

РОЛЬ ТУЧНЫХ КЛЕТОК В РЕПАРАЦИИ КОЖИ ПОСЛЕ ТЕРМИЧЕСКОЙ ТРАВМЫ ПРИ ПРИМЕНЕНИИ ДЕРМАЛЬНОЙ ПЛЕНКИ С МЕЛАТОНИНОМ

М. В. Осиков^{1,2}, А. А. Агеева¹✉, А. А. Федосов³, В. А. Ушакова¹

¹ Южно-Уральский государственный медицинский университет, Челябинск, Россия

² Челябинская областная клиническая больница, Челябинск, Россия

³ Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия

Разработка и патогенетическое обоснование применения новых средств для локальной терапии термической травмы (ТТ) — одна из актуальных проблем медицины. Мелатонин (МТ) — эндогенный фактор регуляции гомеостаза с плеiotропным потенциалом. Целью работы было оценить показатели репарации, функциональное состояние тучных клеток (ТК), содержание матриксной металлопротеиназы-9 (MMP-9) и фактора роста сосудистого эндотелия (VEGF) в очаге повреждения кожи в динамике экспериментальной ТТ в условиях применения оригинальной дермальной пленки (ДП) с МТ. ТТ степени IIIA площадью 3,5% моделировали погружением участка кожи в кипящую воду. ДП площадью 12 см² с МТ в концентрации 5 мг/г наносили ежедневно в течение пяти суток. Вычисляли площадь раны и скорость ее эпителизации, в ожоговой ране определяли число ТК и интенсивность дегрануляции, экспрессию MMP-9 и VEGF. В динамике ТТ абсолютная площадь ожоговой раны уменьшается на 35%, увеличивается скорость ее эпителизации, в очаге ТТ увеличивается число ТК, изменяется их функциональная характеристика; увеличивается экспрессия MMP-9 и VEGF. Выявлена обратная связь площади ожоговой раны с экспрессией MMP-9 и VEGF, коэффициентом дегрануляции ТК. Применение МТ при ТТ ведет к уменьшению площади ожоговой раны, увеличению скорости ее эпителизации, увеличению в ожоговой ране общего числа ТК и дегрануляции на 5-е и 10-е сутки, снижению общего числа и дегрануляции ТК на 20-е сутки ТТ (166,87 (154,95; 178,78) ед./мм²; в контроле — 464,84 (452,92; 476,76) ед./мм²), увеличению экспрессии MMP-9 на 5-е сутки (14,20 (11,30; 18,10); в контроле — 3,30 (2,20; 4,40)), экспрессии VEGF на 5-е и 10-е сутки (33,00 (30,20; 34,90); в контроле — 25,40 (22,20; 29,30)), снижению экспрессии MMP-9 на 10-е и 20-е сутки ТТ.

Ключевые слова: термическая травма, мелатонин, дермальная пленка, тучные клетки, репарация, VEGF, MMP-9

Финансирование: исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ и Челябинской области в рамках научного проекта № 20-415-740016

Вклад авторов: М. В. Осиков — концепция и дизайн исследования, интегральный анализ полученных данных, написание текста, редактирование рукописи; А. А. Агеева — набор экспериментального материала, статистическая обработка и анализ полученных данных, написание текста; А. А. Федосов — анализ результатов, редактирование рукописи; В. А. Ушакова — создание дермальной пленки, анализ полученных данных.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом Южно-Уральского государственного медицинского университета г. Челябинск (протокол № 10 от 15 ноября 2019 г.), выполнено в стандартных условиях вивария при строгом соблюдении требований по уходу и содержанию животных, а также выводу их из эксперимента с последующей утилизацией в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (ETS № 123 от 18 марта 1986 г., Страсбург), Рекомендациями Европейской комиссии 2007/526/ЕС от 18 июня 2007 г. по содержанию и уходу за животными, используемыми в экспериментальных и других научных целях, а также Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского союза от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях в соответствии с правилами гуманного отношения к животным, методическими рекомендациями по их выведению из опыта и эвтаназии.

✉ **Для корреспонденции:** Анна Алексеевна Агеева
ул. Воровского, д. 64, г. Челябинск, 454092; anne.ageeva.r@yandex.ru

Статья получена: 28.06.2021 **Статья принята к печати:** 12.07.2021 **Опубликована онлайн:** 07.08.2021

DOI: 10.24075/vrgmu.2021.035

ROLE OF MAST CELLS IN SKIN REGENERATION AFTER THERMAL BURN TREATED WITH MELATONIN-ENRICHED DERMAL FILM

Osikov MV^{1,2}, Ageeva AA¹✉, Fedosov AA³, Ushakova VA¹

¹ South-Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russia

² Chelyabinsk Regional Clinical Hospital, Chelyabinsk, Russia

³ Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

The development of novel local therapies for thermal burns (TB) and their pathogenetic rationale are a pressing challenge. Melatonin (MT) is an endogenous factor of hemostasis regulation with pleiotropic potential. The aim of this study was to assess some parameters of tissue regeneration, the functional state of mast cells and the levels of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in the experimentally induced TB treated with the original MT-enriched dermal film (DF). A second-degree burn (3.5% of the total body surface area) was modelled by exposing a patch of skin to hot water. Applications of 12 cm² DF enriched with 5 mg/g MT were performed every day for 5 days. The following parameters were calculated: the wound area, the rate of wound epithelization, the number of MC in the wound, the intensity of degranulation, and the levels of MMP-9 and VEGF expression. Over the course of treatment, the absolute wound area shrank by 35%, its epithelization rate increased, the number of MC rose, their functional state changed, and the expression of MMP-9 and VEGF increased. A negative correlation was established between the wound area and the expression of MMP-9 and VEGF, as well as between the wound area and the degranulation coefficient. Applications of MT-enriched DF resulted in the reduction of the wound area, higher epithelization rate, an increase in the total MC count and degranulation intensity on days 5 and 10; it also led to a reduction in the total MC count and a loss in degranulation intensity on day 20 (166.87 (154.95; 178.78) un/mm² vs. 464.84 (452.92; 476.76) un/mm²) in the group of intact animals), an increase in MMP-9 expression on day 5 (14.20 (11.30; 18.10) vs. 3.30 (2.20; 4.40) in the intact group), an increase in VEGF expression on days 5 and 10 (33.00 (30.20; 34.90) vs 25.40 (22.20; 29.30) in the intact group), and a reduction in MMP-9 expression on days 10 and 20 after thermal injury.

Keywords: thermal burn, melatonin, dermal film, mast cells, regeneration, VEGF, MMP-9

Funding: the study was supported by the Russian Foundation for Basic Research and the government of Chelyabinsk region (Project ID 20-415-740016).

Author contribution: Osikov MV — study concept and design; integral analysis of the obtained data; manuscript preparation and editing; Ageeva AA — data acquisition; statistical analysis; analysis of study results; manuscript preparation; Fedosov AA — analysis of study results; manuscript editing; Ushakova VA — synthesis of the dermal film; analysis of study results.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of South-Ural State Medical University (Protocol № 10 dated November 15, 2019). The study was conducted at a standard vivarium in strict compliance with guidelines on the care and euthanasia of laboratory animals outlined in the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS № 123, March 18, 1986, Strasbourg), the EU Commission Recommendation 2007/526/EC on Guidelines for the Accommodation and Care of Animals used for Experimental and other Scientific Purposes (June 18, 2007), and the Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council on the Protection of Animals used for Scientific Purposes (September 22, 2010).

✉ **Correspondence should be addressed:** Anna A. Ageeva
Vorovskogo, 64, Chelyabinsk, 454092; anne.ageeva.r@yandex.ru

Received: 28.06.2021 **Accepted:** 12.07.2021 **Published online:** 07.08.2021

DOI: 10.24075/brsmu.2021.035

Термическая травма часто связана с высокой смертностью, а также временной нетрудоспособностью пораженных. По данным ВОЗ, ежегодно около 11 млн человек нуждаются в медицинской помощи после ожогов, многие из них имеют ограничение трудоспособности, ежегодно от ожогов умирает около 200 тыс. человек [1]. Несмотря на значительные достижения в лечении ожогов, в том числе применение пересадки кожи, стволовых клеток и других методов, медленное заживление, присоединение инфекции и образование рубцов составляют ключевые проблемы в комбустиологии, что приводит к удлинению сроков госпитализации, пожизненным физическим дефектам, снижению качества жизни и эмоциональным расстройствам [2]. Данную ситуацию в значительной степени объясняют сложность и многообразие патогенетических механизмов, лежащих в основе развития, течения и исхода термической травмы (ТТ). По мнению комбустиологов, понимание патофизиологии ТТ необходимо для ограничения прогрессирования ожогов, разработки патогенетически обоснованных методов закрытия раны [3]. В патогенезе ТТ ключевое значение имеют активность нейтрофилов, макрофагов, различных субпопуляций лимфоцитов, изменение цитокинового профиля, активация процессов свободно-радикального окисления, ответа острой фазы, определяющие интенсивность и эффективность репаративных реакций в очаге повреждения [4]. Одними из первых на ТТ реагируют тучные клетки (ТК), в большом количестве присутствующие в коже. Их рассматривают как резидентные воспалительные клетки, содержащие в гранулах широкий спектр преформированных и синтезируемых *de novo* медиаторов, участвующих в сосудисто-экссудативных реакциях, формировании боли, пролиферации фибробластов, синтезе коллагена, ремоделировании рубца. Регуляция функции мастоцитов при ТТ — перспективное направление при разработке новых терапевтических подходов [5].

Современные перевязочные средства разрабатывают для активации заживления, предотвращения обезвоживания раны, а не только для ее покрытия. Они представлены гидрогелевыми, гелевыми на текстильной основе, гидроколлоидными повязками, повязками из полиуретановой губки, альгинатно-кальциевыми и др. [6]. Большую часть раневых покрытий производят зарубежные фирмы, в связи с чем разработка оригинальной дермальной пленки (ДП) для применения при ТТ представляет интерес. В состав раневых покрытий могут входить антисептики и местные анестетики, гемостатики, антиоксиданты, ранозаживляющие, стимуляторы регенерации различной природы и др. В государственном реестре лекарственных средств содержатся сведения об единичных лекарственных пленках: десневые с нитроглицерином, оральнодисперсные с силденафилом, глазные с таурином. Особое внимание при поиске новых терапевтических подходов при ТТ уделяется регуляторам гомеостаза эндогенного происхождения [7, 8]. Потенциальный, но вполне обоснованный с теоретических позиций интерес при обсуждении перспективных терапевтических агентов при ТТ связан с мелатонином (МТ). Наиболее известна роль МТ в регуляции ритмов сон-бодрствование, возбуждения нейронов, синхронизации ритмов и физиологических функций [9]. По современным представлениям, МТ — это эндогенный фактор с мультитропными эффектами, включая антиоксидантные, про- и противовоспалительные, иммуномодулирующие, антиапоптозные эффекты, регуляцию пролиферации и дифференцировки клеток, которые привлекают внимание

в связи с возможностью применения для терапии [10]. В доступной литературе представлены единичные работы о разрабатываемых покрытиях с МТ для раневых дефектов, не исследован механизм локального действия мелатонина при ТТ, а на фармацевтическом рынке в РФ отсутствуют лекарственные формы с МТ для локального применения при ТТ [11, 12]. Кожа млекопитающих обладает собственной мелатонинергической системой [13]. Рецепторы МТ обнаружены в коже не только в кератиноцитах и фибробластах, клетках волосяного фолликула и меланоцитах, но и в ТК, что предполагает участие МТ в регуляции функциональной активности ТК, в том числе в контексте ограничения сосудисто-экссудативных и стимулирующих репаративных реакций в коже после ТТ [14]. Кроме того, клетки кожи, в том числе ТК, сами способны синтезировать и секретировать МТ. Однако механизм предполагаемого влияния МТ на участие ТК в репарации кожи после ТТ до конца не ясен и может быть связан с секрецией тучными клетками матриксной металлопротеиназы-9 (MMP-9) и фактора роста сосудистого эндотелия (VEGF). Цель исследования — оценить показатели репарации, функциональное состояние ТК, содержание MMP-9 и VEGF в очаге повреждения кожи в динамике экспериментальной ТТ в условиях применения оригинальной ДП с МТ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперимент выполнен на 70 крысах-самцах линии Wistar массой 200–240 г. Животные были случайным образом разделены на четыре группы: группу 1 ($n = 7$) — интактные животные; группу 2 ($n = 21$) — животные с ТТ и наложением асептической повязки (ТТ + АСП); группу 3 ($n = 21$) — животные с ТТ и наложением ДП-матрицы и асептической повязки (ТТ + ДП); группу 4 ($n = 21$) — животные с ТТ в условиях применения ДП с МТ и асептической повязки (ТТ + ДП МТ). Асептическую повязку и ДП меняли ежедневно до 20 суток после ТТ.

Наиболее частыми причинами ТТ являются горячая жидкость и пламя; у двух третей больных площадь ожога составляет менее 10% поверхности тела [15]. В связи с этим для моделирования ТТ II степени по МКБ-10 (IIIА степени по классификация XXVII съезда хирургов СССР 1960 г.) относительной площадью 3,5% поверхности тела межлопаточный участок погружали в дистиллированную воду при 98–99 °С на 12 с. Глубину ожога верифицировали морфологическими методами. Для анестезии использовали препарат, содержащий тилетамин и золазепам в дозе 20 мг/кг. ДП-матрицу и ДП с МТ площадью 12 см² в группах 3 и 4 соответственно наносили сразу после ТТ, закрепляя асептической повязкой, а затем ежедневно при перевязке в течение пяти суток. В предварительных исследованиях был разработан состав ДП на основе натрийкарбоксиметилцеллюлозы (поли-1,4-β-О-карбоксиметил-Д-пиранозил-Д-гликопираноза натрия), с включением МТ в концентрации 5 мг/г. Проведена оценка ДП по фармако-технологическим параметрам: органолептическим показателям (вид, цвет, прозрачность, эластичность, наличие примесей и микротрещин), адгезивным свойствам, механической прочности на разрыв, толщине [16]. В группе 3 использовали аналогичную по площади и свойствам, но не содержащую МТ ДП (ДП-матрица).

Для вычисления площади раны на 5-е, 10-е и 20-е сутки после ТТ методом цифровой планиметрии использовали

фотокамеру «Nikon Coolpix S2800» (Nikon; Китай) и пакет программ «Microsoft Office Visio» (Microsoft; США). Скорость эпителизации (VS) рассчитывали по формуле: $VS = S - S_n / t$, где S — начальная площадь раны до лечения (в дальнейшем, площадь при предыдущем измерении); S_n — площадь при последующем измерении; t — число дней между измерениями. Площадь раны в последующих измерениях определяли в %, принимая за 100% площадь до лечения, результат выражали в % / сут.

На 5-е, 10-е и 20-е сутки от момента индукции ТТ кожный лоскут иссекали по границе раны с захватом участка неповрежденной кожи для проведения морфологических и иммуногистохимических исследований. Микроскопические исследования проводили на микроскопе «DMRXA» (Leika; Германия) с использованием компьютерной программы «ImageScore M» (Германия), совмещенной с микроскопом, при увеличении $\times 100$ и $\times 400$.

После окрашивания срезов толуидиновым синим (рН = 2,0) (Biovitrum; Россия) проводили подсчет общего числа тучных клеток, числа клеток в разной степени дегрануляции: I степень (1–2 гранулы за пределами клетки), II степень (3–10 гранул за пределами клетки), III степень (больше 10 гранул за пределами клетки); средней яркости ТК. Вычисляли коэффициент дегрануляции ТК как соотношение числа дегранулированных ТК к общему числу мастоцитов в 10 случайных полях зрения препарата.

Оценку содержания матриксной металлопротеиназы-9 (MMP-9) и фактора роста сосудистого эндотелия (VEGF) в ожоговой ране проводили иммуногистохимическим методом с использованием специфичных поликлональных антител к MMP-9 крысы (host – rabbit, номер в каталоге — PAA553Ra01 «Cloud-Clone Corp.»; Китай) и поликлональных антител к VEGF крысы (host rabbit, каталожный номер PAA143Ra01 «Cloud-Clone Corp.»; Китай) и полимерной системы детекции «Rabbit HRP/DAB Detection IHC Detection Kit» (Abcam; Латвия) для обнаружения в срезах тканей иммуноглобулинов кролика, связанных с антигеном. В качестве субстрата/хромогена для визуализации полимерного комплекса в системе использовали диаминобензидин. Определяли относительную площадь MMP-9 и VEGF-положительно окрашенных структур, а также интегральный показатель содержания MMP-9 и VEGF

как произведение относительной площади окрашенных структур на интенсивность окраски в баллах; результат выражали в условных единицах (ед./мм²).

Результаты обрабатывали с использованием программы IBM SPSS Statistics 19 («SPSS: An IBM Company»; США). Показатели представляли в виде медианы (Me) и квартилей (Q₁; Q₃). Значимость различий между группами оценивали при помощи критериев Краскелла–Уоллиса, Манна–Уитни, Вальда–Вольфовитца. Для выявления связи между изучаемыми параметрами использовали коэффициент корреляции Спирмена (R). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,01$ с учетом поправки Бонферрони.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При оценке параметров репарации ожоговой раны при ТТ (группа 2) обнаружено, что в динамике наблюдений на 10-е сутки наблюдения по сравнению с пятью сутками уменьшается абсолютная площадь раневого дефекта, что приводит к увеличению расчетных показателей — скорости эпителизации раны и доли уменьшения ее площади (табл. 1). На 20-е сутки эксперимента абсолютная площадь ожога уменьшается по сравнению с пятью и 10-ми сутками, относительная площадь ожога уменьшается по сравнению с пятью сутками наблюдения, что сопровождается увеличением скорости эпителизации раны и доли уменьшения ее площади по сравнению с пятью и 10-ми сутками. Площадь раневого дефекта от пятых к 20-м суткам экспериментальной ТТ уменьшилась по медиане на 35%.

Для изучения роли ТК в патофизиологии раневого процесса проводили оценку их представительства и активности по интенсивности дегрануляции в ожоговой ране (табл. 2). На 5-е сутки в ожоговой ране общее число ТК увеличивается на 43% по медиане, что может быть связано с активной миграцией базофилов из кровотока в очаг повреждения. Более чем в 3 раза возрастает число дегранулированных ТК: с I степени дегрануляции — в 3 раза, со II степени дегрануляции — в 4 раза, с III степени дегрануляции — в 10 раз, коэффициент дегрануляции возрастает в 3,5 раза по медиане относительно группы

Таблица 1. Показатели репарации ожоговой раны при экспериментальной ТТ и в условиях применения ДП с МТ (Me (Q₂₅; Q₇₅))

Показатели	Группа 2 (ТТ + АсП)			Группа 3 (ТТ + ДП)			Группа 4 (ТТ + МТ ДП)		
	5-е сутки (n = 7)	10-е сутки (n = 7)	20-е сутки (n = 7)	5-е сутки (n = 7)	10-е сутки (n = 7)	20-е сутки (n = 7)	5-е сутки (n = 7)	10-е сутки (n = 7)	20-е сутки (n = 7)
Площадь ожога, см ²	11,66	9,48	7,59	11,59	9,4	7,29	10,33	8,34	5,54
	(11,50; 11,94)	(9,28; 9,93)	(7,23; 7,84)	(11,00; 11,99)	(9,22; 9,81)	(7,01; 7,52)	(10,17; 10,56)	(8,19; 8,51)	(5,24; 5,88)
		*	**				#	#	#
Относительная площадь, %	3,34	3,17	2,99	3,31	3,16	2,81	3,36	3,02	1,98
	(3,25; 3,39)	(3,10; 3,29)	(2,94-3,12)	(3,22; 3,42)	(3,10; 3,28)	(2,74-3,09)	(3,23; 3,42)	(2,91; 3,13)	(1,87; 2,23)
			*					#	#
Скорость эпителизации, % / сутки	0,89	1,9	2,26	0,91	2,01	3,06	1,33	6,57	14,3
	(0,86; 0,89)	(1,88; 1,95)	(2,14; 2,55)	(0,85; 0,92)	(1,93; 2,05)	(2,73; 3,15)	(1,29; 1,35)	(5,92; 6,93)	(13,38; 15,17)
		*	**				#	#	#
Уменьшение площади раны, %	2,61	3,68	11,49	2,6	3,71	13,58	9,8	16,1	19,98
	(2,59; 2,64)	(3,53; 4,23)	(11,43; 11,64)	(2,58; 2,64)	(3,63; 4,31)	(12,93; 14,01)	(9,64; 10,08)	(14,62; 17,73)	(19,30; 20,38)
		*	**				#	#	#

Примечание: * — статистически значимые ($p < 0,01$) различия с группой 2 на 5-е сутки; ** — с группой 2 на 10-е сутки; # — с группой 3 на соответствующие сутки.

Таблица 2. Функциональная характеристика тучных клеток в очаге повреждения при экспериментальной ТТ и в условиях применения ДП с МТ (Ме (Q₂₅; Q₇₅))

Показатели	Группа 1 Интактные (n = 7)	Группа 2 (ТТ + АСП)			Группа 3 (ТТ + ДП)			Группа 4 (ТТ + МТ ДП)		
		5-е сутки (n = 7)	10-е сутки (n = 7)	20-е сутки (n = 7)	5-е сутки (n = 7)	10-е сутки (n = 7)	20-е сутки (n = 7)	5-е сутки (n = 7)	10-е сутки (n = 7)	20-е сутки (n = 7)
Общее число клеток, ед./мм ²	166,87	238,38	286,05	441	226,46	286,06	464,84	250,3	369,49	166,87
	(160,91; 172,82)	(226,46; 238,38) *	(274,14; 286,05) *	(441,00; 452,92) * # # #	(202,62; 262,22)	(274,14; 297,97)	(452,92; 476,76)	(250,30; 250,30)	(357,57; 381,41)	(154,95; 178,78)
					*	*	*	* &	* &	&
Число дегра- нуированных клеток, ед./мм ²	35,76	178,78	166,87	214,54	178,78	166,87	226,46	202,62	190,7	83,43
	(35,76; 41,72)	(166,87; 178,78) *	(154,95; 178,78) *	(202,62; 214,54) * # # #	(154,95; 190,70)	(166,87; 178,78)	(226,46; 250,30)	(190,70; 214,54)	(178,78; 202,62)	(83,43; 83,43)
					*	*	*	* &	* &	* &
Число дегра- нуированных клеток I ст., ед./мм ²	23,84	83,43	59,59	178,78	83,43	59,6	178,78	143,03	154,95	59,6
	(11,92; 29,79)	(71,51; 83,43)	(47,68; 71,51)	(178,78; 178,78) * # # #	(71,51; 95,35)	(59,60; 71,51)	(178,78; 202,62)	(143,03; 154,95)	(131,11; 154,95)	(59,60; 59,60)
		*	* #		*	*	*	* &	* &	* &
Число дегра- нуированных клеток II ст., ед./мм ²	11,92	47,68	35,76	11,92	47,68	47,68	13,84	35,76	23,84	13,84
	(0; 17,88)	(35,76; 47,68)	(35,76; 47,68)	(11,92; 11,92)	(35,76; 47,68)	(23,84; 59,60)	(13,84; 13,84)	(35,76; 59,60)	(23,84; 39,20)	(11,92; 15,76)
		*	* #	# # #	*	*	*	*	* &	
Число дегра- нуированных клеток III ст., ед./мм ²	5,96	59,59	59,59	11,92	59,6	59,6	23,84	11,92	11,92	11,92
	(0; 11,92)	(47,68; 59,59)	(59,59; 83,43)	(11,92; 11,92)	(35,76; 59,60)	(47,68; 71,51)	(11,92; 23,84)	(11,92; 23,84)	(0,00; 11,92)	(0,00; 11,92)
		*	*	# # #	*	*	*	* &	* &	* &
Коэффициент дегрануляции клеток, у.е.	0,22	0,75	0,59	0,49	0,76	0,6	0,5	0,81	0,5	0,5
	(0,21; 0,26)	(0,73; 0,76)	(0,56; 0,63)	(0,49; 0,49)	(0,71; 0,77)	(0,56; 0,61)	(0,48; 0,53)	(0,81; 0,86)	(0,48; 0,53)	(0,47; 0,54)
		*	* #	* # # #	*	*	*	* &	* &	*
Яркость клеток средняя, у.е.	79,51	57,14	33,83	37,69	57,38	38	36,38	51,36	38,13	37,87
	(73,14; 83,76)	(51,36; 64,76)	(33,67; 39,22)	(37,69; 39,33)	(50,0; 58,42)	(33,26; 39,57)	(34,36; 37,9599)	(48,50; 59; 32)	(33,83; 40,78)	(32,50; 39,33)
		*	* #	* #	*	*	*	*	*	*

Примечание: * — значимые ($p < 0,01$) различия с группой 1, # — с группой 2 на 5 сутки, ## — с группой 2 на 10 сутки, & — с группой 3 на соответствующие сутки.

интактных животных. Обращает на себя внимание факт, что многие ТК (преимущественно с III степени дегрануляции) имели вид «теней» за счет утраченной зернистости, что нашло отражение в статистически значимом уменьшении средней яркости ТК на 5-е сутки эксперимента. На 10-е сутки ТТ общее число ТК возрастало еще значительнее, чем на 5-е сутки и было на 72% по медиане больше, чем в группе интактных животных. На данном этапе число ТК с I и II степенями дегрануляции возрастало в 3 раза, с III степенью дегрануляции — в 10 раз, коэффициент дегрануляции ТК возрастал в 2,5 раза по медиане относительно группы интактных животных. Средняя яркость ТК уменьшалась в 2 раза. К 20-м суткам ТТ общее число ТК было максимальным за все время наблюдения: в 1,7 раза больше, чем у интактных, число дегранулированных клеток и клеток с I и III степенями дегрануляции, а также коэффициент дегрануляции значимо возрастали, а средняя яркость клеток уменьшалась относительно значений у интактных животных. В динамике ТТ максимальное общее число ТК, число дегранулированных ТК и число клеток с I степенью дегрануляции было максимальным на 20-е сутки, число клеток со II степенью дегрануляции — на 5-е сутки, с III степенью дегрануляции — на 5-е и 10-е сутки, максимальное значение коэффициента дегрануляции — на 5-е сутки, а минимальная яркость ТК — на 5-е и 10-е сутки. Итак, максимальное число ТК зарегистрировано на 20-е сутки ТТ, максимальная их дегрануляция — на 5-е и 10-е сутки ТТ.

Результаты оценки экспрессии MMP-9 и VEGF в ожоговой ране в динамике экспериментальной ТТ представлены на рисунке. На 5-е, 10-е и 20-е сутки ТТ в ожоговой ране значимо повышается экспрессия VEGF, на 10-е и 20-е сутки ТТ значимо повышается экспрессия MMP-9. В динамике эксперимента экспрессия в ожоговой ране VEGF на 10-е сутки была выше, чем на 5-е сутки, на 20-е сутки — ниже, чем на 10-е сутки; экспрессия MMP-9 на 10-е и 20-е сутки была выше, чем на 5-е сутки ТТ. Таким образом, максимальная экспрессия VEGF зафиксирована на 10-е сутки, MMP-9 — на 10-е и 20-е сутки экспериментальной ТТ. ТК могут быть источником MMP-9 и VEGF — факторов, обеспечивающих эффективную репарацию в очаге ТТ. Нами проведена корреляция между коэффициентом дегрануляции тучных клеток и экспрессией MMP-9 и VEGF в ожоговой ране (табл. 3). На 10-е сутки ТТ выявлена прямая средней силы значимая связь, на 20-е сутки — прямая значимая слабая связь коэффициента дегрануляции ТК с экспрессией MMP-9, на 10-е сутки — прямая значимая слабая связь коэффициента дегрануляции ТК с экспрессией VEGF. Полагаем, что активность ТК и экспрессия в очаге термического повреждения MMP-9 и VEGF имеют значение в заживлении ожоговой раны, а также системных проявлениях после ТТ. С использованием корреляционного анализа между абсолютной площадью раневого дефекта кожи и коэффициентом дегрануляции ТК установлена обратная слабая связь на 5-е сутки, средней силы обратная связь — на 10-е и 20-е сутки, с экспрессией

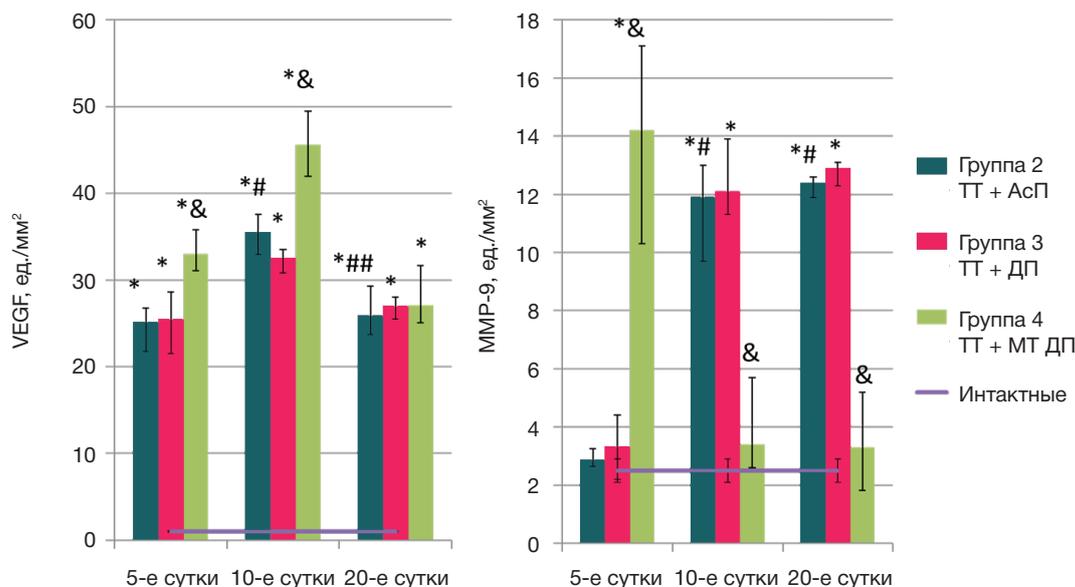


Рисунок. Влияние мелатонина в составе дермальной пленки на иммуногистохимические показатели в ожоговой ране при экспериментальной ТТ (Ме (Q₂₅; Q₇₅)). * — значимые ($p < 0,01$) различия с группой 1; # — с группой 2 на 5-е сутки; ## — с группой 2 на 10-е сутки; & — с группой 3 на соответствующие сутки

MMP-9 — обратная слабая связь на 10-е сутки и средней силы обратная связь на 20-е сутки (табл. 4). На 10-е сутки выявлена обратная значимая слабая связь абсолютной площади раневого дефекта кожи с экспрессией VEGF, не обнаружено значимой корреляции между абсолютной площадью раневого дефекта и экспрессией VEGF на 5-е и 20-е сутки, экспрессией MMP-9 — на 5-е сутки.

Оценку эффективности локального применения МТ в составе ДП (группа 4) проводили при сравнении показателей в группах животных с ТТ в условиях ежедневного в течение 5 дней применения ДП с МТ и животных с ТТ в условиях ежедневного применения в течение 5 дней ДП-матрицы (группа 3). Применение МТ при ТТ приводит к статистически значимому уменьшению площади ожоговой раны в абсолютных величинах на 5-е, 10-е и 20-е сутки, в относительных величинах — на 10-е и 20-е сутки ТТ (табл. 1). На 5-е, 10-е и 20-е сутки наблюдения увеличились скорость эпителизации раны и относительное уменьшение площади раны. На 5-е сутки ТТ абсолютная площадь ожоговой поверхности уменьшилась на 12,2% по медиане, максимальные изменения зафиксированы на 20-е сутки, когда абсолютная площадь раневого дефекта уменьшилась на 31,6%, а скорость эпителизации возросла в 4,7 раза по медиане относительно группы животных с ТТ и применением ДП-матрицы. В динамике экспериментальной ТТ на 10-е и 20-е сутки по сравнению с 5-ми сутками и на 20-е сутки по сравнению с 10-ми сутками значимо ($p < 0,01$) уменьшилась абсолютная площадь ожога, увеличились скорость эпителизации раны и относительное уменьшение площади раны. Отметим, что от 5-х к 20-м суткам ТТ абсолютная площадь ожоговой раны уменьшилась по медиане на 46% против 37% в группе с ТТ и применением ДП-матрицы.

МТ в составе ДП изменяет представительство и функциональную активность ТК в очаге повреждения

при экспериментальной ТТ (табл. 2). Так, на 5-е сутки ТТ (группа 4) в ожоговой ране значительно увеличивается общее содержание ТК относительно группы животных с ТТ и применением ДП-матрицы. Кроме этого, на 5-е сутки ТТ возрастает общее число дегранулированных ТК, число дегранулированных ТК I степени, а также значение коэффициента дегрануляции, снижается число дегранулированных ТК II и III степеней, средняя яркость клеток значительно не изменяется. На 10-е сутки ТТ в условиях локального применения МТ зафиксировано статистически значимое увеличение в ожоговой ране общего числа ТК, числа дегранулированных ТК, числа дегранулированных ТК I степени, но снижение числа дегранулированных ТК II и III степеней, коэффициента дегрануляции клеток. Наконец, на 20-е сутки наблюдений снижается общее число ТК, число дегранулированных ТК I и III степеней. И так, в условиях локального применения МТ при ТТ увеличение числа и активация дегрануляции ТК на 5-е и 10-е сутки, сменяется снижением их представительства и активности на 20-е сутки наблюдений. Интегральные показатели активности ТК — коэффициент дегрануляции и средняя яркость клеток — был значимо соответственно выше и ниже по сравнению с интактными животными во все сроки наблюдения.

При оценке экспрессии VEGF и MMP-9 в ожоговой ране при ТТ в условиях локального применения МТ (группа 4) обнаружено, что на 5-е сутки эксперимента экспрессия в ожоговой ране MMP-9 и VEGF значимо увеличивается, на 10-е сутки экспрессия MMP-9 снижается, VEGF — увеличивается, на 20-е сутки ТТ экспрессия MMP-9 снижается, VEGF — значимо не изменяется. В динамике ТТ экспрессия VEGF на 10-е сутки была значимо ($p < 0,01$) выше, чем на 5-е сутки, на 20-е сутки — ниже, чем на 5-е и 10-е сутки; экспрессия MMP-9 на 10-е и 20-е сутки была ниже ($p < 0,01$), чем на 5-е сутки ТТ. Отметим, что

Таблица 3. Корреляция между коэффициентом дегрануляции тучных клеток и иммуногистохимическими показателями в ожоговой ране при ТТ

Показатели	5-е сутки (n = 7)	10-е сутки (n = 7)	20-е сутки (n = 7)
VEGF, ед./мм ²	0,26	0,37	0,31
MMP-9, ед./мм ²	0,23	0,64	0,37

Примечание: приведены значения коэффициента корреляции Спирмена. Полуужирным шрифтом выделены статистически значимые ($p < 0,05$) связи.

Таблица 4. Корреляция между абсолютной площадью ожоговой раны и экспрессией VEGF и MMP-9, коэффициентом дегрануляции тучных клеток в очаге повреждения при экспериментальной ТТ

Показатели	5-е сутки (n = 7)	10-е сутки (n = 7)	20-е сутки (n = 7)
VEGF, ед./мм ²	- 0,13	- 0,37	0,17
MMP-9, ед./мм ²	- 0,31	- 0,47	- 0,54
Коэффициент дегрануляции тучных клеток, у.е.	- 0,37	- 0,51	- 0,64

Примечание: приведены значения коэффициента корреляции Спирмена. Полу жирным шрифтом выделены статистически значимые ($p < 0,05$) связи.

экспрессия VEGF на 5-е, 10-е и 20-е сутки, а MMP-9 на 5-е сутки была значимо выше по сравнению с интактными животными, экспрессия MMP-9 на 10-е и 20-е сутки не отличалась от значений в группе интактных животных.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полагаем, что обнаруженные нами закономерности изменения показателей репарации ожоговой раны в динамике экспериментальной ТТ связаны с участием ТК в реализации ключевых событий раневого процесса. Так, в первые 5 суток, когда преобладают альтеративные (вторичная альтерация) и сосудисто-экссудативные, лейкоцитарные реакции, дегрануляция ТК и высвобождение преформированных медиаторов, в частности, гистамина, TNF α , IL1 β , IL6 и др., приводят к артериальной и венозной гиперемии, экссудации, активации фагоцитов. Протеаза-4 из ТК выступает в роли хемоаттрактанта для лейкоцитов в воспалительную фазу раневого процесса. Позднее на 10–15-е сутки эксперимента высвобождение из ТК фактора роста кератиноцитов и VEGF активирует фибробласты, синтез коллагена, зачастую избыточный с образованием гипертрофических рубцов. Увеличение синтеза коллагена, в том числе, обусловлено активацией химазой из мастоцитов сигнального пути TGF β 1/Smads и пролиферацией фибробластов [17]. Серотонин, ключевым источником которого в очаге ТТ являются ТК, снижает апоптоз, повышает выживаемость и миграцию фибробластов и кератиноцитов, участвуя таким образом в регуляции заживления ожоговой раны, а применение блокаторов высвобождения эндогенного серотонина приводит к замедлению эпителизации [18].

Интенсивность экспрессии MMP-9 в ожоговой ране и сывороточный уровень MMP-9 после ТТ являются маркерами риска синдрома системного воспалительного ответа (systemic inflammatory response syndrome, SIRS) и неблагоприятного исхода при ожогах [19]. Основным источником MMP-9 являются активированные GM-CSF, IL8, TNF α и другими цитокинами нейтрофилы на ранних этапах после ТТ, а также другие клетки, включая ТК. MMP-9 отражает количественное представительство и активность преимущественно нейтрофилов и макрофагов в очаге повреждения. MMP-9 участвует в деструкции внеклеточного матрикса, особенно коллагенов IV и V типов, повышении сосудистой проницаемости в очаге, хемотаксисе нейтрофилов, активации и инактивации аутокоидов и готовит плацдарм для репаративных реакций, успешной эпителизации, ингибируется тканевым ингибитором протеиназ-1 альфа-1-антихимотрипсином [20]. Особое значение имеет MMP-9 при хроническом течении раневого процесса, когда избыточная экспрессия MMP-9 приводит к разрушению внеклеточного матрикса, ингибированию активности факторов роста и ограничению репаративных реакций. Ряд исследователей приводят данные о том, что нокаутирование гена или инактивация MMP-9 ускоряет заживление ран [21]. Как правило, невысокая активность

MMP-9 при остром раневом процессе обусловлена ее блокадой альфа-1-антихимотрипсином.

Семейство VEGF (VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D), прежде всего VEGF-A, в очаге ТТ продуцируется кератиноцитами, ТК, моноцитами/макрофагами, активированными фибробластами; рецепторы для VEGF-A обнаружены на эндотелиоцитах, фибробластах и др. клетках [22]. GM-CSF увеличивает синтез VEGF в ране, а также напрямую повышает активность кератиноцитов и фибробластов [23]. Показано, что VEGF участвует не только в регуляции ангиогенеза, но и в синтезе коллагена и других компонентов соединительной ткани, а также в формировании рубца, а блокада эффектов VEGF ограничивает объем рубцовой ткани, образование гипертрофических и келлоидных рубцов после ТТ, что открывает дополнительные терапевтические возможности. Однако механизм данного эффекта VEGF до конца не ясен и может быть связан с прямой активацией миграции, пролиферации и синтеза коллагена фибробластами и/или косвенной активацией эндотелиоцитов, нейтрофилов, макрофагов и ТК с продукцией профиброгенных медиаторов (цитокинов, факторов роста) [24]. В частности, терапевтический эффект интерферона-альфа2b при гипертрофических и келлоидных рубцах связан со снижением эффектов VEGF и ангиогенеза, в экспериментах на животных продемонстрирован эффект бевацизумаба — гуманизованного антитела против VEGF при гипертрофическом рубцевании [25]. Весьма показательны обнаруженные нами корреляции между исследуемыми показателями при ТТ: площади ожоговой раны с содержанием в ней MMP-9 и VEGF (обратная связь), коэффициентом дегрануляции ТК (прямая связь), а также коэффициента дегрануляции ТК с содержанием в ожоговой ране MMP-9 и VEGF (прямая связь). Это позволяет предположить, что площадь ожоговой раны при экспериментальной ТТ сокращается по мере увеличения содержания в ней MMP-9 и VEGF, а содержание MMP-9 и VEGF в ожоговой ране нарастает по мере дегрануляции ТК.

Полагаем, что обнаруженные нами эффекты МТ в составе ДП в очаге ТТ обусловлены его плейотропными свойствами. Прежде всего, антиоксидантный эффект МТ может ограничивать зону вторичного повреждения при ТТ, в том числе активацию и привлечение в очаг повреждения нейтрофилов, моноцитов, лимфоцитов. Ранее нами было продемонстрировано, что применение МТ в составе ДП при экспериментальной ТТ ограничивает прирост содержания продуктов окислительной деструкции липидов и белков в ожоговой ране, что связано с ускорением ее заживления [26]. Модуляция реакций воспалительного процесса под влиянием МТ может быть связана со снижением выраженности альтерации и сосудисто-экссудативных реакций, продукции цитокинов и других аутокоидов, что приведет к изменениям не только в очаге ТТ, но и изменению острофазового ответа в целом. Установлено, что применение МТ в составе ДП при экспериментальной ТТ ограничивает гибель лимфоцитов в крови [27].

Нельзя исключить прямое влияние МТ на продукцию и активность факторов, участвующих в репарации. Так, МТ в эксперименте *in vitro* на культуре эндотелиальных клеток церебральных сосудов снижает проницаемость активированных IL1 β клеток путем ингибирования MMP-9 [28]. Показана способность МТ напрямую связывать MMP-9. В частности, МТ связывает избыточное число MMP-9 при COVID-19-опосредованных иммунных реакциях, плоскоклеточном раке полости рта [29]. МТ снижает избыточную экспрессию и активность MMP-9 путем регуляции сигнальных путей NOTCH3/NF- κ B, TLR4/ NF- κ B [30]. В экспериментах *in vitro* с сывороткой обожженных крыс МТ снижает увеличенную проницаемость эндотелиоцитов за счет ингибирования MMP-9 и антиоксидантного действия [31]. МТ оказывает протекторное действие от повреждения химическими агентами ТК, что может влиять на их секреторную активность [32]. Кроме того, эффект МТ на ТК может различаться в зависимости от типа рецептора, с которым он взаимодействует (M1 или M2). Таким образом, неоднозначный эффект локального применения МТ при ТТ на содержание MMP-9 в ожоговой ране может быть связан на 5-е сутки с протекцией ТК от действия повреждающих факторов в очаге ТТ, и увеличение секреции ТК MMP-9, в свою очередь, может обеспечивать более эффективное и быстрое очищение раны от клеточного детрита, раннюю подготовку для реализации репаративных реакций. Позднее, на 10-е и 20-е сутки ТТ снижение экспрессии MMP-9 в очаге может быть обусловлено прямым или опосредованным ингибированием и снижением синтеза данной протеиназы под влиянием МТ, что приводит к прекращению деструктивных реакций в ожоговой ране, активации пролиферации и дифференцировки клеток под влиянием факторов роста и, как следствие, ускорению восстановления поврежденных тканей. В связи с этим целесообразность увеличения экспрессии VEGF в ожоговой ране на 5-е и 10-е сутки ТТ в условиях локального применения МТ вполне обоснована.

Сведения о влиянии МТ на синтез и экспрессию VEGF крайне неоднозначны. С одной стороны, МТ ингибирует синтез VEGF в клетках нейробластомы человека SH-SY5Y, рака простаты и других злокачественных опухолей, оказывая антиангиогенное действие и препятствуя росту опухоли [33]. Это связано с блокадой стабилизации комплекса STAT3 и HIF-1 α и подконтрольных им генов, в том числе VEGF, а также рецептора VEGFR2 [34]. Другие исследователи показали, что МТ не изменяет экспрессию VEGF в очаге ишемического повреждения [35]. Однако последние данные свидетельствуют о мультифункциональном регуляторном характере влияния МТ на ангиогенез в зависимости от дозы (концентрации в тканях) и исходного состояния ткани. При репарации костной ткани после перелома, заживлении кожи после механических и химических повреждений, экспериментальных язвенных дефектах слизистой желудка, экспериментальной ишемии миокарда,

головного мозга применение МТ приводит к усилению ангиогенеза прямо или опосредованно [33]. МТ повышает ангиогенный потенциал мезенхимальных стволовых клеток в очаге повреждения за счет синтеза VEGF по пути Erk1/2 [36]. Кроме этого, МТ самостоятельно стимулирует синтез тромбоцитарного фактора роста — известного стимулятора ангиогенеза и не только увеличивает ангиогенный потенциал мезенхимальных стволовых клеток, но и делает их устойчивыми к ишемическому стрессу.

ВЫВОДЫ

Проведенное исследование позволило выполнить поставленную цель и установить, что в динамике экспериментальной ТТ от 5-х к 20-м суткам абсолютная площадь ожоговой раны уменьшается на 35%, увеличивается скорость ее эпителизации, в очаге термического повреждения увеличивается число и изменяется функциональная активность ТК: снижается гранулярное насыщение, усиливается их дегрануляция; увеличивается экспрессия MMP-9 и VEGF. Выявлена обратная связь площади ожоговой раны с экспрессией MMP-9 и VEGF, коэффициентом дегрануляции ТК в очаге ТТ; экспрессия MMP-9 и VEGF в ожоговой ране нарастает по мере увеличения дегрануляции ТК. Продемонстрировано, что применение МТ в составе оригинальной ДП при экспериментальной ТТ приводит на 5-е, 10-е и 20-е сутки наблюдения к уменьшению площади ожоговой раны, увеличению скорости ее эпителизации, увеличению в ожоговой ране общего числа и дегрануляции ТК на 5-е и 10-е сутки, снижению общего числа и дегрануляции ТК на 20-е сутки ТТ, увеличению экспрессии MMP-9 на 5-е сутки, экспрессии VEGF на 5-е и 10-е сутки, снижению экспрессии MMP-9 на 10-е и 20-е сутки ТТ. Полученные результаты расширяют имеющиеся представления о роли измененной активности ТК, экспрессии MMP-9 и VEGF в патогенезе ТТ, служат предпосылкой для проведения дальнейших исследований по изучению роли ТК в коже в клинических условиях у больных с ожогами для обозначения их секреторных продуктов в качестве диагностических маркеров и предикторов осложнений, а также показателей эффективности проводимой терапии. Установленный при ТТ на доклиническом этапе стимулирующий репарацию эффект МТ в составе ДП связан с изменением числа и активности ТК, экспрессии MMP-9 и VEGF в ожоговой ране и является предпосылкой для дальнейшего изучения механизма действия и эффективности применения МТ в клинических условиях при ТТ. Принимая во внимание единство многих механизмов, обеспечивающих заживление ран, независимо от их этиологии, полагаем, что полученные данные о стимулирующем репарацию при ТТ эффекте МТ в составе оригинальной ДП за счет изменения активности ТК и содержания в ожоговой ране MMP-9 и VEGF, можно экстраполировать на раны другого происхождения.

Литература

1. WHO Fact Sheet: Burns. [(accessed on 6 March 2018)]; Available online: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/burns>.
2. Wang Y, Beekman J, Hew J, Jackson S, Issler-Fisher AC, Parungao R, et al. Burn injury: Challenges and advances in burn wound healing, infection, pain and scarring. *Adv Drug Deliv Rev*. 2018; 123: 3–17. DOI: 10.1016/j.addr.2017.09.018.
3. Saavedra PA, de Brito ES, Areda CA, Escalda PM, Galato D. Burns in the Brazilian Unified Health System: a review of hospitalization from 2008 to 2017. *Int J Burns Trauma*. 2019 Oct 15; 9 (5): 88–98.
4. Yang P, Li Y, Xie Y, Liu Y. Different faces for different places: heterogeneity of neutrophil phenotype and function. *J Immunol Res*. 2019 Feb 28; 2019: 8016254. DOI: 10.1155/2019/8016254.

5. Nguyen AV, Soulika AM. The Dynamics of the Skin's Immune System. *Int J Mol Sci.* 2019 Apr 12; 20 (8). pii: E1811. DOI: 10.3390/ijms20081811.
6. Murray RZ, West ZE, Cowin AJ, Farrugia BL. Development and use of biomaterials as wound healing therapies. *Burns Trauma.* 2019 Jan 25; 7: 2. DOI: 10.1186/s41038-018-0139-7.
7. Osikov MV, Telesheva LF, Ageev YI. Antioxidant effect of erythropoietin during experimental chronic renal failure. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* 2015; 160 (2): 202–4.
8. Осиков М. В., Телешева Л. Ф., Агеев Ю. И. Влияние эритропоэтина на апоптоз лимфоцитов при экспериментальной хронической почечной недостаточности. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2015; 3: 326–9.
9. Tordjman S, Chokron S2, Delorme R, et al. Melatonin: pharmacology, functions and therapeutic benefits. *Curr Neuropharmacol.* 2017 Apr; 15 (3): 434–43.
10. Varoni EM, Soru C, Pluchino R, et al. The impact of melatonin in research. *Molecules.* 2016 Feb 20; 21 (2): 240. DOI: 10.3390/molecules21020240.
11. Lopes RCV, Assis Martins J, Ribeiro de Souza T, de Castro Nunes Rincon G, Pacheco Miguel M, Borges de Menezes L, Correa Amaral A. Melatonin loaded lecithin-chitosan nanoparticles improved the wound healing in diabetic rats. *Int J Biol Macromol.* 2020 Nov 1; 162: 1465–75. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.08.027.
12. Kaczmarek-Szczepańska B, Ostrowska J, Kozłowska J, Szota Z, Brożyna AA, Dreier R, et al. Evaluation of polymeric matrix loaded with melatonin for wound dressing. *Int J Mol Sci.* 2021 May 26; 22 (11): 5658. DOI: 10.3390/ijms22115658.
13. Rusanova I, Martínez-Ruiz L, Florido J, Rodríguez-Santana C, Guerra-Librero A, Acuña-Castroviejo D, et al. Protective effects of melatonin on the skin: future perspectives. *Int J Mol Sci.* 2019 Oct 8; 20 (19): 4948. DOI: 10.3390/ijms20194948.
14. Theoharides TC. Neuroendocrinology of mast cells: Challenges and controversies. *Exp Dermatol.* 2017 Sep; 26 (9): 751–9.
15. Li H, Yao Z, Tan J, et al. Epidemiology and outcome analysis of 6325 burn patients: a five-year retrospective study in a major burn center in Southwest China. *Sci Rep.* 2017 Apr 6; 7: 46066. DOI: 10.1038/srep46066.
16. Агеева А. А., Осиков М. В., Симонян Е. В., Топорец Т. А., Потехина Е. А., авторы. Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, патентообладатель. Средство в виде пленки лекарственной, содержащей мелатонин, для лечения термической травмы патент № 2 751 048 07.07.2021.
17. Chen H, Xu Y, Yang G, Zhang Q, Huang X, Yu L, et al. X. Mast cell chymase promotes hypertrophic scar fibroblast proliferation and collagen synthesis by activating TGF- β 1/Smads signaling pathway. *Exp Ther Med.* 2017 Nov; 14 (5): 4438–42.
18. Sadiq A, Shah A, Jeschke MG, et al. The Role of Serotonin during Skin Healing in Post-Thermal Injury. *Int J Mol Sci.* 2018 Mar 29; 19(4). pii: E1034. DOI: 10.3390/ijms19041034. 12.
19. Nagy B, Szélig L, Rendeki S, et al. Dynamic changes of matrix metalloproteinase 9 and tissue inhibitor of metalloproteinase 1 after burn injury. *J Crit Care.* 2015; 30 (1): 162–6. DOI: 10.1016/j.jcrc.2014.07.008.
20. Lang TC, Zhao R, Kim A, et al. A Critical Update of the Assessment and Acute Management of Patients with Severe Burns. *Adv Wound Care (New Rochelle).* 2019; 8 (12): 607–33. DOI:10.1089/wound.2019.0963.
21. Wilgus TA, Roy S, McDaniel JC. Neutrophils and wound repair: positive actions and negative reactions. *Adv Wound Care (New Rochelle).* 2013; 2 (7): 379–88. DOI: 10.1089/wound.2012.0383
22. Johnson KE, Wilgus TA. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis in the regulation of cutaneous wound repair. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 2014; 3: 647–61.
23. Yamakawa S, Hayashida K. Advances in surgical applications of growth factors for wound healing. *Burns Trauma.* 2019 Apr 5; 7: 10. DOI: 10.1186/s41038-019-0148-1.
24. Wilgus TA. Vascular endothelial growth factor and cutaneous scarring. *Adv Wound Care (New Rochelle).* 2019 Dec 1; 8 (12): 671–8.
25. Kwak DH, Bae TH, Kim WS, Kim HK. Anti-vascular endothelial growth factor (Bevacizumab) therapy reduces hypertrophic scar formation in a rabbit ear wounding model. *Arch Plast Surg.* 2016; 43: 491–7.
26. Osikov MV, Simonyan EV, Ageeva AA, Ageev YI, Sinitsky AI, Fedosov AA. Local antioxidant effect of original dermal film with melatonin in thermal injury. *Bulletin of Russian State Medical University.* 2020; 6: 104–12.
27. Осиков М. В., Симонян Е. В., Агеева А. А., Агеев Ю. И. Мелатонин в составе дермальной пленки ограничивает гибель лимфоцитов в крови при экспериментальной термической травме. *Медицинская иммунология.* 2021; 23 (2): 389–94.
28. Alluri H, Wilson RL, Anasooya Shaji C, et al. Melatonin Preserves Blood-Brain Barrier Integrity and Permeability via Matrix Metalloproteinase-9 Inhibition. *PLoS One.* 2016; 11 (5): e0154427. DOI: 10.1371/journal.pone.0154427.
29. Hazra S, Chaudhuri AG, Tiwary BK, Chakrabarti N. Matrix metalloproteinase 9 as a host protein target of chloroquine and melatonin for immunoregulation in COVID-19: A network-based meta-analysis. *Life Sci.* 2020; 257: 118096. DOI: 10.1016/j.lfs.2020.118096.
30. Qin W, Li J, Zhu R, et al. Melatonin protects blood-brain barrier integrity and permeability by inhibiting matrix metalloproteinase-9 via the NOTCH3/NF- κ B pathway. *Aging (Albany NY).* 2019; 11 (23): 11391–415. DOI: 10.18632/aging.102537.
31. Wiggins-Dohlvik K, Han MS, Stagg HW, Alluri H, Shaji CA, Oakley RP, et al. Melatonin inhibits thermal injury-induced hyperpermeability in microvascular endothelial cells. *J Trauma Acute Care Surg.* 2014; 77: 899–905.
32. Maldonado MD, Garcia-Moreno H, Calvo JR. Melatonin protects mast cells against cytotoxicity mediated by chemical stimuli PMACI: possible clinical use. *J Neuroimmunol.* 2013 Sep 15; 262 (1–2): 62–5.
33. Rahbarghazi A, Siahkouhian M, Rahbarghazi R, et al. Role of melatonin in the angiogenesis potential; highlights on the cardiovascular disease. *J Inflamm (Lond).* 2021; 18 (1): 4. DOI: 10.1186/s12950-021-00269-5.
34. Bhattacharya S, Patel KK, Dehari D, Agrawal AK, Singh S. Melatonin and its ubiquitous anticancer effects. *Mol Cell Biochem.* 2019 Dec; 462 (1–2): 133–55.
35. Zhu P, Liu J, Shi J, Zhou Q, Liu J, Zhang X, et al. Melatonin protects ADSC s from ROS and enhances their therapeutic potency in a rat model of myocardial infarction. *J Cell Mol Med.* 2015; 19 (9): 2232–43.
36. Lee JH, Han YS, Lee SH. Melatonin-Induced PGC-1 α Improves Angiogenic Potential of Mesenchymal Stem Cells in Hindlimb Ischemia. *Biomol Ther (Seoul).* 2020; 28 (3): 240–9. DOI: 10.4062/biomolther.2019.131.

References

1. WHO Fact Sheet: Burns. [(accessed on 6 March 2018)]; Available online: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/burns>.
2. Wang Y, Beekman J, Hew J, Jackson S, Issler-Fisher AC, Parungao R, et al. Burn injury: Challenges and advances in burn wound healing, infection, pain and scarring. *Adv Drug Deliv Rev.* 2018; 123: 3–17. DOI: 10.1016/j.addr.2017.09.018.
3. Saavedra PA, de Brito ES, Arede CA, Escalda PM, Galato D. Burns in the Brazilian Unified Health System: a review of hospitalization from 2008 to 2017. *Int J Burns Trauma.* 2019 Oct 15; 9 (5): 88–98.
4. Yang P, Li Y, Xie Y, Liu Y. Different faces for different places: heterogeneity of neutrophil phenotype and function. *J Immunol Res.* 2019 Feb 28; 2019: 8016254. DOI: 10.1155/2019/8016254.
5. Nguyen AV, Soulika AM. The Dynamics of the Skin's Immune System. *Int J Mol Sci.* 2019 Apr 12; 20 (8). pii: E1811. DOI: 10.3390/ijms20081811.
6. Murray RZ, West ZE, Cowin AJ, Farrugia BL. Development and use of biomaterials as wound healing therapies. *Burns Trauma.*

- 2019 Jan 25; 7: 2. DOI: 10.1186/s41038-018-0139-7.6
7. Osikov MV, Telesheva LF, Ageev YI. Antioxidant effect of erythropoietin during experimental chronic renal failure. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2015; 160 (2): 202–4.7
 8. Osikov MV, Telesheva LF, Ageev Yul. Vlijanie jeksperimental'noj hronicheskoj pochečnoj nedostatočnosti. *Bjulleten' jeksperimental'noj biologii i mediciny*. 2015; 3: 326–9. Russian.
 9. Tordjman S, Chokron S2, Delorme R, et al. Melatonin: pharmacology, functions and therapeutic benefits. *Curr Neuropharmacol*. 2017 Apr; 15 (3): 434–43.
 10. Varoni EM, Soru C, Pluchino R, et al. The impact of melatonin in research. *Molecules*. 2016 Feb 20; 21 (2): 240. DOI: 10.3390/molecules21020240.
 11. Lopes RCV, Assis Martins J, Ribeiro de Souza T, de Castro Nunes Rincon G, Pacheco Miguel M, Borges de Menezes L, Correa Amaral A. Melatonin loaded lecithin-chitosan nanoparticles improved the wound healing in diabetic rats. *Int J Biol Macromol*. 2020 Nov 1; 162: 1465–75. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.08.027.
 12. Kaczmarek-Szczepańska B, Ostrowska J, Kozłowska J, Szota Z, Brożyna AA, Dreier R, et al. Evaluation of polymeric matrix loaded with melatonin for wound dressing. *Int J Mol Sci*. 2021 May 26; 22 (11): 5658. DOI: 10.3390/ijms22115658.
 13. Rusanova I, Martínez-Ruiz L, Florido J, Rodríguez-Santana C, Guerra-Librero A, Acuña-Castroviejo D, et al. Protective effects of melatonin on the skin: future perspectives. *Int J Mol Sci*. 2019 Oct 8; 20 (19): 4948. DOI: 10.3390/ijms20194948.
 14. Theoharides TC. Neuroendocrinology of mast cells: Challenges and controversies. *Exp Dermatol*. 2017 Sep; 26 (9): 751–9.
 15. Li H, Yao Z, Tan J, et al. Epidemiology and outcome analysis of 6325 burn patients: a five-year retrospective study in a major burn center in Southwest China. *Sci Rep*. 2017 Apr 6; 7: 46066. DOI: 10.1038/srep46066.
 16. Ageeva AA, Osikov MV, Simonjan EV, Toporec TA, Potehina EA, avtory. Federal'noe gosudarstvennoe bjudzhetnoe obrazovatel'noe uchrezhdenie vysshego obrazovanija «Juzhno-Ural'skij gosudarstvennyj medicinskij universitet» Ministerstva zdavoohranenija Rossijskoj Federacii, patentoobladatel'. Sredstvo v vide plenki lekarstvennoj, sodержashhej melatonin, dlja lechenija termicheskoj travmy patent # 2 751 048 07.07.2021. Russian.
 17. Chen H, Xu Y, Yang G, Zhang Q, Huang X, Yu L, et al. X. Mast cell chymase promotes hypertrophic scar fibroblast proliferation and collagen synthesis by activating TGF- β 1/Smads signaling pathway. *Exp Ther Med*. 2017 Nov; 14 (5): 4438–42.
 18. Sadiq A, Shah A, Jeschke MG, et al. The Role of Serotonin during Skin Healing in Post-Thermal Injury. *Int J Mol Sci*. 2018 Mar 29; 19(4). pii: E1034. DOI: 10.3390/ijms19041034. 12.
 19. Nagy B, Szélig L, Rendeki S, et al. Dynamic changes of matrix metalloproteinase 9 and tissue inhibitor of metalloproteinase 1 after burn injury. *J Crit Care*. 2015; 30 (1): 162–6. DOI: 10.1016/j.jcrr.2014.07.008.
 20. Lang TC, Zhao R, Kim A, et al. A Critical Update of the Assessment and Acute Management of Patients with Severe Burns. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2019; 8 (12): 607–33. DOI:10.1089/wound.2019.0963.
 21. Wilgus TA, Roy S, McDaniel JC. Neutrophils and wound repair: positive actions and negative reactions. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2013; 2 (7): 379–88. DOI: 10.1089/wound.2012.0383
 22. Johnson KE, Wilgus TA. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis in the regulation of cutaneous wound repair. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 2014; 3: 647–61.
 23. Yamakawa S, Hayashida K. Advances in surgical applications of growth factors for wound healing. *Burns Trauma*. 2019 Apr 5; 7: 10. DOI: 10.1186/s41038-019-0148-1.
 24. Wilgus TA. Vascular endothelial growth factor and cutaneous scarring. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2019 Dec 1; 8 (12): 671–8.
 25. Kwak DH, Bae TH, Kim WS, Kim HK. Anti-vascular endothelial growth factor (Bevacizumab) therapy reduces hypertrophic scar formation in a rabbit ear wounding model. *Arch Plast Surg*. 2016; 43: 491–7.
 26. Osikov MV, Simonyan EV, Ageeva AA, Ageev YI, Sinitzky AI, Fedosov AA. Local antioxidant effect of original dermal film with melatonin in thermal injury. *Bulletin of Russian State Medical University*. 2020; 6: 104–12.
 27. Osikov MV, Simonjan EV, Ageeva AA, Ageev Yul. Melatonin v sostave dermal'noj plenki ogranichivaet gibel' limfocitov v krovi pri jeksperimental'noj termicheskoj travme. *Medicinskaja immunologija*. 2021; 23 (2): 389–94. Russian.
 28. Alluri H, Wilson RL, Anasooya Shaji C, et al. Melatonin Preserves Blood-Brain Barrier Integrity and Permeability via Matrix Metalloproteinase-9 Inhibition. *PLoS One*. 2016; 11 (5): e0154427. DOI: 10.1371/journal.pone.0154427.
 29. Hazra S, Chaudhuri AG, Tiwary BK, Chakrabarti N. Matrix metalloproteinase 9 as a host protein target of chloroquine and melatonin for immunoregulation in COVID-19: A network-based meta-analysis. *Life Sci*. 2020; 257: 118096. DOI: 10.1016/j.lfs.2020.118096.
 30. Qin W, Li J, Zhu R, et al. Melatonin protects blood-brain barrier integrity and permeability by inhibiting matrix metalloproteinase-9 via the NOTCH3/NF- κ B pathway. *Aging (Albany NY)*. 2019; 11 (23): 11391–415. DOI: 10.18632/aging.102537.
 31. Wiggins-Dohlvik K, Han MS, Stagg HW, Alluri H, Shaji CA, Oakley RP, et al. Melatonin inhibits thermal injury-induced hyperpermeability in microvascular endothelial cells. *J Trauma Acute Care Surg*. 2014; 77: 899–905.
 32. Maldonado MD, Garcia-Moreno H, Calvo JR. Melatonin protects mast cells against cytotoxicity mediated by chemical stimuli PMACI: possible clinical use. *J Neuroimmunol*. 2013 Sep 15; 262 (1–2): 62–5.
 33. Rahbarghazi A, Siahkoughian M, Rahbarghazi R, et al. Role of melatonin in the angiogenesis potential; highlights on the cardiovascular disease. *J Inflamm (Lond)*. 2021; 18 (1): 4. DOI: 10.1186/s12950-021-00269-5.
 34. Bhattacharya S, Patel KK, Dehari D, Agrawal AK, Singh S. Melatonin and its ubiquitous anticancer effects. *Mol Cell Biochem*. 2019 Dec; 462 (1–2): 133–55.
 35. Zhu P, Liu J, Shi J, Zhou Q, Liu J, Zhang X, et al. Melatonin protects ADSC s from ROS and enhances their therapeutic potency in a rat model of myocardial infarction. *J Cell Mol Med*. 2015; 19 (9): 2232–43.
 36. Lee JH, Han YS, Lee SH. Melatonin-Induced PGC-1 α Improves Angiogenic Potential of Mesenchymal Stem Cells in Hindlimb Ischemia. *Biomol Ther (Seoul)*. 2020; 28 (3): 240–9. DOI: 10.4062/biomolther.2019.131.