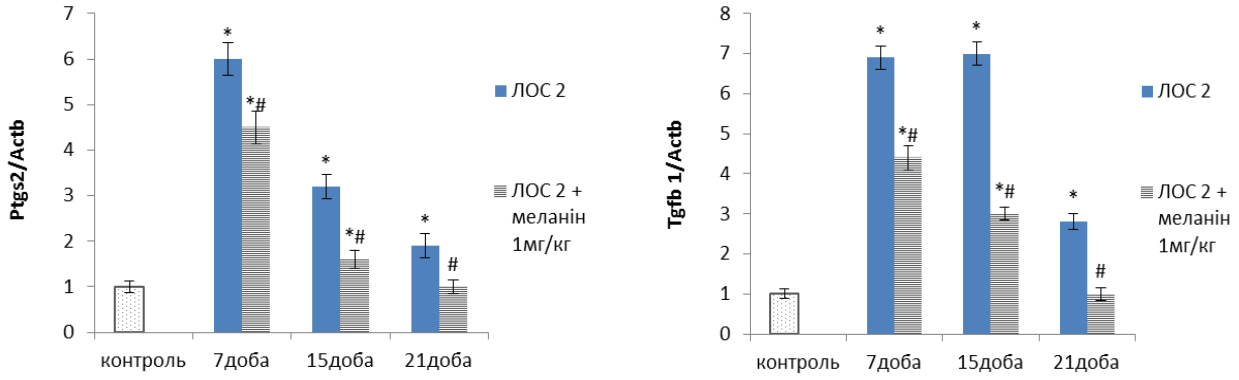
[Pan Y., 2018]. У нормі експресія гену *Tgfb 1* відповідає за широкий спектр клітинних реакцій, включаючи диференціювання, клітинну проліферацію, міграцію, апоптоз, позаклітинну реконструкцію та розвиток позаклітинного матриксу. За умов ЛОС 2 у крові спостерігалося підвищення рівня експресії генів *Ptgs 2* на 7 та 15 добу, що перевищувало контрольні значення у 3,1 раза та 2 рази, відповідно (рис. 4. А,Б). Експресія гену *Tgfb 1* за умов ЛОС 2 також зростала і перевищувала контрольні значення на 7 та 15 добу в 3 рази та 2,9 раза, відповідно. У тварин яким вводили меланін рівні експресії генів *Ptgs2*, *Tgfb1* були нижчими та їх наближення до контрольних значень вже на 15 добу.



А) Б)

Рис. 4. Відносний рівень експресії генів *Ptgs2* (А) та *Tgfb1* (Б) у крові щурів за умов ЛОС 2 та введення меланіну; M±m, n=10
* – p<0,05 порівняно з контролем; # – p<0,05 порівняно з групою ЛОС 2

Дослідження даних показників у тканинах стравоходу показали підвищення рівня експресії генів *Ptgs2*, *Tgfb1* на 7 добу в 6 разів та 6,9 раза, відповідно, за умов ЛОС 2, порівняно з контрольними значеннями (рис. 5 А,Б).



А) Б)

Рис. 5. Відносний рівень експресії генів *Ptgs2* (А) та *Tgfb1*(Б) у тканинах стравоходу щурів за умов ЛОС 2 та введення меланіну; M±m, n=10
* – p<0,05 порівняно з контролем; # – p<0,05 порівняно з групою ЛОС 2

У тварин, яким вводили меланін, спостерігалися нижчі рівні експресії генів *Ptgs2*, *Tgfb1* та їх наближення до контрольних значень вже на 15 добу, що

позитивно впливає на процеси загоєння, адже за надмірної експресії та активації *Tgfb* може відбуватися утворення рубцевої тканини. [Baugé C., et al, 2011]. Отже, як було показано вище, за умов лужного опіку стравоходу відбувається запальний процес, який характеризується підвищеним вмістом прозапальних цитокінів та активацією експресії прозапальних генів.

Відомо, що запальні процеси можуть змінювати функціонування компонентів протеолітичної системи та призводити до утворення великої кількості деградованих молекул, внаслідок чого відбувається порушення більшості фізіологічних процесів в організмі. Зважаючи на вищезазначені результати представляє певний інтерес дослідження потенційних змін білкового складу у сироватці крові та стан протеолітичної системи у слизовій оболонці стравоходу та плазмі крові, як факторів, що можуть впливати на процес загоєння опіків стравоходу.

Аналіз електрофореграми білків сироватки крові у щурів за умов ЛОС та за введення меланіну не виявив якісних змін протеїнових фракцій, але були встановлені їх кількісні відмінності.

Таблиця 2

Вміст білкових фракцій (мкг/мг білку) у сироватці крові щурів за умов ЛОС 2 та за введення меланіну; M±m, n=5

Бф, кДа	контроль	7 доба		15 доба		21 доба	
		ЛОС 2	ЛОС 2 + меланін	ЛОС 2	ЛОС2 + меланін	ЛОС2	ЛОС 2 + меланін
168	86,8 ± 2,5	143,0±0,9*	74,2±2,1$^{*\#}$	190,2±0,2*	69±1,5$^{*\#}$	183,8±5,2*	55,1±2,8$^{*\#}$
150	156,7±3,7	219,9±11,4*	39,2±2,3$^{*\#}$	275,0±10,2*	41,9±1,5$^{*\#}$	320,7±19,6*	56,1±2,1$^{*\#}$
130	449,2±28,9	326,4±9,2*	47,1±2,8$^{*\#}$	231,6±8,1*	142,4±1,5$^{*\#}$	73,2±7,4*	26±0,8$^{*\#}$
113	60,8±2,8	9,5±0,8*	43,3±2,05$^{*\#}$	62,4±2,8	13,9±1,2$^{*\#}$	30,6±1,4*	14,5±2,8$^{*\#}$
103	185,2±11,7	21,8±2,6*	25,4±1,6*	33,7±1,7*	23,8±1,6$^{*\#}$	13,6±0,07*	30,1±1,45$^{*\#}$
89	126,0±9,1	6,2±0,2*	60,6±3,5$^{*\#}$	9,8±0,4*	3,9±0,4$^{*\#}$	5,02±0,1*	50,2±2,7$^{*\#}$
67	325±16,7	149,3±2,9*	349,7±7,2$^{\#}$	173,0±17*	128,7±4,8$^{*\#}$	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$^{*\#}$
40	145,0±0,9	40,0±0,6*	54,8±2,5$^{*\#}$	139,0±3,2*	20,1±1,8$^{*\#}$	40,0±0,8*	50,1±1,3$^{*\#}$
25	79,8±3,1	77,0±2,6	50,1±2,1$^{*\#}$	48±0,8*	5,3±0,08$^{*\#}$	18,0±0,05*	53,7±0,8$^{*\#}$
15	74,5±1,9	68,3±1,0*	81,4±1,8$^{*\#}$	20,2±0,1*	38,4±2,7$^{*\#}$	69,8±0,9*	45,5±1,8$^{*\#}$

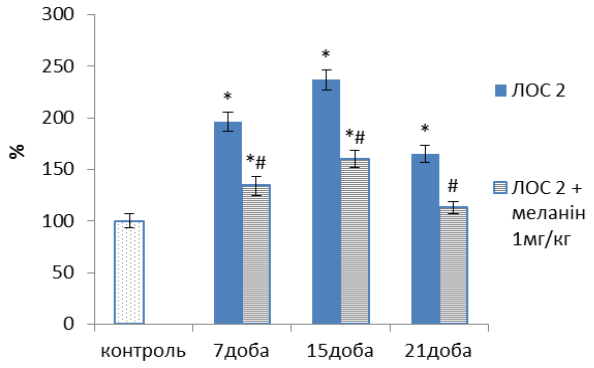
* – p<0,05 порівняно з контролем; # – p<0,05 порівняно з групою ЛОС 2; Бф – білкові фракції

За умов ЛОС 2 спостерігалося 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 раза для фракції М.м. 168 кДа та в 2 раза для фракції з М.м. 150 кДа. За застосування меланіну відзначалося зниження вмісту фракцій з М.м. 168 та 150 кДа як порівняно з ЛОС 2 так, і порівняно з контрольними значеннями.

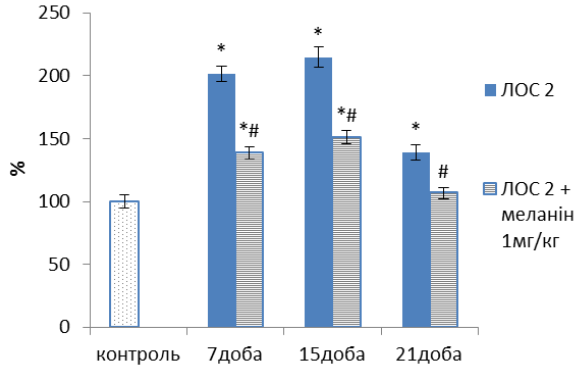
Вміст фракції з М.м. 67 кДа, яка можливо, відповідає сироватковому альбуміну, знижувався у всі досліджувані доби за умов ЛОС 2. Так, на 7 добу

вміст був нижчим за контрольні значення на 54%, за введення меланіну відзначалося менш виразне зниження вмісту даної фракції порівняно з контролем, а також підвищення вмісту даної фракції в 2,3 раза на 7 добу порівняно з показниками за умов ЛОС 2. Зміни вмісту фракцій з М.м. 55, 40, 25 та 15 кДа мали різну динаміку як за умов ЛОС 2 так і за введення 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 раза та на 21 добу в 4,4 раза порівняно з контрольними значеннями.

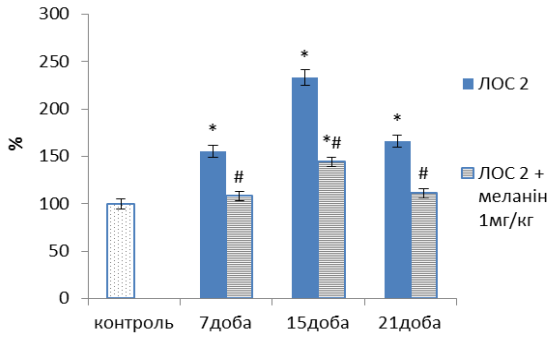
Процес відновлення ушкоджених тканин залежить від балансу між активністю процесів протеолізу і його інгібіторами, тому за порушень цього балансу, може виникнути патологічне загоєння. У ході дослідження протеолітичної ланки (рис. 6) було показано, що за умов ЛОС 2 відбувається зростання загальної протеолітичної активності в 2,4 раза, активності серинових протеїназ в 2,2 раза та ММП у 2,3 раза на 15 добу експерименту. Також варто зазначити, що досліджувані показники за умов ЛОС 2, залишалися вищими за контрольні і на 21 добу. У групі щурів з ЛОС 2, які отримували меланін ці показники були нижчими на 7, 15 та 21 доби, порівняно з показниками за умов ЛОС 2.



А)



Б)

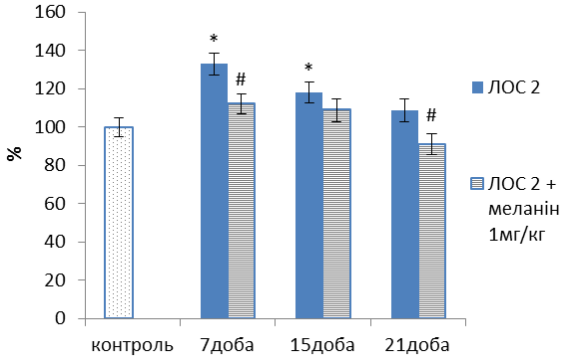


В)

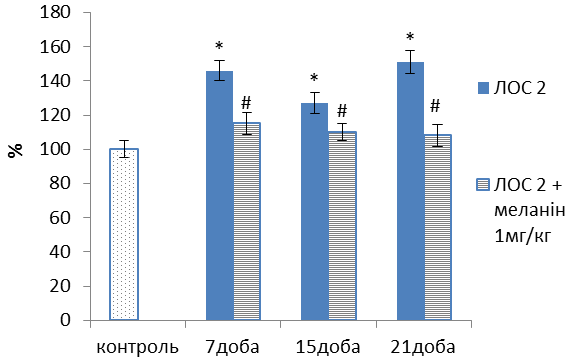
Рис. 6. Загальна протеолітична активність (А), активність серинових протеїназ (Б) та матриксних металопротеїназ (В) у слизовій оболонці стравоходу щурів за умов ЛОС 2 та введення меланіну; M±m, n=8
* – p<0,05 порівняно з контролем
# – p<0,05 порівняно з групою ЛОС 2

Функціонування ММП є дуже важливим етапом у загоєнні рани, але за патологічного загоєння може відбуватися надмірна експресія та активація ММП. Нами було показано підвищення вмісту ММП 1, 2 та 9 в слизовій оболонці стравоходу за умов ЛОС 2 (Рис. 8, А, Б, В), що перевищували контрольні показники на 7 добу в 1,3, 1,5 та 1,5 раза відповідно. У тварин, які

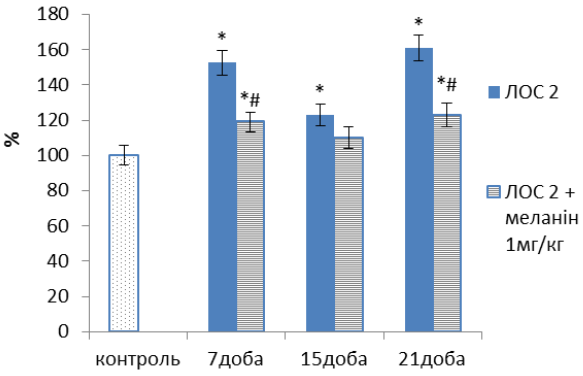
отримували меланін вміст досліджуваних показників був нижчим порівняно з показниками тварин з ЛОС 2.



ММП-1



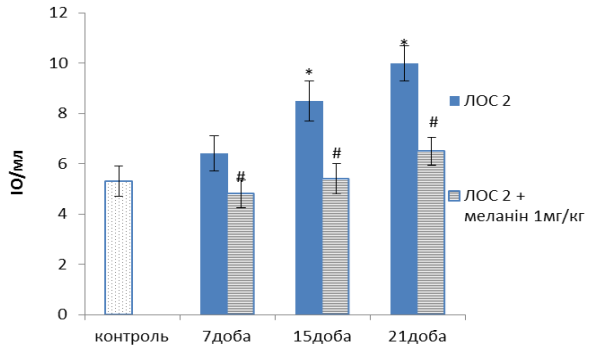
ММП-2



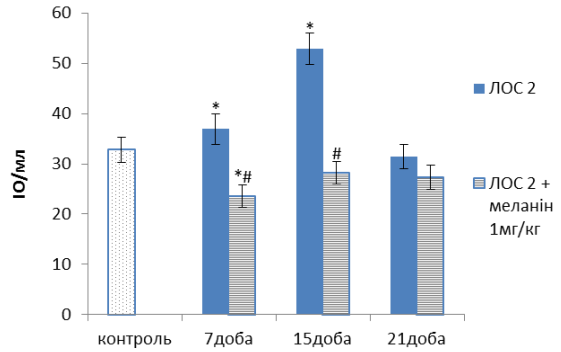
ММП-9

Рис. 8. Відносний вміст ММП-1, -2, -9 у слизовій оболонці стравоходу щурів за умов ЛОС 2 та введення меланіну; M±m, n=10
* – p<0,05 порівняно з контролем
# – p<0,05 порівняно з групою ЛОС 2

Інгібітори протеолізу містяться в тканинах і крові і є одним з механізмів захисту організму від надмірної активності протеолітичних ферментів ендогенного і екзогенного походження. Порушення рівноваги протеїназа-інгібітор протеїназ призводять до виникнення різних патологічних станів [Bergin D., et al, 2012]. Було показано, що за умов ЛОС 2 підвищувалась активність інгібіторів плазми крові α1-антитрипсину (α1-АТ) в 1,6 раза на 15 добу та α2-макроглобуліну (α2-МГ) в 1,9 раза на 21 добу порівняно з контролем (рис. 7).



А)

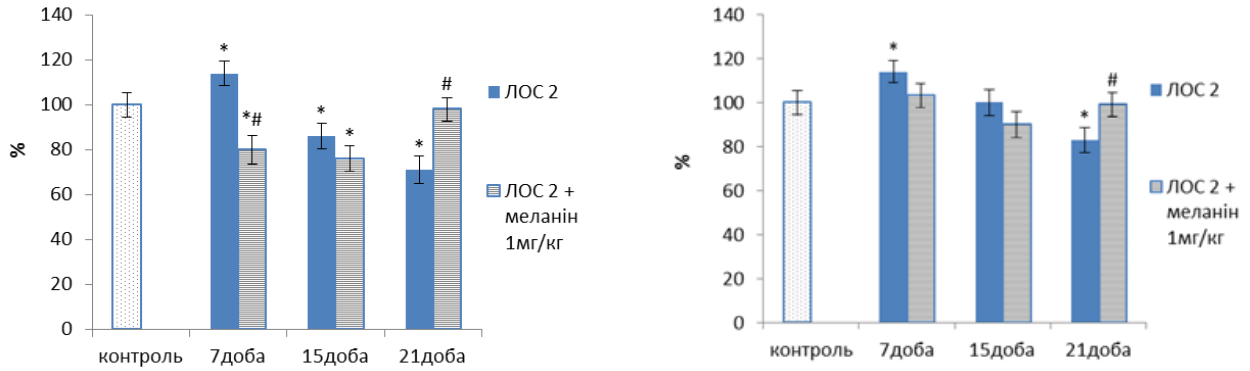


Б)

Рис. 7. Активність α2-макроглобуліну (А) та α1-антитрипсину (Б) у плазмі крові щурів за умов ЛОС 2 та за введення меланіну; M±m, n=10
* – p<0,05 порівняно з контролем; # – p<0,05 порівняно з групою ЛОС 2

Підвищення активності інгібіторів ферментів у плазмі крові щурів протягом експерименту може бути зумовлене компенсаторною реакцією на підвищення протеолітичної активності. За умов застосування меланіну інгібіторна активність α1-АТ та α2-МГ була нижчою на 7, 15 та 21 доби порівняно з показниками за умов ЛОС 2.

Як відомо, проліферативна фаза характеризується активацією фібробластів цитокінами та факторами росту [Werner S., 2007]. На даній стадії фібробласти та кератиноцити мігрують ушкодженими тканинами, допомагаючи відновити судинну сітку, що є важливим етапом загоєння ран [Pastar I., 2014]. Особливе місце у фазі проліферації відводиться ММП, які в період регенеративних процесів можуть надмірно активуватися, але їх надмірна активність може контролюватися за рахунок тканинного інгібітора матриксних металопротеїназ (ТІМП-1) Тому, нашим наступним кроком було дослідження вмісту ТІМП-1 та фактору росту фібробластів (ФРФ) у слизовій оболонці стравоходу. Було показано, що за умов ЛОС 2 відбувається зниження вмісту ТІМП-1 в 1,4 раза та ФРФ в 1,2 раза на 21 добу в слизовій оболонці стравоходу порівняно з контрольними значеннями (рис. 9). За застосування меланіну відзначалися вищі показники вмісту ТІМП-1 та ФРФ порівняно з показниками за умов ЛОС 2.

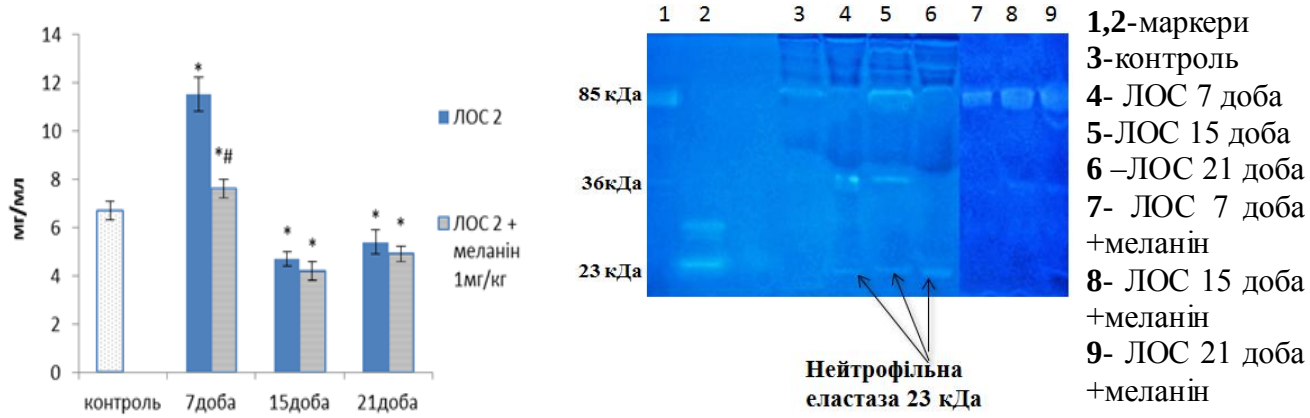


А) Б)

Рис. 9. Відносний вміст ТІМП-1 (А) та фактору росту фібробластів (Б) у слизовій оболонці стравоходу щурів за умов ЛОС 2 та за введення меланіну; M±m, n=10
* – $p<0,05$ порівняно з контролем; # – $p<0,05$ порівняно з групою ЛОС 2

Для аналізу концентрації протеолітичних ферментів плазми крові нами було отримано фракцію трипсино-подібних серинових протеїназ з плазми крові щурів, як за умов ЛОС 2 так і за введення меланіну (рис. 10 А). Було показано підвищення концентрації трипсино-подібних серинових протеїназ на 7 добу, що перевищувало контрольні значення в 1,7 раза. За умов введення меланіну спостерігалося зниження концентрації трипсино-подібних серинових протеїназ в 1,5 раза порівняно з показниками за умов ЛОС 2. За наступного етапу провели аналіз якісного складу трипсино-подібних серинових протеїназ і виявили (рис. 10 Б) значну кількість деградованих форм, що мають ензиматичну активність та можливо утворились, внаслідок деградації плазміну/плазміногену, що можливо свідчить про активацію протеолітичних процесів, які призводять до утворення цих деградованих форм

білків в кровотоці. Було показано наявність фракції, що може відповідати нейтрофільній еластазі яка, як відомо, бере участь в запальному процесі. За застосування меланіну за умов ЛОС 2 відзначено меншу кількість деградованих форм плазміну, а також відсутність фракції, що може відповідати нейтрофільній еластазі.



А) Б)

Рис. 10. Концентрація трипсино-подібних серинових протеїназ (А) та ензимограма якісного складу трипсино-подібних серинових протеїназ (Б) у плазмі крові щурів за умов ЛОС 2 та за введення меланіну; M±m, n=8

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

Також було проведено аналіз ензимограми слизової оболонки стравоходу, що показав наявність протеїнових фракцій з М.м. 92 та 20 кДа за умов ЛОС 2 (рис. 11). Протеїнова фракція з М.м. 92 кДа, ймовірно, відповідає ММП-9, що бере участь у ремоделюванні екстрацелюлярного матриксу. Було показано наявність даної фракції як за умов ЛОС 2, так і за умов застосування меланіну.

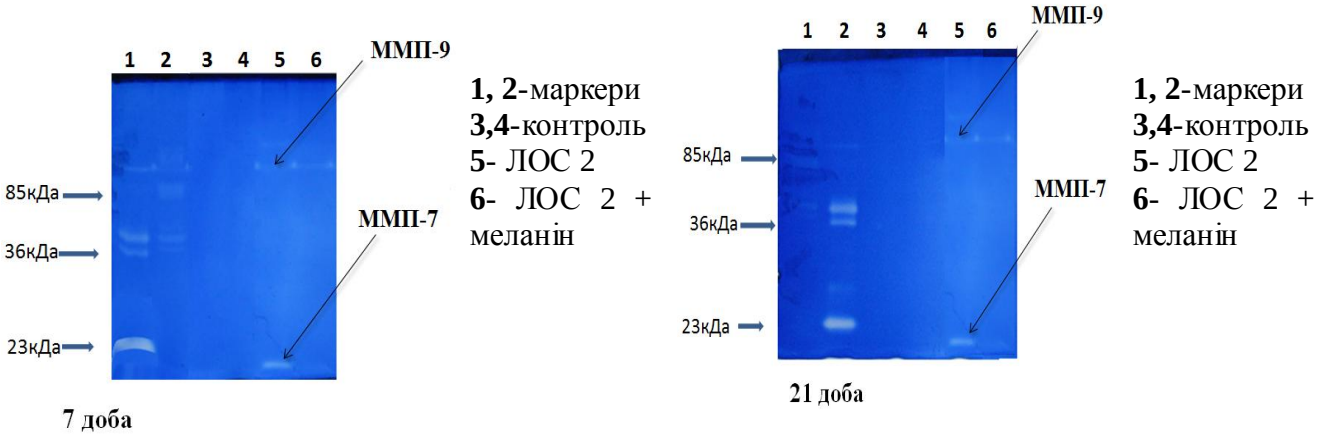


Рис.11. Ензимограма матриксних металопротеїназ в слизовій оболонці стравоходу за умов ЛОС 2 та за введення меланіну

Також на ензимограмі була виявлена фракція з М.м. 20 кДа, що може відповідати ММП-7. Нещодавні дослідження 2015] вказують, що ММП-7 є одним з первинних прогностичних маркерів ракового

переродження тканин стравоходу. Наявність фракції, що може відповідати ММП-7 була відмічена на 7 та 21 добу за умов ЛОС 2, за введення меланіну даної фракції на 7 та 21 добу не спостерігалося (рис. 11).

Ендогенна інтоксикація є одним з найважливіших критеріїв, що визначають важкість стану людини після опіку [Фисталь Е., 2005; Поликарпова А., 2011; Kozinets G., 2012]. Для оцінки рівня ендогенної інтоксикації було визначено вміст МСМ та концентрацію олігопептидів (ОП) (Рис. 12 А, Б), які утворюються за патологічних умов та можуть обтяжувати репаративні процеси.

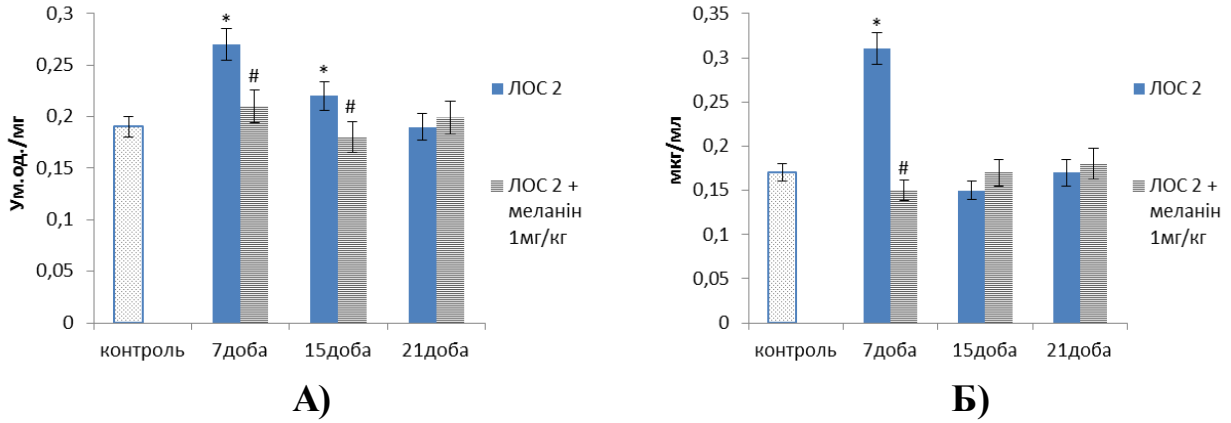


Рис. 12. Вміст молекул середніх мас (А) та концентрація олігопептидів (Б) у сироватці крові щурів за умов ЛОС 2 та введення меланіну; M±m, n=10
* – $p<0,05$ порівняно з контролем; # – $p<0,05$ порівняно з групою ЛОС 2

Встановлено, що за умов ЛОС 2 підвищувалися вміст МСМ та концентрація олігопептидів у сироватці крові переважно на 7 добу в 1,4 та 1,8 раза відповідно, порівняно з контролем. За введення меланіну показники МСМ та олігопептидів були нижчими порівняно з показниками за умов ЛОС 2.

Таким чином, було показано, що за умов ЛОС 2 відбуваються порушення біохімічних параметрів сироватки крові, в роботі антиоксидантного захисту, зміни в імунній ланці як на рівні вмісту цитокінів так і на рівні експресії прозапальних генів. Відбувається значна активація протеолітичних процесів. Введення меланіну сприяє нормалізації досліджуваних показників, можна стверджувати, що меланін, володіючи протизапальними, антиоксидантними та цитопротекторними властивостями, пришвидшує процеси загоєння за умов ЛОС 2.

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. Спостерігалося 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 рази, відповідно) та тканинах стравоходу (в 6 раз 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 (α1-антитрипсин в 1,9 раза на 15 добу, α2-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. Спостерігалося 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 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.**, 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. (*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 основних наукових доповідей

1. **Chornenka NM**, Raetska YA. B, Savchuk OM. Dynamics change of proteolytic activity under experimental burns of the esophagus and correction of melanin. PHOENIX, the second edition of our International Medical Students' Conference 22-26 March, India, 2017. - P. 192

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

3. **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», BIMCO, 26-28 квітня 2017 р.: матер. конфер. – Чернівці, 2017. - С. 59

4. **Чорненька Н.М**., Раєцька Я.Б Савчук О.М. Рівень матриксних металопротеїназ у сироватці крові щурів при лужному опіку стравоходу за умов введення меланіну. XIII Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології», 25 – 27 квітня 2017 р.: матер. конфер. – Львів, 2017. - С. 59

5. П'ятківська Н.В., **Чорненька Н.М.,** Раєцька Я.Б. Показники азотистого обміну при лужному опіку стравоходу за умов введення меланіну. Сучасні проблеми біології, екології та хімії V Міжнародна науково-практична конференція, 26-28 квітня 2017 р.: матер. конфер. - Запоріжжя, 2017.- С. 173

6. **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. – P. 27.

7. **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. Netherlands, 4-8 June, 2018. – P. 244

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, Київ, 2019.

Дисертація присвячена дослідженню процесів загоєння за лужного опіку стравоходу та потенційного впливу на ці процеси меланіну.

Отримані результати показали, що за умов лужного опіку стравоходу порушувались функції антиоксидантної системи, відбувалася активація імунної ланки, підвищувався вміст прозапальних та знижувався вміст протизапальних цитокінів. Відзначався високий вміст IgG на 21 добу після ЛОС, що може вказувати на перехід запальної реакції в хронічну фазу. Показано зростання рівня експресії прозапальних генів у крові та тканинах стравоходу: *Ptgs2* та *Tgfb1* за умов ЛОС. Виявлені кількісні зміни вмісту білкових фракцій, підвищення глобулінової та зниження альбумінової фракцій у сироватці крові за умов ЛОС. Відзначалися порушення функціонування в системі протеолізу, що призводило до високої протеолітичної активності, утворення деградованих форм плазміногену/плазміну, появи нейтрофільної еластази. Виявлено появу активної білкової фракції в слизовій оболонці стравоходу, що може відповідати ММП-7, за умов ЛОС може свідчити про можливе злоякісне переродження тканин стравоходу в майбутньому. Введення меланіну впродовж 14 діб щурам з ЛОС, призводило до нормалізації стану системи антиоксидантного захисту та імунних процесів і виявляло позитивний вплив на стан системи протеолізу. За впливу меланіну, рівень експресії генів *Ptgs2* та *Tgfb1* змінювався в сторону показників контрольної групи щурів.

Ключові слова: лужний опік стравоходу, меланін, імунні процеси, протеоліз.

АННОТАЦИЯ

Чорненькая Н.М. Процессы заживления щелочного ожога пищевода у крыс в условиях введения меланина. - Квалификационный научный труд на правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.04 - биохимия. - Киевский национальный университет имени Тараса Шевченко, Киев, 2019.

Диссертация посвящена исследованию процессов заживления в условиях щелочного ожога пищевода и введении меланина.

Полученные результаты показали, что в условиях щелочного ожога пищевода нарушались функции антиоксидантной системы, происходила активация иммунной звена, повышалось содержание провоспалительных и снижалось содержание противовоспалительных цитокинов. Отмечался высокий уровень IgG на 21 сутки после ЛОС, что может указывать на переход воспалительной реакции в хроническую фазу. Показано повышение уровня экспрессии провоспалительных генов в крови и тканях пищевода *Ptgs2* и *Tgfb1* в условиях ЛОС. Выявленные количественные изменения содержания белковых фракций, повышение глобулиновой и снижение альбуминовой фракций в сыворотке крови в условиях ЛОС. Отмечались нарушения функционирования в системе протеолиза, что приводило к высокой протеолитической активности, образования деградированных форм плазминогена/плазмина, появления нейтрофильной эластазы. Выявлено появление активной белковой фракции в слизистой оболочке пищевода, что может соответствовать ММП-7, в условиях ЛОС это может свидетельствовать, о возможном злокачественное перерождение тканей пищевода в будущем. Введение меланина в течение 14 дней крысам с ЛОС, приводило к нормализации состояния системы антиоксидантной защиты и иммунных процессов и проявляло положительное влияние на состояние протеолиза. Под влиянием меланина, уровень экспрессии генов *Ptgs2* и *Tgfb1* менялся в сторону показателей контрольной группы крыс.

Ключевые слова: щелочной ожог пищевода, меланин, иммунные процессы, протеолиз.

SUMMARY

Chornenka N.M. Processes of healing alkaline burn of the esophagus in rats under conditions of introduction of melanin. - Qualifying scientific work on the rights of manuscripts.

Thesis for obtaining the Candidate of Sciences degree in Biology, specialty 03.00.04 - Biochemistry. - Taras Shevchenko National University of Kyiv, Ministry of Education and Science of Ukraine, Kyiv, 2019.

The dissertation is devoted to research of healing processes under alkaline burn of the esophagus (ABE) and under conditions of application of melanin.

Burns are one of the most common causes of childhood injuries. The esophagus chemical burns are usually given to children aged 1 to 3, due to the availability and variety of a large number of chemicals that can accidentally be consumed by the child. Today it is important to study the processes of healing after chemical burns of the esophagus. It can help in the development of effective treatment. For simulation of alkaline burn of the esophagus, sodium hydroxide (NaOH) was chosen, since alkaline substances are more common in everyday life. In the first phase of our research, we conducted the determination of basic biochemical parameters in blood serum under conditions of ABE and in the application of

melanin. According to the results obtained, it was shown that in the ABE there was a decrease in the concentration of total protein and albumin, an increase of urea and creatinine, an increase the activity of AST and ALT, the ion exchange rates changed. The introduction of melanin showed a normalization of the studied parameters under conditions of ABE. In the conditions of ABE the functions of the antioxidant system were violated, the activation of the immune system was active, the content of proinflammatory increased and the content of antiinflammatory cytokines decreased. There was a high content of IgG 21 days after ABE, which may indicate the transition of inflammatory response to the chronic phase. The growth of the level of expression of proinflammatory genes in blood and esophagus tissues: *Ptgs2* and *Tgfb1* in the conditions of ABE have been shown. The revealed quantitative changes in the protein fraction content, increased globulin and decreased albumin fractions in serum under conditions of ABE. There were violations of functioning in the system of proteolysis, which led to high proteolytic activity, the formation of degraded forms of plasminogen/plasmin, the appearance of neutrophilic elastase. The appearance of an active protein fraction in the esophagus mucosa, which may correspond to MMP-7, under the conditions of ABE, may indicate a possible malignant degeneration of the esophagus tissues in the future. The introduction of melanin for 14 days to rats with ABE led to the normalization of the system of antioxidant defense and immune processes and had a positive effect on the state of the proteolysis system. Under the influence of melanin, the level of expression of the genes *Ptgs2* and *Tgfb1* varied towards the control group of rats.

Key words: alkaline burn of esophagus, melanin, immune processes, proteolysis.