

Київський національний університет імені Тараса Шевченка
Міністерство освіти і науки України
Київський національний університет імені Тараса Шевченка
Міністерство освіти і науки України

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

КОВАЛЬ ТЕТЯНА ВАЛЕНТИНІВНА

УДК: 616.329-001.37-053

ДИСЕРТАЦІЯ
ПРОТЕОЛІТИЧНА ДЕГРАДАЦІЯ БІЛКІВ ЯК ФАКТОР МЕТАБОЛІЧНОЇ
ДИСФУНКЦІЇ ЗА КИСЛОТНОГО ОПІКУ СТРАВОХОДУ

03.00.04-біохімія

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук

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

_____ Коваль Т.В.

Науковий керівник Остапченко Людмила Іванівна доктор біологічних наук, професор.

Київ – 2018

АНОТАЦІЯ

Коваль Т.В. Протеолітична деградація білків як фактор метаболічної дисфункції за кислотного опіку стравоходу. - Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.04-біохімія. – ННЦ «Інститут біології та медицини», Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, 2018.

Хімічні опіки стравоходу займають перше місце серед захворювань стравоходу в дитячому віці. Головною проблемою є не лише отруєння та опік, а й хронічне запалення та стеноз стравоходу. У постраждалих розвивається опікова хвороба з різноманітними клінічними проявами, а виражені метаболічні зміни характеризуються катаболічною спрямованістю і посиленням протеолізу. Дослідження особливостей стану системи протеолітичних ферментів має важливе значення для вивчення післяопікових ускладнень, а також для обґрунтування застосування протеолітичних ферментів та їх інгібіторів в комплексній терапії.

Дисертація присвячена дослідженню протеолітичної деградації білків за кислотного опіку стравоходу (КОС). У якості чинника кислотного опіку стравоходу використовували трихлороцетову кислоту, яка є галогенованим аналогом оцетової кислоти. Вона використовується як гербіцид, для очищення і знежирення матеріалів, у якості засобу для хімічного пілінгу, застосовується в медичній практиці та входить до складу плямовивідників.

За КОС встановлено підвищення вмісту лейкоцитів на тлі зменшення числа еритроцитів та зниження вмісту білка, яке відбувалось, головним чином, за рахунок зменшення кількості альбуміну. Також, за даної патології ми спостерігали підвищення вмісту сечовини, креатиніну, аланін амінотрансферази (АЛТ) та аспартатамінотрансферази (АСТ) разом з порушенням водно-сольового обміну організму. Проведені гістологічні

дослідження та визначені загальноклінічні та біохімічні параметри за КОС статевонезрілих щурів свідчать про метаболічні порушення, що відповідають моделі КОС II ступеня тяжкості та дитячому віку від 1 до 8-ми років.

Як відомо, процеси перекисного окиснення ліпідів належать до основних метаболічних реакцій, що відбуваються у клітині. Як діагностичний критерій тяжкості опікової хвороби ми визначення вміст продуктів перекисного окиснення ліпідів (ПОЛ) та стан антиоксидантної системи (АОС). Отримані результати свідчать, що за кислотного опіку стравоходу відбувається накопиченню продуктів ПОЛ, зниження активності супероксиддисмутази та каталази, виражене і тривале зниження білкових сульфгідрильних груп, вмісту відновленого глутатіону та інгібування всіх ферментів глутатіонової системи. Такі зміни свідчать про суттєві метаболічні порушення, які обумовлені процесами надмірної продукції активних форм кисню та є умовою для активації протеолізу, оскільки активація вільно-радикального окиснення сприяє клітинній та тканинній деструкції.

При визначенні загальної протеолітичної активності, активностей серинових протеїназ та металопротеїназ у плазмі крові максимальне значення показників спостерігали на 7 добу після опіку. В наступні терміни часу загальна протеолітична активність була нижчою за контроль, що може свідчити про утворення комплексів з інгібіторами та елімінацію ферментів з кров'яного русла.

При дослідженні вмісту матриксних металопротеїназ (ММП), які відповідають за деградацію екстрацелюлярного матриксу (ЕЦМ), у слизовій оболонці стравоходу максимальне підвищення вмісту всіх досліджуваних ММП спостерігали на 21 добу після опіку. Виключенням була ММП-2, вміст якої максимально підвищеним був на 15 добу. У сироватці крові максимальне підвищення ММП-1 та -2 спостерігали на 1 добу після опіку, ММП-8 та -9 на 15 добу, а вміст ММП-3 достовірно не змінювався. Отримані результати можуть бути обумовлені змінами вмісту різних типів колагену під час

загоєння опікової рани, що є субстратом для даного ферменту, та можуть свідчити про подальший розвиток запального процесу.

Найбільш універсальним механізмом регуляції протеолізу є контроль, який здійснюють інгібітори протеїназ. Інгібіторна активність α 1-антитрипсину була вище контрольного рівня протягом всього досліджуваного терміну. Найвищого значення показник набував на 7 добу. Інгібіторна активність α 2-макроглобуліну мала різнонаправлений характер, найвище значення показника спостерігали на 7 та 21 доби. Підвищення активності α 2-макроглобуліну на 21 добу може свідчити про розвиток запалення та інфекційних процесів у рані.

Тканинний інгібітор металопротеїназ (ТІМП-1) є універсальним біомаркером ураження колагенового матриксу. Вміст даного показника у слизовій оболонці максимального значення досягав на 21 добу після опіку. Отже, КОС викликає підвищення вмісту ММП та ТІМП-1 у слизовій стравоходу на 21 добу після травми. Така некерована протеїназна активність є одним з головних механізмів ран, що не заживають.

Порушення активаторно-інгібіторної рівноваги може спричинити порушення метаболізму факторів росту. Основний фактор росту фібробластів (bFGF) володіє вираженою здатністю посилювати утворення сполучної тканини і судинних капілярів, а також приймає участь у регенерації тканин. Показано зростання вмісту bFGF у слизовій оболонці стравоходу протягом експерименту, максимальне підвищення спостерігали на 21 добу. Таке підвищення на 21 добу після опіку bFGF, ТІМП-1 та ММП у слизовій стравоходу може свідчити про неконтрольований протеоліз.

Протеоліз білків у цитоплазмі здійснюється складною багатокомпонентною системою, до складу якої входять протеасоми та шаперони. Вміст шаперону Hsp 60 достовірно перевищив контроль лише на 21 добу після опіку. Тоді як, вміст Hsp 70 був нижчий за контроль протягом всього досліджуваного періоду. Hsp 60 та Hsp 70 є АТФ-залежними білками.

Очевидно, що зниження їх вмісту може свідчити про зниження вмісту АТФ за опікової хвороби.

Протеасоми є первинними сайтами для деградації білка у клітинах ссавців. Хімотрипсинподібна (ХТП) та каспазоподібна (КП) активності протеасом були вище контрольного рівня протягом всього експерименту. Максимальне значення КП активності відмічено на 21 добу. Таке підвищення протеасомної активності підтверджує попередні данні про надмірний протеоліз та може свідчити про утворенню фіброзу в післяопікових ранах.

Якісну оцінку білкового складу крові та слизової стравоходу було проведено за допомогою методу електрофорезу. Ми спостерігали кількісні зміни вмісту білкових фракцій, як у сироватці крові, так і у слизовій стравоходу. У сироватці крові відбувалось зменшення вмісту альбумінової фракції при зростанні вмісту глобулінової фракції. Дослідження змін білкового складу тканини стравоходу за даної патології показало підвищення вмісту фракцій білків, які можуть відповідати кератином та фактору росту ендотелію, що може свідчити про підвищену епітелізацію в місці опіку.

Молекули середньої маси (МСМ) - низькомолекулярні пептиди, які утворюються внаслідок протеолізу, є біохімічним маркером, який відображає рівень патологічного білкового метаболізму. Загальний вміст МСМ у сироватці крові щурів за КОС був вище за контроль на 1 добу експерименту, а у слизовій оболонці стравоходу - на 21 добу після опіку, що може бути наслідком деструкції тканин стравоходу та свідчить про порушення детоксикаційної функції.

Порушення в системі протеолізу тісно пов'язані з системою імунітету. Ми спостерігали підвищення концентрації IgG, який є найбільш специфічний ефектором гуморальної ланки, на 21 добу після опіку, що може свідчити про розвиток запальних та інфекційних процесів у організмі. Одним із індикаторів стану імунного статусу організму є рівень циркулюючих імунних комплексів (ЦІК) у крові. При дослідженні вмісту ЦІК, вже на першу добу після

моделювання кислотного опіку стравоходу, відбувались суттєві зсуви у молекулярному складі імунних комплексів, що проявлялись підвищенням концентрації найбільш токсигенних – середньо- та низькомолекулярних циркулюючих імунних комплексів.

Такі зміни сприяють активації запального процесу, який проявляється викидом цитокінів. Нами було встановлено максимальне підвищення прозапальних цитокінів вже на першу добу експерименту, що є відображенням активності і тяжкості патологічного процесу. В той же час, вміст протизапального інтерлейкіну ІЛ-4 був зниженим протягом усього досліджуваного періоду, а вміст ІЛ-10 був вище контрольного показника лише на 7 добу після опіку. Такі зміни цитокінового профілю, як маркеру метаболічних порушень, виникають внаслідок активації протеолізу та свідчить про уповільнення загоєння опікової рани.

Отже, КОС викликає протеолітичну деградацію білків, яка є причиною метаболічної дисфункції організму. Найбільш суттєві зміни протеолітичної активності у слизовій стравоходу відбуваються на 7 та 21 доби, а у сироватці крові на 1 та 15 доби. Отримані результати можуть бути основою для створення науково обґрунтованих способів корекції виявлених метаболічних порушень, зокрема шляхом фармакологічної корекції у певні стадії ранового процесу після кислотного опіку стравоходу.

Ключові слова: кислотний опік стравоходу, протеоліз, деградація білків

SUMMARY

Koval T.V. Proteolytic degradation of proteins as a factor of metabolic dysfunction in the esophagus acid burn. – Qualification scientific work printed as a manuscript.

The thesis for the scientific degree of a candidate of biological sciences in the specialty 03.00.04 – Biochemistry. – ESC “Institute of biology and medicine”, Kyiv Taras Shevchenko National University, Kyiv, 2018.

Esophagus chemical burns take the first place among childhood esophagus pathologies. The main problem here is not only poisoning and burns but also chronic inflammation and esophagus stenosis. The injured develop the burn disease with various clinical manifestations, while prominent metabolic changes are characterized as catabolically directed and increase proteolysis activity. The research of peculiarities of the proteolytic enzyme system state has an important role in afterburn complication elucidation, and for justification of proteolytic enzyme use, as well as their inhibitors, in complex therapies.

This thesis is devoted to the research of proteolytic degradation of proteins in the case of the esophagus acid burn (EAB). We chose trichloroacetate as an acid burn inducer, which is a halogenated analog of acetate. It is widely used as a herbicide, for material cleaning and degreasing, as a chemical peeling agent, in medical practice, and as a component of stain removers.

In the case of EAB the increase in the lymphocyte content simultaneously with the erythrocyte and protein amount decrease was established, the latter mainly due to the albumin concentration diminishing. Also under this pathology conditions we registered the increase of the urea, creatinine, alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) amounts, as well as the whole organism water-salt balance dysregulation. The histological research and common clinical and biochemical parameter assessment results obtained from non-mature rats with EAB point out to certain metabolic alterations corresponding to the model of II severity degree EAB in children of 1-8 years of age.

As it is already known, processes of lipid peroxidation (LP) belong to common intracellular metabolic reactions. So we used the amount of LP products and the antioxidant system (AOS) state as a diagnostic criterions of the burn disease severity. The obtained results allow us to conclude that in the case of EAB the increase in LP product amount and the decrease of superoxide dismutase and catalase activity take place, as well as the prominent and long-term decrease in protein sulfhydryl group amount and the reduced glutathione content, and the

inhibition of all glutathione system enzymes. These changes point out to severe metabolic dysregulation due to the excessive reactive oxygen species production processes, also being one of proteolysis activation conditions, because activation of free radical oxidation favors cell and tissue destruction.

While estimating the bulk proteolytic activity, as well as the activity of blood plasma serine proteases and metalloproteinases we observed the parameter maximum at the 7th day after the burn. During the following time terms the bulk proteolytic activity were lower comparing with the control, which allows us to propose the possibility of forming inhibitory complexes of these enzymes and their elimination from bloodstream.

While researching the amount of matrix metalloproteinases (MMP) responsible for extracellular matrix (ECM) degradation in esophagus mucosa we showed that the most prominent increase of all assessed MMPs happens at the 21th day after the burn. Only MMP-2 was an exception with its amount maximal at the 15th day. The maximal blood serum MMP-1 and MMP-2 content was evident at the 1st day after the burn, the MMP-8 and MMP-9 amount – at the 15th day, while the MMP-3 content remained unchanged. The obtained results may be explained by changes of different collagen type amount during burn wound healing, which is a substrate for this enzyme, they also point out to inflammation process further development.

The most universal proteolysis regulation mechanism appears to be the control exerted by protease inhibitors. The inhibitory activity of α 1-antitrypsine was higher than the control level during all experimental period. The most prominent value was observed at the 7th day. The inhibitory activity of α 2-macroglobuline had multidirectional character, being the highest at the 7th and 21th days. The increase of α 2-macroglobuline activity observed at the 21th day may indicate on the inflammation development and wound infection process occurrence.

The tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP-1) is a universal biomarker of collagen matrix lesions. The amount of this molecule in the mucosa reached the maximal value at the 21th day after the burn. So, EAB induces the increase of MMP

and TIMP-1 concentrations in esophagus mucosa at the 21th after the injury. Such unregulated proteolytic activity appears to be one of the main mechanisms of wound healing.

The dysregulation of the activatory-inhibitory balance can lead to alterations in growth factor metabolism. The basic fibroblast growth factor (bFGF) has a prominent ability to enhance connective tissue and vascular capillary formation, it also takes part in tissue regeneration control. We showed the bFGF amount increase in esophagus mucosa during our experiment, and the maximal value was registered at the 21th day. The observed increase in bFGF, TIMP-1 and MMP esophagus mucosa content at the 21th day after the burn can point out to uncontrolled proteolysis.

Protein proteolysis in cytoplasm is performed by a complicated multicomponent system consisting of proteasomes and chaperones. The content of Hsp60 chaperone appeared reliably higher than the control only at the 21th day after the burn. At the same time the Hsp70 amount was lower comparing with the control value during all experiment term. Hsp60 and Hsp70 are ATP-dependent proteins. Evidently, their amount decrease can be indicative of the ATP content diminishing in the case of burn disease.

Proteasomes are primary sites for protein degradation in mammal cells. Chymotrypsin-like (CTL) and caspase-like (CL) proteasome activities were higher than the control level during all experiment period. The maximal value of CL activity was observed at the 21th day. This proteolytic activity increase allows us to confirm our previous data about the excessive proteolysis occurrence and may indicate on the fibrosis formation in the after-burn wounds.

The qualitative assessment of blood and esophagus mucosa protein contents was performed with electrophoresis. We observed the quantitative changes in the protein fraction amount in both blood serum and esophagus mucosa. We registered the decrease in the albumin fraction content and the increase of the globulin fraction amount. The research of esophagus tissue protein content changes under this

pathology demonstrated the increase of the amount of the protein fractions which may correspond to keratins and endothelial growth factor, and this may indicate on the enhanced burn epithelization.

The medium weight molecules (MWM) are low molecular weight peptides formed due to proteolysis and considered biochemical markers revealing protein pathological metabolism levels. The bulk MWM amount in rat blood serum under EAB was higher than the control at the 1st day of the experiment, and in esophagus mucosa this parameter increase was registered at the 21th day after the burn, which may be a consequence of esophagus destruction and points out to detoxification function unbalances.

The proteolysis system dysregulation is tightly connected to the immunity system. We observed the increase in the IgG concentration, which appears to be the most specific humoral immunity effector, at the 21th day after the burn, and this may indicate on the development of inflammation and infection processes in the organism. One of organism immunity state indicators is a level of circulating immune complexes (CIC) in blood. Researching the CIC amount we registered the prominent changes in the immune complex content already at the 1st day after EAB modelling. These changes manifested as the concentration increase of the most toxigenic medium and low molecular weight immune complexes.

Aforementioned changes favor inflammation process activation which manifests by cytokine production and secretion. We established that the maximal increase of pro-inflammatory cytokines occurs already at the 1st day of our experiment, and this shows the pathological process activity and severity. At the same time, the amount of an anti-inflammatory interleukin IL-4 was decreased during all experiment period, and the IL-10 content was higher compared with the control value only at the 7th day after the burn. Such cytokine profile changes, as a metabolic unbalance marker, appear due to proteolysis activation and indicate on slowing down the burn wound healing.

All in all, EAB triggers proteolytic degradation of proteins, which appears to be the cause of organism metabolic dysfunction. The most evident proteolytic activity changes in esophagus mucosa appear at the 7th and 21th days, and in blood serum – at 1st and 15th days.

The obtained results may serve as a basis for the creation of scientifically proven means of correction of discovered metabolic dysfunctions, namely by applying pharmacological correction during certain stages of wound development process after esophagus acid burns.

Key words: esophagus acid burn, proteolysis, protein degradation

Список публікацій здобувача

1. Raetska Ya, Ischuk T, **Koval T**, Dzhus O, Savchuk O. Experimental modeling of an acid esophagus of 2nd degree in immature rats. Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kyiv, Problems of Physiological Functions Regulation. 2015;19(2):15-8.
2. **Коваль ТВ**, Іщук ТВ, Раєцька ЯБ, Савчук ОМ, Остапченко ЛІ. Вміст молекул середньої маси та олігопептидів у крові та тканинах щурів за умов розвитку кислотного опіку стравоходу. Науковий вісник Чернівецького університету, Серія: Біологія (Біологічні системи). 2015;7(2):143-8.
3. **Коваль ТВ**. Рослова НМ, Раєцька ЯБ. Біохімічні та загальноклінічні показники крові статевонезрілих щурів за умов моделювання кислотного опіку стравоходу II ступеня. Вісник Львівського університету. Серія: Біологічна. 2016; 73:298-302.
4. **Koval T**, Ischuk T, Raetska Ya. Characteristics of immune response under experimental models of acid burns of the esophagus. Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kyiv, Biology. 2016; 72(2):52-5.
5. Ishchuk TV, **Koval TV**, Savchuk OM, Raetska YaB, Ostapchenko LI. Dynamics changes of proteolytic balance in blood plasma under experimental chemical burns of esophageal development in rats. International Journal of Health Sciences and Research. 2016; 6(12):259-64.
6. **Коваль ТВ**, Іщук ТВ, Раєцька ЯБ. Зміни білкового складу сироватки крові та гомогенату стравоходу за розвитку кислотного опіку стравоходу статевонезрілих щурів. Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка, Серія: Проблеми регуляції фізіологічних функцій. 2017; 22(1):36-9.
7. Raetska YaB, Chornenka NM, **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. *Biomedical Research and Therapy*. 2017;4(9):1591-1606.

8. **Коваль ТВ**, Іщук ТВ, Раєцька ЯБ. Вміст молекул середньої маси у тканинах щурів за умов розвитку кислотного опіку стравоходу. XIV Міжнародна наукова конференція студентів, аспірантів та молодих вчених «Шевченківська весна», 6-8 квітня 2016р.: матер. конфер. – Київ, 2016. – С.104-105.

9. Іщук ТВ, **Коваль ТВ**, Раєцька ЯБ. Особливості імунної відповіді за умов експериментальної моделі кислотного опіку стравоходу у статевонезрілих щурів. XII Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології», 19-21 квітня 2016р.: матер. конфер. – Львів, 2016. – С. 36-37.

10. **Koval TV**, Ishchuk TV, Raetska YaB, Savchuk OM. Experimental model of an acid esophagus burn and its main clinical biochemical parameters. 2nd Prague European Days of Internal Medicine, December 1–2, 2016: матер.конфер. - Prague, Czech Republic 2016. - P.73.

11. Тунчик ЮО, **Коваль ТВ**, Раєцька ЯБ. Функціонування матриксних металопротеїназ в сироватці крові щурів за умов розвитку кислотного опіку стравоходу. XV Міжнародна наукова конференція студентів, аспірантів та молодих вчених «Шевченківська весна», 18-21 квітня 2017р.: матер. конфер. – Київ, 2017. – С.78-79.

12. Поважняк Г, **Коваль Т**, Іщук Т, Раєцька Я. Рівень циркулюючих імунних комплексів у крові щурів за умов експериментального відтворення моделі кислотного опіку стравоходу/ XIII Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології», 25-27 квітня 2017р.: матер. конфер. – Львів, 2017. - С.45-46.

13. Тунчик ЮО, **Коваль ТВ**, Іщук ТВ. Визначення активності матриксних металопротеїназ у слизовій оболонці стравоходу щурів за умов розвитку кислотного опіку. XII Міжнародна конференція молодих науковців «Біологія:

від молекули до біосфери», 29 листопада – 1 грудня 2017 р.: матер. конфер. - Харків, 2017. - С.15-16.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	18
ВСТУП.....	20
РОЗДІЛ 1. ЗАГАЛЬНІ УЯВЛЕННЯ ПРО ОПІКИ ТА СИСТЕМУ ПРОТЕОЛІЗУ.....	26
1.1. Метаболічні порушення за опікової хвороби.....	26
1.2. Екстрацелюлярний та цитоплазматичний протеоліз	32
РОЗДІЛ 2. Матеріали і методи.....	42
2.1. Реактиви та обладнання.....	42
2.2. Дотримання положень про гуманне ставлення до тварин	43
2.3. Умови проведення експерименту	43
2.4. Отримання сироватки крові	44
2.5. Отримання плазми крові	44
2.6. Отримання слизової оболонки стравоходу.....	44
2.7. Визначення концентрації білка за методом Бредфорд	45
2.8. Гістологічні методи дослідження.....	45
2.9. Дослідження морфофункціонального стану клітин крові у щурів	46
2.10 Визначення біохімічних параметрів сироватки крові.....	46
2.10.1. Визначення загального білка сироватки крові.....	47
2.10.2. Визначення концентрації альбуміну.....	47
2.10.3. Визначення концентрації сечовини.....	47
2.10.4. Визначення концентрації креатиніну.....	48
2.10.5. Визначення концентрації іонів натрію.....	48
2.10.6. Визначення концентрації іонів калію.....	49
2.10.7. Визначення концентрації хлоридів.....	49
2.10.8. Визначення концентрації магнію.....	49
2.10.9. Визначення концентрації кальцію.....	50

2.10.11.	Визначення активності аспаратамінотрансферази.....	50
2.10.12.	Визначення активності аланінамінотрансферази.....	50
2.11.	Визначення вмісту дієнових кон'югатів і шифових основ ненасичених жирних кислот	51
2.12.	Визначення вмісту ТБК-активних продуктів.....	51
2.13.	Визначення активності супероксиддисмутази.....	52
2.14.	Визначення активності каталази.....	53
2.15.	Визначення концентрації SH-груп.....	53
2.16.	Визначення вмісту відновленого та окисненого глутатіону.....	54
2.17.	Визначення глутатіонпероксидазної активності.....	54
2.18.	Визначення глутатіонтрансферазної активності.....	55
2.19.	Визначення глутатіонредуктазної активності.....	56
2.20.	Визначення вмісту молекул середньої молекулярної маси.....	56
2.21.	Електрофорез у поліакриламідному гелі	57
2.22.	Визначення протеасомної активності.....	58
2.23.	Визначення вмісту циркулюючих імунних комплексів.....	58
2.24.	Визначення активності α_1 -антитрипсину та α_2 -мактроглобуліну	59
2.25.	Визначення загальної протеолітичної активності та активності метало- та серинових протеїназ.....	60
2.26.	Імуноферментний аналіз.....	61
2.27.	Статистична обробка результатів.....	62
РОЗДІЛ 3. Результати досліджень і їх обговорення.....		63
3.1.	Особливості функціонування організму щурів за кислотного опіку стравоходу	63
3.2.	Стан системи перекисного окиснення ліпідів та функціонування системи антиоксидантного захисту за кислотного опіку статевонезрілих щурів.....	76
3.3.	Протеолітична деградація білків за кислотного опіку стравоходу.	90

3.3.1. Показника системи протеолізу за кислотного опіку стравоходу статево незрілих щурів	90
3.3.2. Дослідження вмісту шаперонів та активності протеасом у тканині стравоходу за кислотного опіку стравоходу статево незрілих щурів	103
3.3.3. Зміни білкового складу сироватки крові та слизової оболонки стравоходу за кислотного опіку стравоходу статево незрілих щурів.....	109
3.3.4. Молекули середньої маси у тканинах щурів за кислотного опіку стравоходу.....	116
3.4. Показники гуморальної ланки імунітету за кислотного опіку стравоходу.....	120
АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ	131
ВИСНОВКИ.....	138
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	140
ДОДАТОК 1.....	163

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

- АСТ – аспаратаминотрансфераза;
АЛТ – аланінамінотрансфераза;
ШКТ – шлунково-кишковий тракт
КОС – кислотний опік стравоходу;
ХОС – хімічний опік стравоходу;
ММП – матриксні металопротеїнази;
ТІМП – танинний інгібітор металопротеїназ;
ЦК – циркулюючі імунні комплекси;
ПААГ – поліакриламід;
ДСН – додецилсульфатнатрію;
 α_2 -МГ – макроглобулін;
 α_1 -АТ – антитрипсин;
ЕЦМ – екстрацелюлярний матрикс;
ФМСФ – фенілметил сульфоніл флуорид;
ЕДТА – етилендіамінтетраацетат;
МСМ – молекули середньої маси;
IgG – імуноглобуліни класу G;
BAEE – N-бензоїл-L-аргінін- етиловий ефір;
FGF – фактор росту фібробластів;
TGF – трансформуючий фактор росту;
IL – інтерлейкін;
VEGF – фактор росту ендотелію судин;
EGF – епідермальний фактор росту;
TNF- α – фактор некрозу пухлин;
BCA – бичачий сироватковий альбумін;
Hps – білок теплового шоку;
GSH – відновлений глутатіон;

GSSG – окиснений глутатіон;

КП – каспазоподібна активність протеасом;

ХТП – хімотрипсинподібна активність протеасом;

ВСТУП

Актуальність теми.

Хімічні опіки стравоходу продовжують залишатися однією з найбільш актуальних і соціально важливих проблем дитячого травматизму [1, 2]. Діти через незрілість тканинних структур, та недостатньо сформовані захисні реакції органів і систем наражаються на більшу небезпеку в порівнянні з дорослими. У постраждалих виникають порушення всіх видів обміну речовин і окисно-відновних процесів, розвивається опікова хвороба з різноманітними клінічними проявами [3]. У патогенезі опікової хвороби велике значення мають порушення системної гемодинаміки і мікроциркуляції та виражені метаболічні зміни, які характеризуються катаболічною спрямованістю.

На сьогодні змінилися уявлення про етіологію, патогенез і лікування захворювань людини, що обумовлено появою нових методик, які дозволяють виявити ризики розвитку того чи іншого захворювання на доклінічному етапі. Провідним і найбільш перспективним напрямком в цьому відношенні є вивчення білкового (протеомного) спектру у тканинах. Дослідження з використанням протеомного аналізу хвороб стравоходу нечисленні, найбільш вивченими є гастроезофагеальна рефлюксна хвороба (ГЕРХ), стравохід Барретта і аденокарцинома стравоходу [4, 5, 6, 7].

За опіку стравоходу провідну роль в деградації білків відіграють протеолітичні ферменти, які беруть участь у відторгненні пошкоджених тканинних елементів. Протеїнази беруть участь у розвитку необоротних реакцій, утворенні біологічно активних речовин, вони забезпечують швидку відповідь клітини на дію подразників ендогенної та екзогенної природи [8, 9, 10]. Процеси протеолізу мають безпосереднє відношення до реакцій запалення та деструкції тканин [11, 12] і є необхідною умовою нормального перебігу регенерації тканин [13]. У той же час, надмірна активація протеолізу може бути причиною пошкодження нативних тканин і розширення вогнища запалення. Це особливо небезпечно для стравоходу, де посилення запального

процесу може привести до істотного рубцевого звуження і навіть створити загрозу перфорації органу [14]. Пацієнти з хімічним опіком стравоходу мають досить високий ризик розвитку карциноми органу [15, 16].

Система протеолізу крові і тканин включає протеолітичні ферменти, їх неактивні форми, активатори та інгібітори протеїназ, продукти протеолізу [17]. Вивчення протеолітичної деградації білків має важливе значення для розуміння молекулярних механізмів патогенезу захворювання і виявлення нових терапевтичних мішеней. Пептиди, які утворюються в результаті деградації біополімерів, здійснюють виражену токсичну дію не лише на ушкоджений орган, але на весь організм в цілому [18]. Тому встановлення взаємозв'язку між тяжкістю клінічних проявів після опіку і ступенем підвищення вмісту в крові пептидів, як інтегративного показника інтоксикації, є актуальним для оцінки ефективності клінічної терапії хворих опіковою хворобою. Незважаючи на існуючі дослідження, на сьогодні залишається недостатньо вивченим патогенез утворення рубців та розвитку запалення за хімічних опіків стравоходу.

У зв'язку з зазначеним, актуальними є дослідження протеолітичної деградації білків за кислотного опіку, оскільки частина побутових засобів, які викликають хімічні пошкодження стравоходу у дітей, є кислотовмісними. Дослідження особливостей стану системи протеолітичних ферментів має важливе значення для вивчення післяопікових ускладнень, а також для обґрунтування застосування протеолітичних ферментів та їх інгібіторів в комплексній терапії. Активно триваючі дослідження, присвячені хімічним опікам і рубцевим звуженням стравоходу, служать підтвердженням складності даної проблеми і її актуальності.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана в НДЛ «Фізико-хімічної біології», відділення «експериментальної біології» Навчально-наукового центру «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка у

рамках науково-дослідних тем «Механізми реалізації адаптаційно-компенсаторних реакцій організму за умов розвитку різних патологій» (№ д/р 0111U004648, 2011-2015 рр.) та «Механізми регуляції метаболічних процесів в організмі за умов розвитку патологічних станів» (№ д/р 0116U002527, 2016-2018 рр.).

Мета і задачі дослідження. Метою роботи було дослідити роль процесів протеолітичної деградації білків у розвитку метаболічної дисфункції організму за умов експериментального кислотного опіку стравоходу статевонезрілих щурів.

Для досягнення мети, були поставлені наступні завдання:

1. Відтворити модель кислотного опіку стравоходу II ступеня тяжкості у статевонезрілих щурів та визначити морфологічні, цитологічні та біохімічні параметри функціонування тканин за даної патології.

2. Оцінити вплив кислотного опіку стравоходу на перекисне окислення ліпідів та систему антиоксидантного захисту.

3. Визначити співвідношення протеїназ та їх інгібіторів, оцінити білковий склад та вміст молекул середньої маси сироватки крові та слизової оболонки стравоходу, за кислотного опіку стравоходу II ступеня тяжкості.

4. Визначити вміст шаперонів та активність протеасом у тканинах стравоходу в динаміці за експериментального кислотного опіку стравоходу.

5. Проаналізувати рівень циркулюючих імунних комплексів, вміст імуноглобулінів класу G та цитокінів у сироватці крові статевонезрілих щурів за умов кислотного опіку стравоходу II ступеня тяжкості.

Об'єкт дослідження: система протеолізу тканин стравоходу та крові за експериментальної моделі кислотного опіку II ступеня тяжкості.

Предмет дослідження: компоненти системи протеолізу крові та тканин стравоходу за умов експериментального кислотного опіку стравоходу II ступеня тяжкості.

Методи дослідження. у роботі проводили спектрофотометричне визначення загальноклінічних та біохімічних показників крові, активності протеїназ та їх інгібіторів, вмісту молекул середньої маси (МСМ), активності ферментів про- та антиоксидантної системи, продуктів вільнорадикального окиснення ліпідів, окисної модифікації білків, концентрації білка; флуориметричне визначення активності протеасом, вмісту окисненого та відновленого глутатіонів, вмісту шифових основ; імуноферментний аналіз вмісту шаперонів Hsp60 та Hsp70, матриксних металопротеїназ (ММП), тканинного інгібітора металопротеїназ-1 (ТІМП-1), основного фактору росту фібробластів (bFGF), Ig G, про- та протизапальних цитокінів; метод преципітації для визначення вмісту циркулюючих імунних комплексів (ЦІК); диск-електрофорез білків слизової оболонки стравоходу та сироватки крові; цитологічний аналіз клітин крові та гістологічне дослідження стравоходу; статистичний аналіз.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше проведено комплексний аналіз стану системи протеолізу за умов кислотного опіку стравоходу статевонезрілих щурів. Патогенез опікової хвороби стравоходу, як біологічної реакції організму на травму, охарактеризовано на основі поєднаної дії систем протеолізу, антиоксидантної системи та імунної системи організму.

Встановлено, що за кислотного опіку стравоходу (КОС) відбувалось підвищення рівня $\alpha 2$ – макроглобуліну, активності серинових протеїназ і металопротеїназ на 7 добу експерименту, вмісту ТІМП-1, bFGF, досліджуваних ММП в основному на 21 добу після травми, що відповідає встановленим кількісним змінам вмісту білкових фракцій та свідчить про підвищену активність протеолітичних процесів та дисбаланс в системі протеолізу. Збільшення кількості МСМ на 21 добу після опіку у слизовій стравоходу свідчить про порушення детоксикаційної функції.

Вперше показано зниження вмісту шаперонів Hsp60 та Hsp70 та підвищення активності протеасом в стравоходах щурів після кислотного опіку.

На 21 добу після травми хімотрипсинподібна активність 26s протеасом у 1,4 рази вище за контроль, а каспазоподібна – у 7 разів.

Встановлено, що опік стравоходу супроводжувався підвищенням концентрації IgG та вмісту середньо- і низькомолекулярних ЦК на 21 добу експерименту, що свідчить про хронічний інфекційний процес, розвиток поліорганної недостатності, порушення регенерації та уповільнення загоєння опікової рани.

Практичне значення одержаних результатів. Отримані результати дисертаційної роботи розширюють уявлення про молекулярно-біохімічні зміни за кислотного опіку стравоходу та дають можливість визначити роль протеолітичної деградації білків у загоєнні післяопікових ран стравоходу.

Аналіз досліджених показників протеолітичної системи показав перспективність використання цих параметрів (активність та вміст протеолітичних ферментів) як прогностичного та діагностичного критеріїв для оцінки ступеня тяжкості протікання післяопікової хвороби стравоходу. Вивчення протеолітичної активності у крові дозволяє проводити оцінку генералізованої відповіді організму на запальний процес у стравоході.

Отримані у дисертаційній роботі дані впроваджено у навчальний процес курсів «Молекулярні основи дії ферментів», «Методи практичної біохімії».

Особистий внесок здобувача.

Здобувачем особисто проаналізовано наукову літературу за темою роботи, самостійно виконано експериментальні дослідження та підготовку матеріалів до публікації. За участі співавторів публікацій проведено інтерпретацію отриманих результатів.

Планування експериментальних робіт, аналіз та обговорення отриманих результатів проведено спільно з науковим керівником. Здобувач висловлює вдячність д.б.н. Савчуку О.М. та іншим колегам за допомогу у проведенні досліджень, співучасть яких відображена у спільних публікаціях.

Апробація результатів дисертації. Основні результати дисертації доповідались на вітчизняних та міжнародних конференціях: XII Міжнародній науковій конференції “Молодь та поступ в біології” (Львів, 2016), XIV Міжнародній науковій конференції студентів, аспірантів та молодих вчених “Шевченківська весна” (Київ, 2016), 2nd Prague European Days of Internal Medicine (Prague, 2016), XV Міжнародній науковій конференції студентів, аспірантів та молодих вчених “Шевченківська весна” (Київ, 2017), XIII Міжнародній науковій конференції “Молодь та поступ в біології” (Львів, 2017), XIII Міжнародній конференції молодих науковців “Біологія: від молекули до біосфери” (Харків, 2017).

Публікації. За темою дисертації опубліковано 13 наукових праць, з яких: 5 статей у вітчизняних фахових періодичних виданнях та 2 публікації у виданнях, включених до міжнародних наукометричних баз. А також 6 тез доповідей у матеріалах наукових конференцій та з’їздів.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається із вступу, огляду літератури, матеріалів і методів досліджень та розділу результатів власних досліджень з їх обговоренням, узагальнення, висновків, списку використаних літературних джерел (210 посилань). Дисертаційна робота викладена на 165 сторінках і проілюстрована 24 рисунками та 14 таблицями.

РОЗДІЛ 1

ЗАГАЛЬНІ УЯВЛЕННЯ ПРО ОПІКИ ТА СИСТЕМУ ПРОТЕОЛІЗУ

1.1 Метаболічні порушення за опікової хвороби

Протягом багатьох десятиліть хімічні опіки стравоходу у дітей залишаються важливою медико-соціальною проблемою. Проблема лікування хімічних опіків стравоходу привертає все більшу увагу спеціалістів різних профілів та органів соціального захисту, що обумовлено не тільки зростаючою тяжкістю опікової травми, але й труднощами лікування, які нерідко закінчуються смертю або інвалідністю.

За літературними даними, хімічні опіки стравоходу займають перше місце серед захворювань стравоходу у дитячому віці [19, 20]. Після перенесених хімічних опіків стравоходу III ступеня рубцеві стенози виникають у 4-34% [21, 22]. Найбільше страждають діти у віці від 1 до 3 років [21, 23].

Тяжкість отриманої хімічної травми залежить від характеру діючої речовини, від часу дії та об'єму реагента, від своєчасного надання медичної допомоги. Гострі корозійні отруєння з'являються в результаті прийому кислот, лугів, окиснювачів, солей важких металів та інших хімічних речовин, які часто використовуються у повсякденному житті [24].

Найбільш поширеними хімічними речовинами, випадково вжитими дітьми, є оцетова есенція та лужні розчини, що використовуються у побуті для очищення склокерамічних поверхонь або труб (Крот, Шуманіт, аккумуляторна рідина, каустична сода, інші речовини) [25].

Залежно від характеру речовини розвивається коагуляційний некроз, коли відбувається згортання білків, як на поверхні, так і в глибокому м'язевому шарі - за впливу кислих радикалів (кислоти), або колікваційний некроз - розчинення, розрідження тканин (за дії лугів). При отруєнні неорганічною

кислотою пошкодження м'язових шарів зазвичай не відбувається, так як білок, що зазнав коагуляції, оберігає їх від подальшого всмоктування кислоти. За дії лугів процес поширюється глибоко у тканини. При отруєнні органічними кислотами вплив кислих радикалів більш подібний до дії лугів [3].

Під дією неорганічних кислот (азотна, сірчана, соляна, сірководнева та інші) відбувається дегідратація і коагуляція тканин, настає їх загибель за типом сухого некрозу [3]. Вживання азотної кислоти веде до появи в організмі нітритів і нітратів, що сприяють утворенню метгемоглобіну [26].

Органічні кислоти, зокрема оцтова кислота, мають менш виражені коагуляційні властивості, що дозволяє їм проникати в глибокі шари ураженої стінки стравоходу і спричиняти значну шкідливу дію [3]. При резорбції оцтової кислоти розвивається внутрішньосудинний гемоліз еритроцитів, який у поєднанні з екзотоксичним шоком веде до розвитку токсичної коагулопатії. Руйнування тканин внаслідок хімічного пошкодження та гемоліз еритроцитів обумовлюють викид великої кількості тромбопластичного матеріалу, що призводить до гіперкоагуляції [27]. У хворих з отруєнням оцтовою кислотою на першу-другу добу реєструється розвиток синдрому дисемінованого внутрішньосудинного згортання крові [28].

У результаті кислотного опіку пошкоджується, насамперед, слизова оболонка порожнини рота, глотка, стравохід та шлунок [24]. За гіперемією і набряком слизової оболонки швидко настає некроз тканин. На кінець першого тижня починається відторгнення некротичних ділянок тканин і утворюються поверхневі або глибокі виразки. Поверхневі виразки швидко епітелізуються (за 1-2 міс), глибокі виразки заживають з утворенням грануляцій та сполучної тканини. У період хронічного коррозивного езофагіту загоєння відбувається повільно, формування рубця можливе протягом 2-6 місяців. Утворення рубців та виразок у стравоході після хімічного опіку може тривати роками. У окремих хворих рубцеві звуження стравоходу виникають навіть після 10-12 років з моменту опіку [22].

Гострі отруєння агресивними речовинами можуть привести до серйозних хімічних пошкоджень у верхньому відділі шлунково-кишкового тракту, найчастіше уражаються стравохід і шлунок. Відповідно до класифікації Холіндера і Фрідмана, посткорозійні ендоскопічні зміни класифікуються як три ступені тяжкості: перша ступінь – поверхневі ушкодження, пов'язані з гіпертермією, епітеліальною десквамацією і слизовим набряком. Друга ступінь - ушкодження всіх шарів слизової оболонки, з проявами у вигляді ексудації, ерозії і виразки. Третя ступінь – трансмуральні ушкодження, пов'язані з проникненням виразки у глибокі шари тканин і сусідніх органів [29]. Найчастіше, після вживання хімічних речовин, рани виникають у стравоході та шлунку, так як корозійна речовина залишається там протягом більш тривалого періоду часу. Але крім місцевої дії, вжита всередину речовина, має і загальнотоксичну дію на організм, від якої, в першу чергу, страждають печінка і нирки. Тому за кислотного опіку стравоходу може розвинутися тяжка печінково-ниркова недостатність, а при вживанні оцтової кислоти - тяжке ураження серця [30]. Найбільш поширеними ускладненнями, які можуть виникнути, є: перфорація, кровотечі, сепсис, стенози стравоходу та рак стравоходу.

Реакція запалення, що виникає внаслідок опіків, характеризується зростанням радикал-продукуючої активності нейтрофілів периферичної крові і їх міграцією в зону опіку [31]. Активні форми кисню (АФК; супероксидний радикал, пероксид водню, гідроксильний радикал, синглетний кисень, гіпохлорит) і азоту (оксид азоту, пероксинітрит) необхідні для видалення бактерій і продуктів розпаду біомолекул з області пошкодження. При цьому зростає загроза окисного пошкодження клітин і тканин організму. Дані експериментальних та клінічних досліджень свідчать про те, що нейтрофіли і утворені ними АФК безпосередньо беруть участь у формуванні опікової рани і у розвитку посттравматичного некрозу [32].

Після опікової травми рівень АТФ в тканинах поступово знижується, а підвищений рівень аденозинмонофосфату (АМФ) сприяє утворенню гіпоксантину, що є субстратом для ксантиноксидази. Ці складні реакції стимулюють утворення пероксиду водню і супероксиду, що належать до шкідливих вільних радикалів. Разом з генерацією вільних радикалів ксантиноксидази при опіковій травмі, активовані адгезією нейтрофіли виробляють додаткові вільні радикали [33].

У нормі продукція АФК як у шкірі, так і у інших тканинах, знаходиться під контролем антиоксидантних ферментів (супероксиддисмутази, каталази, глутатіонпероксидази та інших) і низькомолекулярних антиоксидантів (альфатокоферолу, глутатіона, аскорбата та інших) [34]. Роль індукторів антиоксидантних ферментів виконують самі АФК, однак, збільшення їх концентрації здатне призводити до зворотного ефекту і прямої інактивації ферментів [34].

За опіків відбувається ослаблення антиоксидантної захисної системи у зоні пошкодження. У першу чергу, відбувається зниження активності глутатіонпероксидази, супероксиддисмутази та вмісту альфа-токоферолу [34]. Виникає дисбаланс між про- і антиоксидантними системами, яким створює умови для виникнення оксидативного стресу [34, 35].

Формування даного стресу при опіковій травмі розглядається як послідовні ланки патологічного ланцюга: розлади кровообігу і мікроциркуляції, кисневе голодування, ендогенна інтоксикація, мікробне навантаження, гіперпродукція АФК і активація процесів ПОЛ, виснаження антиоксидантної системи (АОС) і розвиток антиоксидантної недостатності [36, 37].

Розвиток опікового ушкодження супроводжується накопиченням у крові і печінці шурів первинних і вторинних продуктів ПОЛ: найбільш виражене збільшення концентрації дієнових кон'югатів в крові відбувається на кінець

першої доби, а максимальне збільшення рівня МДА в крові і печінкці- на третю добу після опікової травми [39].

Важливо підкреслити, що для кожного організму характерно своє індивідуальне співвідношення про- і антиоксидантів, яке визначає його відповідь на дію екзогенних факторів [40].

Велика кількість АФК, яка утворюється після опіку, сприяє розвитку запалення, синдрому системної запальної відповіді, імуносупресії, інфекційної хвороби та сепсису, пошкодженню тканин та множинній недостатності органів [35].

Поліорганний характер патологічних змін в організмі людей з опіками призводить до метаболічної дисфункції, нейроендокринна відповідь якої визначається станом енергетичного обміну у пацієнтів, на який впливають прискорений розпад білків та ліпідів, збільшення активності процесів гліколізу і глюконеогенезу з вивільнених амінокислот і гліцерину [41]. Руйнування тканин за опікової травми обумовлює первинне ушкодження тканини і залучення в вогнище деструкції клітинних елементів крові, (макрофагів, нейтрофілів, лімфоцитів, тромбоцитів), що веде до порушення функції мембран і внутрішньоклітинного гомеостазу з переважно некротичною формою загибелі клітин [42]. При тяжкій опіковій травмі формується дефіцит об'єму циркулюючої крові, що посилюється перерозподілом рідини на користь міжклітинного простору через дефіцит білка, а прогресуюча гіповолемія, що проявляється зниженням артеріального тиску, запускає каскад компенсаторних механізмів, що полягають у посиленні роботи серця і зменшенні обсягу судинного русла [43, 44].

У зоні опікової травми виникають тяжкі некротичні зміни з утворенням значної кількості клітинних і гуморальних медіаторів запальної реакції, зокрема, гістаміну, серотоніну, простагландинів, лейкотрієнів, кінінів, лізосомальних гідролаз, що забезпечують розвиток типових судинних реакцій

в зоні альтерації, а також прогресуючий характер формування вторинних альтеративних-некротичних зрушень [45, 46].

Вираженість метаболічних порушень залежить від площі і глибини опікового ураження [46].

Різде порушення гормонального балансу та цитокінового статусу призводять до важких порушень мікроциркуляції крові та системної гемодинаміки [47, 48]. Концентрація фактора росту ендотелію судин з високим ступенем достовірності корелює із загальною площею опіків [49]. Гістохімічні дослідження свідчать про те, що на першу добу після обширних глибоких опіків в міоцитах експериментальних тварин активність сукцинат-дегідрогенази знижується, що свідчить про пригнічення функцій мітохондрій [50].

На фоні нейроендокринних змін посилюються порушення гемодинаміки, розвивається депресія клітинної і гуморальної ланок імунітету, внаслідок чого стабілізація нейроендокринного гомеостазу в кінцевому рахунку сприяє розвитку більш повноцінної відповіді на можливу бактеріальну агресію, зменшуючи тим самим кількість інфекційних, токсичних та гнійно-септичних ускладнень [51]. Поряд з виникаючими розладами гемодинаміки і водно-електролітної рівноваги, що порушують процес доставки гормонів, опікова хвороба призводить до «тиреоїдного виснаження» [52].

Результати дослідження морфологічного стану печінки, нирок і міокарда щурів свідчать про те, що глибокі опіки супроводжуються істотними змінами їх архітекtonіки, причому найбільша вираженість змін відзначена в паренхімі нирок, які є «критичним органом», що визначають результат опікової хвороби [50].

Тяжкі опіки викликають реакцію, яка впливає майже всі системи органів. Запалення, гіперметаболізм, атрофія м'язів і резистентність до інсуліну є ознаками патофізіологічної реакції на тяжкі опіки, при цьому порушення

обміну речовин можуть залишатися навідь протягом декількох років після травми [32].

Незважаючи на заходи щодо обмеження торгівлі агресивними речовинами, стандартизацію їх концентрації і використання захисних ковпачків для пляшок, як і раніше, зростає відсоток кількості агресивних інтоксикацій з посткорозійними ускладненнями. Гострі корозійні інтоксикації є основною причиною смерті в клінічній токсикології.

1.2. Екстрацелюлярний та цитоплазматичний протеоліз

Важливу роль в патогенезі опікової хвороби відіграє порушення білкового обміну. Розпад білків, обумовлений підвищенням протеолітичної активності крові, що проявляється вже на початку опікового шоку та є однією з причин розвитку опікового виснаження. Спостерігаються гіпопротеїнемія, зміна фракційного складу білків плазми і негативний баланс азоту. Для опікової хвороби характерно зниження вмісту альбумінової фракції плазми, зростання вмісту α_1 і α_2 глобулінових фракцій. Дефіцит білків настає в результаті втрати їх з поверхні рани, виділення з сечею і внаслідок генералізованого розпаду тканини. Порушуються також процеси біосинтезу білків [53].

Поряд з розпадом тканинних і сироваткових білків відбувається руйнування і білків різних ферментних систем, зокрема, дезамінази і декарбоксилази, внаслідок чого в печінці порушуються два найважливіших обмінних процеси - дезамінування і переамінування амінокислот [54]. Змінюється вміст у крові і небілкового азоту. Так, вміст небілкового азоту у крові опікових хворих значно підвищується в зв'язку з порушенням білкового обміну, про що свідчить збільшення у крові кількості сечовини, аміаку та, особливо, креатину. Такі зміни розглядаються як показник токсемії [55].

Збільшення у крові поліпептидного азоту, що є проміжним продуктом білкового обміну, перш за все, характеризує білковий розпад в організмі [56]. Відомо, що поліпептиди, які накопичуються у крові, як і інші продукти проміжного обміну білка, мають токсичну дію на організм хворого.

Білки крові, їх загальний вміст, і особливо вміст альбумінової та глобулінової фракцій, в певній мірі, відображає стан хворого, а на пізніх етапах хвороби є прогностичним критерієм.

Ферментативний гідроліз білків та пептидів каталізується протеолітичними ферментами (протеїназами) та відіграє важливу роль в регуляції обміну речовин в організмі. Протеїнази здійснюють гідроліз пептидного зв'язку у білках, включаються у функціонування білкової молекули на самих ранніх етапах біосинтезу і супроводжують білки до кінцевої стадії їх життєвого циклу (повне розщеплення, запуск апоптозу) [57].

Протеолітичні ферменти відносяться до класу гідролаз (ЕС 3) і є пептидними гідролазами або пептидазами (ЕС 3.4). Залежно від місця дії протеази ділять на екзопептидази та ендопептидази. Екзопептидази каталізують гідроліз пептидних зв'язків поблизу N- або C- кінця залишків субстрату. Ендопептидази розщеплюють пептидні зв'язки всередині поліпептидного ланцюга [58]. На основі каталітичного механізму і присутності амінокислотного залишку в активному сайті протеїнази ділять на аспарагінові, цистеїнові, глутамінові, треонінові, серинові, металопротеїнази та протеїнази зі змішаним або невідомим каталітичним механізмом [59].

Основною групою ферментів, відповідальних за деградацію колагену та інших білків у екстрацелюлярному матриці (ЕЦМ), є матричні металопротеїнази (ММП). Колаген є основним структурним компонентом сполучної тканини, і його деградація є дуже важливим процесом у розвитку, морфогенезі, ремоделюванні тканин та регенерації. Сімейство ММП ділять на шість груп: колагенази, желатинази, стромелізени, матрилізени, мембранні ММП і інші не класифіковані ММП [60].

Інгібітори протеїназ контролюють активність протеїназ. Плазма крові містить декілька інгібіторів, і близько 10% всіх білків плазми є інгібіторами протеїназ. Основними інгібіторами плазми крові є α_1 -інгібітор протеїназ (α_1 -ІІ) та α_2 -макроглобулін (α_2 -МГ) [61].

α_2 -МГ утворює з протеїназами комплекси. Він бере участь в механізмах пригнічення ензимних каскадних реакцій у процесах згортання крові, фібринолізу, кінінової системи та системи комплементу. Приймає участь у транспорті факторів росту, цитокінів, у модуляції інфекційних та імунних реакцій. α_2 -МГ утворюється в осередках запалення та фіброзних змін. Відзначається позитивна кореляція вмісту α_2 -МГ з прогресуванням фіброзу тканин [61].

α_1 -ІІ інгібує активність трипсину, хімотрипсину, еластази, каллікреїну, катепсинів та інших ферментів тканинних протеїназ. Він контролює стан систем згортання та фібринолізу, імунних реакцій, синтез та розпад біологічноактивних білків, пептидів та гормонів. При цьому утворюється комплекс α_1 -ІІ. Даний інгібітор виробляється, в основному, в печінці і, в меншій мірі, в ентероцитах та лейкоцитах, потім вивільняється в кровообіг під час інфекції або запалення. В процесі інактивації протеїнази руйнується як протеїназа, так і α_1 -ІІ [62].

Специфічними інгібіторами ММП є тканинні інгібітори металопроотеїназ - ТІМП-1, ТІМП-2, ТІМП-3 та ТІМП-4. Існує думка, що чистий протеоліз ММП в тканині представляє собою загальну суму активних ММП з вирахуванням інгібування ТІМП [63].

Розрізняють два типу протеоліза: перший веде до повного розщеплення білкових молекул на окремі амінокислоти (повний) і другий - частковий, так званий обмежений протеоліз, при якому вибірково гідролізується один або кілька пептидних зв'язків в молекулі білка. Обмежений протеоліз служить пусковим механізмом багатьох процесів і забезпечує швидку фізіологічну відповідь організму на певні умови [64]. Всі протеїнази на певних стадіях їх існування є внутрішньоклітинними [65].

Відновлення пошкоджених тканин є добре скоординованою системною дією, яка складається з чотирьох фаз: гемостазу та коагуляції, запалення, проліферації і ремоделювання. Якщо процес переривається або зупиняється на

будь-якій стадії, це призводить до порушення загоєння і утворення хронічної рани. Як правило, хронічні рани утворюються в результаті зупинки процесу відновлення під час стадії запалення. Таким чином, надмірне запалення збільшує рівень протеїназ в порівнянні з їх інгібіторами. Цей дисбаланс порушує рівновагу між осадженням екстрацелюлярного матриксу і деградацією, що життєво важливо для ефективного відновлення тканини, та призводить до неконтрольованого руйнування ЕЦМ і утворення хронічної рани. Тому хронічні рани містять підвищені рівні протеїназ, які не дають їм гоїтися [65].

Загоєння ран є динамічним процесом, який включає в себе складні взаємодії молекул позаклітинного матриксу, медіаторів та різних клітин. В основі загоєння лежать такі типові патологічні процеси, як запалення, порушення мікроциркуляції, периферичного кровообігу і тканинного росту [63].

Для досягнення гомеостазу після пошкодження важливу роль відіграє постійний баланс між стимулюючими і інгібують медіаторами протягом різних стадій загоєння. Запальна відповідь сприяє експресії факторів росту і цитокінів, які регулюють клітинні і тканинні зміни, необхідні для загоєння. Всі відомі медіатори за походженням діляться на два типи: гуморальні (система комплементу, згортання крові і калікреїн-кінінова система) та клітинні (клітини тканин і крові). Останні, в свою чергу, також діляться на попередні, тобто наявні у клітинах та рідинах до активації (вазоактивні аміни, лізосомальні фактори, нейропептиди), і ті, що утворюються, або мембранозв'язані, які продукуються при активації клітин: метаболіти арахідонової кислоти (простагландини, лейкотрієни, тромбоксан A₂, ліпоксіни), монокіни (інтерлейкін-1 β (IL-1 β), фактор некрозу пухлин - α (TNF- α) і ін.), лімфокіни (фактор некрозу пухлини- β (TNF- β), інтерферон - γ (IFN- γ), IL-2 та ін.), активні метаболіти кисню (супероксиданіон, пероксид водню, гідроксильний радикал), окис азоту та його активні метаболіти [60]. У

неускладненій рані ММП інгібуються неспецифічним інгібітором протеїнази $\alpha 2$ -макроглобуліном і тканинними інгібіторами металопротеїназ. У рані, що не загоюється, ММП не збалансовані рівною кількістю інгібіторів тканинних металопротеїназ. У результаті цього розвивається деградація рани – руйнуються матрикс та колаген. Надмірна кількість клітин, в яких розвивається процес запалення, також змінює профіль цитокінів в рані, при цьому переважають запальні цитокіни [63].

Вважають, що некерована протеїзна активність є одним з головних патологічних механізмів ран, що не загоюються. У протеолітично активному мікросередовищі медіатори, необхідні для репарації, стають мішенями для протеїназ. Традиційно розвиток запалення пов'язують з посиленням протеолізу в тканинах. При внутрішньоклітинному розщепленні головну роль відіграють лізосомальні ферменти лейкоцитів [58].

Під час фази гемостазу та коагуляції руйнуються пошкоджені кровеносні судини, активізуються тромбоцити, ініціюється каскад коагуляції, утворюється фібриновий сгусток, а з тромбоцитів і пошкоджених клітин виділяються речовини, які викликають вторинну вазодилатацію, підвищують проникність судин та діють як хемотаксисні стимули для різних клітин [68]. Спершу фібрин піддається деградації плазмінсериновою протеїназою, яка утворюється з плазміногену. Особливо важливим є значення ферментативних процесів у першу фазу запалення, її перебіг і завершення визначаються виразністю протеолізу. Запалення починається з вивільнення факторів росту та цитокінів з активованих тромбоцитів і пошкоджених клітин, які є сигналом для міграції макрофагів (лейкоцитів) до місця пошкодження [69].

Нейтрофіли є першими лейкоцитами, які досягають місця пошкодження, де вони прикріплюються до судинних ендотеліальних клітин, а потім переходять в екстраваскулярний простір [69]. Вони секретують протеази, в тому числі еластазу, які видаляють залишки пошкоджених клітин. α_1 -ІІІ секретується макрофагами та регулює активність еластази. Під час фази запалення вісь

калікреїн- кініну контролює вазодилатацію і судинну проникність [70]. Протеази також полегшують міграцію нейтрофілів у екстрацелюлярний простір, де вони запобігають бактеріальним інфекціям за допомогою фагоцитозу [71].

Під час проліферації відбувається повторна епітелізація, ангиогенез, деградація і ремоделювання ЕЦМ протеазами (особливо ММП) і їх інгібіторами. Такі процеси призводить до закриття рани. Після закриття рани починається фаза ремоделювання, яка призводить до утворення колагенового рубця [72].

Рядом дослідників була проаналізована роль прозапальних і протизапальних цитокінів в активації або пригніченні протеїназ в рані, оскільки утворення сполучної тканини під час процесу загоєння ран може залежати від цитокінів, які впливають на синтез колагену, ММП і ТІМП. Було виявлено, що при низькій концентрації TNF- α збільшується продукція ТІМП фібробластами, тоді як при більш високих концентраціях цитокіну такий синтез ускладнюється. Фракція TNF- α також стимулювала утворення колагенази і стромелізину. Отже, TNF- α стимулює деградацію ЕЦМ за допомогою продукції ММП та ТІМП [80]. IL-1 α , інший запальний цитокін, індукував як ММП, так і продукцію ТІМП. Автори порівнювали рівні ММП-1 та IL-1 α в ранах неускладнених та хронічних. Вони виявили, що загоєння хронічних ран корелює зі зменшенням активності IL-1 α і колагенази [73]. За інших досліджень було показано, що шлях NF- κ B (який активується IL-1 і TNF- α) необхідний для активації транскрипції колагенази-1 (ММП-1) в синовіальних фібробластах кроликів [73]. Silvestre et al. встановили, що IL-10, протизапальний цитокін, впливає на активність ММП; а підвищена активність ММП, в свою чергу, опосередковує збільшення ангиогенезу через фактор росту ендотелію судин [73]. У сукупності ці дослідження підкреслюють складний характер регулювання і модуляції ММП в рані і наголошують на необхідність

продовження дослідження терапевтичного інгібування ММП і непрямих шляхів, які призводять до їх активації.

У рані містяться як ендогенні, так і екзогенні ферменти, що володіють широким спектром дії. До ендогенних відносяться ферменти, що звільняються при розпаді лейкоцитів та інших клітин. До екзогенних - ферменти бактеріального походження. Специфічна дія ферментів залежить від рН середовища: у кислому середовищі виявляють свою активність пептази, в лужному - триптази. Протеолітичні ферменти діють на некротичні тканини, призводять до розпаду білків. Максимальної дії ферментні системи досягають, коли запалення досягає максимальних значень [67].

Протеїнази відіграють вирішальну роль в складних тканинних процесах, впливаючи на імунні реакції, цілісність епітеліальних і мезенхімальних клітин, проліферацію та міграцію, а також дозрівання та ремоделювання ЕЦМ.

Крім протеїназ ЕЦМ важливу роль в деградації білків відіграють цитоплазматичні ферменти. Цитоплазматичні протеїнази регулюють клітинні процеси, включаючи передачу внутрішньоклітинних сигналів, диференціювання клітини, реплікацію ДНК, транскрипцію, ко- та посттрансляційні модифікації, просування по клітинному циклу, апоптоз, формування цитоскелету. Крім того, вони необхідні для здійснення контролю за протеомом клітини, для елімінації пошкоджених і непотрібних білків [58].

Важливими протеолітичними ферментами цитоплазми є кальпаїн та каспази. Крім того, у клітинах присутні цитоплазматичні білкові комплекси – протеасома, які володіють широкими протеолітичними функціями. Протеоліз в цитоплазмі здійснюється за допомогою олігопептиду убіквітин і убіквітінової системи, АТФ і протеасоми, яка крім протеолітичної активності має ще й АТФ-азну активність, а також шаперони, специфічні білки, які контролюють згортання (фолдінг) поліпептидних ланцюгів, їх міграцію і протеоліз [74].

Убіквітин-протеасомна система відповідає за деградацію більшості клітинних білків [74]. В цій системі білки, які підлягають руйнуванню,

ферментативно маркуються поліпептидом убіквітином за допомогою убіквітин лігази. Такі білки розпізнаються 26s-протеасомою, яка представляє собою великий білковий діжкоподібний комплекс, що складається з 20s-ядра, пов'язаного з двома регулюючими субодинацями 19s. Останні субодинаці розпізнають і пов'язують убіквітиновані білки і починають їх АТФ-залежне руйнування в каталітичному ядрі [75].

На першому етапі убіквітинування здійснюється активація убіквітину E1-активуючим ферментом, що супроводжується гідролізом АТФ. Убіквітин зв'язується з цистеїном активного центру E1 з формуванням тіоефірного зв'язку між С-кінцем убіквітину і E1. На другому етапі активований убіквітин зв'язується з тіоловою групою ферменту-переносчика E2, який може безпосередньо каталізувати ковалентне приєднання убіквітину до білка-мішені або передавати активований убіквітин лігазі E3. На третьому етапі процесу убіквітинування утворюється ізопептидний зв'язок між С-кінцевим залишком гліцину убіквітину і ϵ -аміногрупою залишку лізину білка-мішені. Дана реакція каталізується убіквітин-лігазою E3. Після взаємодії з убіквітином білки-мішені піддаються деградації протеасомою [58]. Оскільки кожен E3 розпізнає специфічні білки, призначені для руйнування, існує більше 1000 E3 лігаз, що робить цей крок основним механізмом, який забезпечує специфічність до білкових субстратів.

Деградація субстрату відбувається в 26s протеасомі, яка складається більш ніж з 60 субодинаць, що робить комплекс в 50-100 разів більшим, в порівнянні з позаклітинними протеазами. 19s-регуляторні частини 26s протеасоми містять більше 19 субодинаць, які володіють різними властивостями, включаючи здатність розпізнавати ланцюг поліубіквітину, пов'язаного з білками. Після розпізнавання 19s розщеплюють поліубіквітинований ланцюг білка субстрату і розгортають приречений білок. Цей крок дає можливість перенесення субстрату в частку 20s для деградації білка. Події, що відбуваються в частинках 19s, залежать від АТФ [78].

Протеасома 20s являє собою циліндр, що складається з чотирьох кілець, кожне з яких містить сім окремих, але пов'язаних субодиниць; три β субодиниці, що містять протеолітичні сайти, розташовані на внутрішній поверхні циліндра. Функція інших зовнішніх α субодиниць частки 20s полягає в тому, щоб утворити пори, через які входять розкриті субстрати і виходять продукти протеолізу [73].

Використання інгібіторів активності протеасоми дозволило показати, що в клітинах ссавців більше половини всього внутрішньоклітинного білка піддається первинній деградації по убіквітин-залежному протеасомному шляху. Порушення в цій системі можуть бути причиною розвитку багатьох захворювань людини. Серед них: різні форми м'язової дистрофії, чоловіча стерильність, деякі форми злоякісного переродження, нейродегенеративні захворювання, порушення імунної і запальної відповіді, вірусні та бактеріальні інфекції [58].

Багато білки можуть розщеплюватися 20s протеасомою АТФ-незалежним способом і без попереднього убіквітинування. Однією з основних структурних передумов убіквітин-незалежної протеасомної деградації є наявність неструктурованих областей в амінокислотних послідовностях білків, які і забезпечують взаємодію з протеасома. Оскільки на частку 26s протеасом припадає лише 30%, а в клітинах ссавців велика частина протеасом знаходиться в вигляді 20s комплексів, очевидно, що убіквітин-незалежний протеоліз, здійснюваний 20s протеасомою, являє собою закономірний процес видалення з клітини пошкоджених білків [78].

Крім убіквітину компонентами системи контролю якості клітинного протеому являються шаперони. Вони переважно є білками теплового шоку (heat shock proteins, Hsp), що належать до наступних високонсервативних родин: АТФ залежні білки Hsp100, Hsp90, Hsp70 та Hsp60, а також АТФ незалежні малі білки теплового шоку (small Hsp, sHsp) [79].

Система шаперонів в комплексі з механізмом убіквітин-протеасомної деградації контролює гідроліз і елімінацію неправильно згорнутих або посттрансляційних пошкоджених білків. Шаперони, розгортаючи білкову глобулу невірно згорнутого або модифікованого білка, дають йому ще одну можливість згорнутися правильно і, якщо це не відбувається, даний білок маркується убіквітином та піддається протеолізу 26s протеасомою [79].

Крім цього, шаперони приймають участь у доставці білків в лізосоми для подальшої їх деградації. Таким чином доставляються цитоплазматичні та ядерні білки. Перш ніж зв'язати білок-мішень, шаперони утворюють складний комплекс, до складу якого входять шаперони з різною молекулярною масою. Основний шаперон в комплексі - Hsp70. Він розпізнає субстратний білок та забезпечує його підготовку для протеолізу. Шаперон Hsp40 стимулює АТФазну активність Hsp70. Шаперон hsp стимулює взаємодію шаперонів Hsp70 і Hsp40. Шаперон Hsp90 також бере участь в розпізнаванні субстратного білка і перешкоджає агрегації субстратних білків. Шаперон hsp забезпечує взаємодію між шаперонами Hsp70 і Hsp90. Шаперон bag-1 має кілька різних ізоформ, які регулюють активність шаперона Hsp70. Крім перерахованих білків в комплекс шаперонів можуть входити додаткові шаперони або шапероніти. Комплекс шаперонів пов'язує субстратний білок і доставляє його з цитоплазми до мембрани лізосоми. Потім він передає субстратний білок трансмембранному білку (lysosome-associated membrane protein type 2a), локалізованому на мембрані лізосоми. Після цього білок піддається лізосомальному протеолізу. Доставка білків в лізосоми за участю шаперонів з подальшим їх протеолізом починається тоді, коли всі інші шляхи протеолізу вже ускладнені в результаті виснаження клітини [58].

Отже, протеоліз є особливою формою фізіологічної регуляції, а підтримання гомеостазу білків є критичним фактором у запобіганні клітинної дисфункції за патологічних станів.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1 Реактиви та обладнання

В роботі використовували наступні реактиви: акриламід, N,N'-метилен-біс-акриламід, персульфат амонію, TEMED (N,N,N',N'-тетраметилен-1,2-діамін) (GEHealthcareAB, Швеція), 1-хлор-2,4-динітробензол, глутатіон відновлений та окиснений, ортофталевий альдегід, нітросиній тетразолій (НСТ), феназінметасульфат, метанол, NERES, ЕДТА, НАДФН, АТФ, натрію додецилсульфат, кумасі блакитний R-250, TEMED, Твін-20, тритон X-100, БСА, білкові маркети молекулярної маси для електрофорезу, а також реактиви (солі, кислоти, луги) були вітчизняного виробництва кваліфікації не нижче ч.д.а.

При виконанні роботи використано прилади і обладнання таких марок та виробників: центрифуги CM-6M «ELMI», Allegra 64R «BeckmanCoulter», спектрофотометр Bioblock «SynergyHT», мікроскоп PrimoStar «Zeiss», автоматичні піпетки та дозатори «Humapette», апарат для препаративного диск-електорофорезу «BioRad».

Біохімічний аналізатор «Humalyser 3000», набір для фотометричного колориметричного визначення концентрації Albuminliqicolor (HumanhumanGmBh- 65205 wiesbaden). Виготовлені в Germany human diagnostics worldwide.Total Proteine liqicolor, Urea liqicolor, Creatinine liqicolor, GPT (ALAT) IFCC mod .liquiUV Humazym Test, COT (ASAT).IFCC mod. liquiUV Humazym Test, Sodium-rapid (Na⁺), Potassium liquirapid (K⁺), Chloride liqicolor (Cl⁻), Human human GmBh- 65205 wiesbaden).

Магнітні мішалки, піпетки автоматичні, термостати, шейкери та ін. є продукцією фірм, що працюють згідно стандарту ISO 9001. Пластиковий лабораторний посуд (планшети для імуноферментного аналізу, планшети з

несорбуючою поверхнею, епендорфи, пробірки та інше) отримано від фірми Sente-Lab. Скляний лабораторний посуд (колби, стакани, пробірки, циліндри та інше) фірми Simax.

2.2. Дотримання положень про гуманне ставлення до тварин

У роботі дотримувалися міжнародних рекомендацій Європейської конвенції щодо проведення медично-біологічних досліджень з використанням тварин, які використовуються в експериментальних дослідженнях та інших наукових цілях (Закон України від 21.02.2006 № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження») та погоджені біоетичною комісією ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка протокол № 3 від 10 березня 2015 року.

2.3. Умови проведення експерименту

Дослідження проводили на білих статевонезрілих щурах (самках) лінії Вістар масою 90-110 г. Протягом експерименту тварини утримувались на стандартному раціоні віварію з вільним доступом до їжі та води. Тваринам експериментально моделювали кислотний опік стравоходу розчином 30% трихлороцетової кислоти (CCl_3COOH). Для цього вводили зонд у стравохід на глибину 4 см від верхніх різців щура та повільно вводили 0,2 мл 30% CCl_3COOH , таким чином відтворюючи II ступінь опіку. Контрольним щурам одноразово перорально вводили відповідний об'єм води для ін'єкцій [81]. Тварин виводили з експерименту на 1, 7, 15 та 21 добу від моменту введення CCl_3COOH /вода. Вибір термінів дослідження обумовлений розвитком патоморфологічних процесів за хімічних опіків стравоходу (Ванцян Э.Н, Тошакон Р.А, 1971) [82].

2.4. Отримання сироватки крові

Сироватку крові ссавців отримували з цільної крові без використання антикоагулянту. Кров залишали при 37°C на 4 години, потім чистою сухою скляною паличкою обережно відділяли згусток крові від стінок пробірки для пришвидшення отримання сироватки і центрифугували протягом 40 хв. при 2000 g. Отриманий супернатант (сироватку) швидко відокремлювали від формених елементів крові, переносили епендорфи та заморожували при -20°C до подальшого використання [83].

2.5. Отримання плазми крові

Плазму крові щурів отримували з цільної крові з використанням 3,8% цитрату натрію в якості антикоагулянта. Обережно перемішували та центрифугували при 2000 g протягом 30хв при +4-6°C. Отриманий супернатант (плазму) швидко відбирали та заморожували при -20°C до подальшого використання. При розморожуванні аліквоту плазми поміщали на бодяну баню за температури 37°C [84].

2.6. Отримання слизової оболонки стравоходу

Вилученим стравохід розрізали та промивали фізіологічним розчином. Верхній шар клітин зішкрібали та переносили до 3 мл буферу для тканин 10мМ трис HCl (pH7.4) з вмістом 0,2М сахарози та 1мМ ЕДТА. В скляному гомогенізаторі Поттера із тефлоновим поршнем готували 10% гомогенат та центрифугували його при 2000 g 25 хв. Отриманий супернатант швидко відбирали та заморожували при -20°C до подальшого використання.

Усі маніпуляції, пов'язані із забором матеріалу та приготуванням гомогенатів тканини, здійснювались при температурі від 0 до +4°C.

2.7. Визначення концентрації білка за методом Бредфорд.

Визначення концентрації білка проводили згідно з стандартною методикою [85], з деякими модифікаціями. Досліджуваний зразок об'ємом 20 мкл вносили пробірку, додавали 200 мкл реактиву Бредфорд. Інтенсивність забарвлення, яке утворювалось через 2-5 хв, вимірювали при довжині хвилі 595 нм проти контролю, який замість проби містив дистильовану воду.

Концентрацію білка у досліджуваному зразку визначали за калібрувальним графіком і виражали у мг/мл.

2.8. Гістологічні методи дослідження

Виготовлення парафінових зрізів стравоходу [86]. Зразки тканин стравоходу фіксували у 10% забуференому формаліні протягом 2 діб. Після фіксації тканини ретельно промивали проточною водою протягом 2 год та дистильованою водою протягом 10 хв. Проводили через спирти зростаючої концентрації, щоб довести до хлороформу:

1. 70% спирт дві зміни протягом 2 год.;
2. 80% спирт протягом 2 год.;
3. 90% спирт протягом 2 год.;
4. 96% спирт протягом 1,5 год.;
5. Абсолютний спирт 100% EtOH, протягом 1,5 год.

Переносили зразки тканин стравоходу у суміш 96% спирту з хлороформом у співвідношенні 1:1 на 1 год, потім у хлороформ, замінюючи розчин двічі по 20 хв. Витримували отримані зразки тканин у суміші

хлороформу з парафіном (дві зміни по 30 хв. кожна, при +37°C). На наступному етапі зразки тканин стравоходу переносили безпосередньо у парафін на 30 хв., при +56°C. Після отриманні готових блоків їх розрізали на мікротомі із товщиною зрізів 5 – 7 мкм.

Забарвлення зрізів стравоходу проводили за стандартною методикою фарбування гематоксилін-еозином. Спочатку депарафінували зрізи та проводили по спиртах спадаючої концентрації до дистильованої води. Промивали в дистильованій воді та зафарбовували гематоксиліном Бемера протягом 3 - 5 хв. На наступному етапі промивали проточною та дистильованою водою. Зафарбовували еозином протягом 1 - 2 хв та швидко промивали в дистильованій воді. Зразки зневоднювали, проводячи по спиртах зростаючої концентрації. На останньому етапі зрізи просвітлювали бензолом (дві зміни по 3-5 хв.) та заключали в канадський бальзам.

2.9. Дослідження морфофункціонального стану клітин крові у щурів

Для дослідження клітин крові щурів забирали в пробірку з антикоагулянтом ЕДТА. Визначали такі показники крові, як кількість еритроцитів, концентрація гемоглобіну в крові, кількість лейкоцитів та загальна формула крові з використанням загальноприйнятих методів [87].

2.10. Визначення біохімічних параметрів сироватки крові

Визначення біохімічних показників в сироватці крові проводиться за допомогою біохімічного аналізатора Humalyser 3000 з використанням тест наборів [88].

2.10.1 Визначення загального білка сироватки крові

Для колориметричного фотометричного визначення концентрації загального білка біуретовим методом. Принцип методу: в лужному середовищі іони міді взаємодіють з білками з утворенням комплексу забарвленого у фіолетовий колір. Показник поглинання цього комплексу пропорційний концентрації білка в пробі. Вимірювання проводилися з довжиною хвилі 546 нм [88].

2.10.2 Визначення концентрації альбуміну

Для колориметричного визначення концентрації альбуміну використали метод з бромкрезоловим зеленим: бромкрезоловий зелений взаємодіє з альбуміном в середовищі цитратного буферу з утворенням забарвленого комплексу. Показник оптичного поглинання цього комплексу пропорційний концентрації альбуміну в розчині. Вимірювання проводилися за довжини хвилі 546 нм та часу інкубації 5 хв. Визначення проводили проти бланк-реагенту; для кожної серії визначень використовувався один бланк-реагент [88].

2.10.3 Визначення концентрації сечовини

Сечовина гідролізується в присутності води та уреазі з утворенням амонію і вуглекислого газу. У присутності гіпохлориту і саліцилату розчин амонію забарвлюється в зелений колір (модифікована реакція Бертло). Показник поглинання зазначеного розчину при пропусканні монохроматичного світла з довжиною хвилі 578 нм пропорційний до значення концентрації сечовини у досліджуваному зразку. Час інкубації 5 хв.

Визначення проводилися проти бланк-реагенту, для кожної серії визначень використовувався один бланк-реагент [88].

2.10.4. Визначення концентрації креатиніну

Визначення концентрації креатиніну проводили кінетичним методом без депротейнізації. Принцип методу: в лужному розчині креатинін утворює з пікриною кислотою комплекс помаранчево-червоного забарвлення. Показник оптичного поглинання зазначеного комплексу пропорційний концентрації креатиніну в пробі. Вимірювання проводилися за довжини хвилі 490-510 нм. Визначення концентрації креатиніну проводили проти дистильованої води. Перед початком роботи нагрівали реагенти і кювети до +25 °С. Температура підтримувалась на сталому рівні ($\pm 0,5$ °С) протягом всього визначення [88].

2.10.5. Визначення концентрації іонів натрію

Фотометричне визначення концентрації натрію у сироватці крові проводили за допомогою Mg-уранілацетатного методу. Принцип методу: катіони натрію Na^+ преципітуються Mg-уранілацетатом. Іони уранілу, які не преципітують катіони натрію і залишаються в суспензії, утворюють жовто-коричневий комплекс з тіогліколевою кислотою. Різниця між бланк-реагентом (без преципітації натрію) і досліджуваною пробю пропорційна концентрації іонів натрію в пробі. Виміри проводились за довжини хвилі 405 нм, при температурі +20 - 25 °С. Визначення проводилось проти бланк-реагенту, для кожної серії визначень використовувалась одна проба бланк-реагенту [88].

2.10.6. Визначення концентрації іонів калію

Визначення концентрації K^+ проводилось використанням набору для фотометричного визначення концентрації зазначеного іону. Принцип методу: в безбілковому лужному середовищі катіони калію реагують з тетрафенілборатом натрію (ТРВ-Na) з утворенням дрібнодисперсної суспензії тетрафенілборона калію. Ступінь мутності цієї суспензії пропорційний концентрації калію в пробі. Вимірювання проводилися за довжини хвилі 578 нм, температури +20 - 25 °С та часом інкубації 15 – 30 хв. Визначення проводилось проти бланк-реагенту (робочий реагент), для кожної серії визначень використовувалась одна проба бланк-реагенту [88].

2.10.7. Визначення концентрації хлоридів

Визначення проводиться з використанням набору для колориметричного визначення концентрації хлоридів. Принцип методу: хлорид-іони реагують з комплексом меркурі-2,4,6-три-(2-піридил)-s-триазином (ТРТЗ) з утворенням хлориду двовалентної ртуті. ТРТЗ реагує з іонами двовалентного заліза з утворенням забарвленого в голубий колір комплексу. Збільшення показника оптичного поглинання комплексу при довжині хвилі 590 нм прямо пропорційне вмісту хлоридів у пробі. Визначення проводились проти бланк-реагенту для кожної серії визначень необхідна одна проба бланк-реагенту [88].

2.10.8. Визначення концентрації магнію

Визначення проводиться з використанням набору для визначення концентрації магнію. Принцип даного методу полягає в тому, що магній утворює забарвлений комплекс із ксилідиловим синім. Інтенсивність

забарвлення комплексу прямо пропорційна концентрації магнію в пробі. Проби ретельно змішували згідно з інструкцією до набору, інкубували 10 хв при температурі 20°C. Оптичну щільність визначали за довжини хвилі 530 нм. Визначення проводились проти бланк-реагенту для кожної серії визначень необхідна одна проба бланк-реагенту [88].

2.10.9. Визначення концентрації кальцію

Йони кальцію в лужному середовищі реагують з о-крезолфталеїном, утворюючи забарвлений комплекс. Оптична щільність комплексу пропорційна концентрації кальцію у пробі. Вимірювання проводили за довжини хвилі 570-580 нм та температури +20 - 25°C. Визначення проводились проти бланк-реагенту для кожної серії визначень необхідна одна проба бланк-реагенту [88].

2.10.10. Визначення активності аспаратамінотрансферази (АСТ)

Визначення проводиться з використанням набору для колориметричного визначення активності аспаратамінотрансферази. Вимірювання проводилися за довжини хвилі 340 нм, температури +20 - 25 °C та часу інкубації 15 – 30хв. Визначення проводилося проти води з інтервалом 1 хв [88].

2.10.11. Визначення активності аланінамінотрансферази (АЛТ)

Визначення з використанням набору для колориметричного визначення активності аланінамінотрансферази. Вимірювання проводилися за довжини хвилі 240 нм, температури +20 - 25 °C та часу інкубації 15–30хв. Визначення проводилося проти води з інтервалом 1 хв [88].

2.11. Визначення вмісту дієнових кон'югатів і шифових основ ненасичених жирних кислот

В колбі з притертою кришкою готували екстрагуючу суміш, до складу якої входили гептан та ізопропіловий спирт у співвідношенні 1:1. В щільно притертий скляний гомогенізатор Поттера-Ельвегейма додавали 100 мкг досліджуваного білка та 5 мл екстрагуючої суміші і розтирали поршнем (25 ходів). Далі утворену суміш переносили у конічну скляну пробірку з притертою пробкою для запобігання випаровування екстрагуючої фази та центрифугували при 150g протягом 15 хвилин. Надосадову рідину відбирали і додавали до неї 500 мкл дистильованої води. Після вортексування (дворазового збовтування) пробірок відбувається розшарування фаз гептану та ізопропілового спирту. В хімічні пробірки відбирали верхню гептанову фазу та визначали в ній вміст шифових основ на флуориметрі за умов $\lambda_{збуд}=360$ нм і $\lambda_{скаан}=420$ нм. В якості контролю використовували верхню гептанову фазу екстрагуючої суміші без білка. Далі для визначення дієнових кон'югатів з пробірок, в яких визначали шифові основи, відбирали в хімічні пробірки по 300 мкл екстрагуючої суміші та додавали 1,5 мл 96% етилового спирту [89]. Після вортексування пробірок на спектрофотометрі визначали вміст дієнових кон'югатів при $\lambda=233$ нм. Як оптичний контроль використовували гептанову фазу екстрагуючої суміші без білка з додаванням до неї 96% етилового спирту у співвідношенні 1:5.

2.12. Визначення вмісту ТБК-активних продуктів

При температурі кипіння у кислому середовищі малоновий діальдегід реагує з 2-тіобарбітуровою кислотою, утворюючи при цьому забарвлений триметиновий комплекс з максимумом поглинання при $\lambda=532$ нм.

Отриманий біологічний матеріал у кількості 100 мкл (концентрація білка - 5 мг на мл) інкубували при 37° С на водяній бані у пробірках з притертими пробками протягом 30 хвилин у 400 мкл середовища, яке містило наступні компоненти: 0,25 М трис-НСl, 0,175 М КСl (рН=7,4). Реакцію зупиняли додаванням до суміші 200 мкл 17% ТХО, в контрольну пробірку, яка містить 500 мкл трис-буферу, та в пробірки для визначення вмісту МДА кислота додається перед інкубацією. Після осадження білків проводили центрифугування проб при 150g протягом 15 хвилин. Супернатант відбирали у кількості 500 мкл і додавали 250 мкл 0,8% тіобарбітурової кислоти. Після вортексування проби інкубували у киплячій водяній бані в пробірках з притертими пробками протягом 10 хвилин для розвитку забарвлення. Вміст МДА визначали на спектрофотометрі при $\lambda=532$ нм [89].

2.13. Визначення активності супероксиддисмутази

Для визначення активності супероксиддисмутази (СОД) в хімічну пробірку вносили 500 мкг білка проби в 500 мкл 0,15 М фосфатного буфера (рН=7,8) та додавали 1 мл реагенту 1, який містив: 50 мл 0,15 М фосфатного буфера, 3,1 мг ЕДТА, 25 мг нітросинього тетразолію та 11,5 мг феназінметасульфату; в контрольну пробу замість білка додавали 500 мкл 0,15 М фосфатного буфера. Після вортексування вимірювали оптичну щільність при довжині хвилі 540 нм. Далі до пробірок додавали реагент 2, який містив: 10 мл трис-ЕДТА буфер (рН=8,0) та 7,63 мг НАДН; та повторювали процедуру вимірювання екстинкції через 10 хвилин за тих же умов. Активність ферменту визначали за формулою:

$$\frac{E_2 - E_1}{E_2} * 100\% = \text{відсоток блокування реакції відновлення НСТ, де}$$

E_1 – екстинкція до додавання реагенту 2,

E_2 – екстинкція після додавання реагенту 2 [90].

2.14. Визначення активності каталази

Принцип методу визначення активності каталази заснований на здатності пероксиду водню утворювати з солями молібдену стійкий забарвлений комплекс.

Реакцію починали додаванням 100 мкл біологічного матеріалу (100 мкг білка проби у 0,05 М трис-НСІ-буфері (рН=7,8)) до 2 мл 0,03% розчинного пероксиду водню. В холосту пробу замість білка додавали 100 мкл дистильованої Н₂О. Реакцію зупиняли через 10 хвилин додаванням 1 мл 4% молібдату амонію. Інтенсивність забарвлення вимірювали на спектрофотометрі при $\lambda=410$ нм проти контролю, в якій замість пероксиду водню додавали 2 мл дистильованої Н₂О.

Активність каталази розраховують за формулою:

$$E=(A_{\text{хол}} - A_{\text{дос}})/V*t*K, \text{ де}$$

E – активність каталази, $A_{\text{хол}}$ і $A_{\text{дос}}$ - екстинція холостої та дослідної проб, V – об'єм проби, t – час інкубації 600 с, K – коефіцієнт мілімолярної екстинкції пероксиду водню, що дорівнює $22,2*10^3 \text{ мМ}^{-1} * \text{см}^{-1}$ [91].

2.15. Визначення концентрації SH-груп

Для дослідження концентрації сульфгідрильних груп застосовували метод, який полягає в тому, що при взаємодії вільних SH-груп з реактивом Елмана (5,5'-дітіобіснітро-бензойною кислотою) при рН 8,0 відбувається утворення тіонітрофенільного аніона, концентрація якого прямопропорційна кількості SH-груп [92]. Визначення концентрації SH-груп проводили спектрофотометрично з врахуванням коефіцієнта молярної екстинкції тіонітрофенільного аніону, який при довжині хвилі 412 нм дорівнює $1,14 * 10^4 \text{ М}^{-1} \text{ см}^{-1}$.

2.16. Метод визначення вмісту відновленого та окисненого глутатіону.

Визначення кількості відновленого (GSH) та окисненого (GSSG) глутатіону визначали спектрофлюориметричним методом з використанням ортофталевого альдегіду (OPT) [93]. За даним методом утворюються високофлуоресцентні продукти, які активуються при 350 нм і мають чітко виражений пік при 420 нм. Реактив OPT готували перед дослідом у концентрації 1 мг/мл в метанолі.

Для визначення відновленого глутатіону до 100 мкл проби додавали 1,8 мл 0,1 М фосфатного буферу, який містив 0,1 М $\text{Na}_3\text{PO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$, 5 мМ ЕДТА, рН 8; 100 мкл ортофталевого альдегіду. Для визначення концентрації окисненого глутатіону використовували N-етилмалеїмід –блокатор окиснення GSH. Реакційна суміш містила 100 мкл проби, 1,8 мл 0,1N NaOH та 100 мкл OPT. Після 15-хвилинної інкубації при кімнатній температурі міряли інтенсивність флуоресценції при 420 нм за активації 350 нм на спектрофлюориметрі RF-1501 японської фірми Shimadzu.

2.17. Визначення глутатіонпероксидазної активності

Активність глутатіонпероксидази визначали за Разыграев А. [94]. Активність даного ферменту визначали по зменшенню вмісту GSH в реакції з 5,5'-дитіобіс(2-нітробензойною) кислотою (ДТНБ). До 90 мкл проби додавали 890 мкл реагенту 1 (який містив GSH, азид натрію та 0,05 М трис-НСІ буфер з 5 мМ ЕДТА) та 20 мкл пероксиду водню. Зупиняли реакцію додаванням 115 мкл 50% ТХО. Після центрифугування при 1000g 15 хв відбирали 200 мкл надосаду у пробірки з 0,1 М трис-НСІ буфером, рН 8,5. Через 7,5 хв після додавання ДТНБ (4 мг/мл) визначали екстинцію при довжині хвилі 412 нм.

Контроль замість проби містив 0,15 М фосфатний буфер. Стандарт замість проби містив 0,15 М фосфатний буфер та ТХО додавали відразу після внесення пероксиду водню. Активність ферменту виражали в мікромолях відновленого глутатіону на 1 г білка за хв за формулою:

$$A = (E_k - E_d) * 14,776 / E_{st} * c$$

E_k – екстинція контрольної проби;

E_d – екстинція дослідної проби;

E_{st} – екстинція стандарту

c - кількість білку у досліджуваній пробі, мг;

14,776 – коефіцієнт перерахунку, який включає в себе: розрахунок в мкмольях GSH, розведення проби та розрахунок за хв).

2.18. Визначення глутатіонтрансферазної активності

Активність глутатіонтрансферази визначали за швидкістю утворення кон'югату з 1-хлор-2,4-динітробензолом (ХДНБ), який характеризується максимумом поглинання при 346 нм [95].

Для визначення активності глутатіонтрансферази готували суміш: 1,5 мл 0,1 М фосфатного буферу (рН 6,5), 0,2 мл 10 мМ відновленого глутатіону (GSH), 0,1 мл супернатанту. Реакцію починали додаванням 0,02 мл 0,1 М ХДНБ. Приріст оптичної густини реєстрували протягом 3 – 5 хв при 340 нм на СФ-6305 і виражали в наномольях глутатіонового кон'югату на 1 г білка за хв.

Активність ферменту розраховували за формулою:

$$A = \Delta E * V * 1000 / 9,6 * a * t, \text{ де}$$

ΔE – зміна оптичної густини за час t ;

V – кінцевий об'єм в кюветі після додавання останнього компонента, мл;

1000 – коефіцієнт перерахунку мікромолей в наномолі;

9,6 – коефіцієнт екстинкції мілімолярного поглинання кон'югату, $\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$;

t – час інкубації, хв.

2.19. Визначення глутатіонредуктазної активності

Активність глутатіонредуктази визначали за Власовою та ін. [95], з модифікацією для вимірювання в мікрокуветі, із загальним об'ємом реакційної суміші 535мкл. Визначення активності ферменту проводили зменшенню вмісту НАДФН. До складу реакційної суміші входили 350 мкл фосфатного буферу (0,05 М рН 8,0); 35 мкл 1 мМ ЕДТА, 50 мкл 7,5 мМ GSSG; 50 мкл проби; 50 мкл 1,2 мМ НАДФН. Активність ферменту визначали по зниженню НАДФН при $+37^{\circ}\text{C}$ протягом 8 хв, при довжині хвилі 340 нм. Активність виражали в наномолях НАДФН на 1 мг білка за хв по формулі:

$$A = \Delta E_6 \cdot V / 6,22 \cdot a \cdot t, \text{ де}$$

ΔE_6 – різниця оптичної густини між першою та останньою хвилиною замірів;

V – загальний об'єм проби, мл;

6,22 – оптична густина 1 мкмоля НАДФН в 1 мл при $\lambda=340$ нм;

a – кількість білка, мг в мл проби;

t – час інкубації, хв.

2.20. Визначення кількості молекул середньої молекулярної маси

Вміст молекул низької та середньої молекулярної маси визначали за Габриелян [96] з модифікаціями. Метод базується на осадженні високомолекулярних пептидів і білків біологічних рідин за допомогою

трихлороцтової кислоти і кількісним визначенням середньомолекулярних пептидів.

У центрифужні пробірки вносили 1 мл сироватки (клітинного лізату) та 0,5 мл розчину трихлороцтової кислоти (100 г/л), перемішували та центрифугували протягом 30 хв. при 3000 g. Відбирали 0,5 мл супернатанту і переносили в пробірки з 4,5 мл дистильованої води. Оптичну щільність визначали при довжині хвилі 254 нм. Вміст молекул середньої маси виражали в ум.од./мг білка. Кількість олігопептидів у складі молекул середньої маси оцінювалося за рівнем білка в супернатанті та виражали в мкг/мг білка [97].

2.21. Електрофорез в поліакриламідному гелі

Електрофорез проводили у поліакриламідному гелі (ПААГ) у присутності додецилсульфат натрію (ДСН) за методом Леммлі [98]. Електрофорез проводили у апараті для вертикального препаративного диск-електорофорезу (BioRad) у скляних пластинах завтовшки 1 мм. У якості розділяючого гелю використовували 12% ПААГ, концентруючого – 4% ПААГ. Електродний буфер, що використовувався, містив тріс – 0,025 М, гліцин – 0,192 М та ДСН – 0,1%. Концентрування зразків у верхньому гелі відбувалось протягом години при силі струму 10 мА, розділення білкових фракцій проводили при силі струму 20 мА впродовж 2,5 годин.

Фарбування розділених білків здійснювали протягом 30 хв. при кімнатній температурі у розчині, що містив 0,2% Кумассі діамантовий синій G250, 33,3% етанол, 3,3% оцтову кислоту. Для знебарвлення гелі витримували у розчині 0,8% оцтової кислоти впродовж однієї години при кімнатній температурі. За допомогою цифрової камери отримані гелі переводили у електронний формат. Кількісну характеристику електрофореграм проводили з використанням програми TotalLab 2.01.

2.22. Визначення протеасомної активності.

Активність протеасом визначали методом розщеплення флюорогенних пептидів [99]. Каспазоподібна (КП) та хімотрипсиноподібна (ХТП) активності були визначені з використанням в якості субстратів пептидів Z-LLE-AMC та Suc-LLVY-AMC, відповідно.

Заморожену тканину стравоходу гомогенізували в охолодженому 50 мМ HEPES-буфері (рН 7,5), який містив 1 мМ дитіотреїтола, 5 мМ MgCl₂, 20 мМ KCl (1:3) та центрифугували 10 тис. g протягом 30 хв при +4 °С. Супернатант використовували для визначення активності протеасом.

Для визначення активності 26s протеасомної активності: до 200 мкл HEPES-буферу додавали 20 мкл супернатанту та 10 мкл АТФ до кінцевої концентрації 28 мкМ для визначення ХТП активності або 14 мкМ для визначення КП активності. Для визначення 20s протеасомної активності замість АТФ додавали відповідний об'єм буферу. Для підтвердження специфічності протеасомного гідролізу використовували специфічні інгібітори протеасоми: класто-лактацистин бета-лактон у концентрації 5 мкМ та MG 132 у концентрації 5 мкМ. Реакцію запускали додаванням 10 мкл відповідного субстрату до кінцевої концентрації 18 мкМ для визначення ХТП та 45 мкМ для КП активності. Проби інкубували при температурі 37⁰С протягом 30 хв. Визначення інтенсивності флуорисценції проб проводили на спектрофлуориметрі (мікропланшетному рідері) μQuant™ (BioTek, USA) з програмним забезпеченням Gen5 при довжині хвилі збудження 350 нм та емісії – 440 нм.

2.23. Визначення вмісту циркулюючих імунних комплексів.

Вміст циркулюючих імунних комплексів (ЦІК) у сироватці крові

визначали методом преципітації у 4,5% розчині поліетиленгліколя–6000 (ПЕГ–6000). При цьому осаджувались імунні комплекси 11–19s. Для визначення ЦК 0,2 мл сироватки розводили у 3 рази 0,1 М боратним буфером. Після чого по 0,2 мл отриманої суміші переносили у 2 мл 0,1 М боратного буфера і у 2 мл 4,5% розчину ПЕГ–6000. Додатковий контроль з ПЕГ–6000 не ставили, оскільки він суттєво не впливає на світлорозсіювання. Після ресуспендування проби інкубували при +18–20°C протягом 2 годин. Результати реакції визначали фотометрично за допомогою імуноферментного аналізатора (Titertek Multiskan, Фінляндія) при довжині хвилі 450 нм. [100].

2.24. Визначення активності α_1 -антитрипсину та α_2 -мактропоглобуліну

Активність α_1 -антитрипсину та α_2 -мактропоглобуліну у сироватці крові визначали уніфікованим спектрофотометричним методом по гальмуванню гідролізу N-бензоїл-L-аргінін- етилового ефіру (БАЕЕ) [101].

Для визначення α_2 -МГ у кювету спектрофотометра вносили 1,8мл трис-НСІ-буферу(рН 8,0), 0,1 мл розведеної у 10 раз сироватки крові та 50 мкг трипсину у водному розчині об'ємом 0,05 мл. Обережно перемішували та інкубували 5хв. при кімнатній температурі. Після чого додавали 1мл 1,5мл розчину БАЕЕ. Приріст оптичної щільності вимірювали при довжині хвилі 253 нм протягом 10хв. Активність α_2 -МГ визначали за формулою:

$$X \text{ (ІО/мл)} = \frac{\Delta D_{253} * 2,73 * 10}{0,1 * 10}, \text{ де}$$

ΔD_{253} – приріст оптичної щільності в пробі; 2,73 – розрахунковий коефіцієнт; 10 – час реакції; 0,1 – кількість сироватки; 10 – фактор розведення.

Для визначення активності α_1 -АТ в кюветах спектрофотометра готували дві проби – дослідну і холосту. Дослідна проба містила 1,8мл 0,05М трис-НСІ-буфері (рН 8,0) 0,1 мл розведеної в 50 раз сироватки крові та 10 мкг трипсину у водному розчину об'ємом 0,1 мл. Холоста була аналогічного складу і об'єму,

без вмісту сироватки. Проби витримували у кюветах спектрофотометра протягом 5 хв при +25°C. В кожен пробу додавали по 1мл розчину БАЕЕ; обережно змішували та вимірювали оптичну щільність при довжині хвилі 253нм проти холостої проби. Вимірювання проводили кожну хвилину протягом 4-5хв. З лінійної ділянки графіка, побудованого на основі даних реакції знаходили приріст оптичної щільності за 1 хв для дослідної та холостої проб. Різниця між цими величинами була використана для обчислення активності α_1 -АТ згідно формули:

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

V_0 і V_1 - швидкість гідролізу БАЕЕ трипсином у контрольній та дослідній пробі, відповідно, дорівнює приросту оптичної щільності ΔD_{253} за 1хв; 2,73 - коефіцієнт для обчислення кількості БАЕЕ, гідролізованого за 1 хв при даних умовах (у мкмольях). отриманий з різниці оптичної щільності 1мМ розчину БАЕЕ, рівної 1,1 і обсягу проби 3мл (3 / 1,1); 0,1 – кількість сироватки крові, взятої для аналізу (в мл); 50 - розведення.

Активність α_1 -АТ і α_2 -МГ виражали числом умовних інгібуючих одиниць (ІО) в 1мл сироватки крові. За 1 ІО приймали таку кількість сироватки крові, яка гальмувала α_1 -АТ або зв'язувала α_2 -МГ активності трипсину, так як розщеплює 1мкмоль БАЕЕ за 1хв.

2.25. Визначення загальної протеолітичної активності та активності метало- і серинових протеїназ.

Загальну активність протеїназ у зразках аналізували методом визначення казеїнолітичної активності з модифікаціями. 30 мкл плазми та 500 мкл готогенату стравоходу доводили 0,05 М (рН 7.4) фосфатним буфером до об'єму 1 мл [102]. Перемішували та додавали 1 мл 4% казеїну. Далі інкубували протягом 30 хв.на водяній бані при 37°C. Реакцію зупиняли внескнням 3 мл

15% ТХО з наступним центрифугуванням при 2000 g протягом 30 хв. Надосадову рідину відбирали та визначали оптичну густину при довжині хвилі 280 нм. Контрольний зразок містив суміш казеїну, фосфатного буфера та ТХО.

Казеїнолітичні одиниці обчислюються за формулою:

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

Для приготування 4% казеїну наважку реактиву масою 4 грами розчиняли в 80 мл 0,05 М фосфатного буфера рН 7.4 і 1,6 мл 1М NaOH. Суміш залишити при кімнатній температурі на 40 хв. для набухання та кип'ятили 15 хвилин на водяній бані. Після охолодження, рН розчину казеїну доводили до 7,4 1 М NaOH та доводили об'єм до 100 мл фосфатним буфером.

Для селективного визначення активності метало- та серинових протеїназ до реакційної суміші додавали до кінцевої концентрації 0,2М етилендіамінтетраацетату (ЕДТА) або 0,2М (ФМСФ) фенілметил сульфоніл флуориду, відповідно.

2.26. Імуноферментний аналіз.

Метод імуноферментного аналізу проводили відповідно до стандартного протоколу з певними модифікаціями [103]. За даним методом визначали вміст MMP, TIMP-1, bFGF, Ig G, про- і протизапальних цитокінів та вміст шаперонів. Досліджувані зразки слизової оболонки стравоходу (10мкг/мл в 50 мМ Трис-HCl буфері (рН 7,4)) об'ємом 100 мкл інкубували в 96-лункового планшету протягом ночі при +4°C. Для блокування неспецифічних ділянок зв'язування після відмивання інкубували з 5% знежиреним молоком протягом години при +37°C. Наступним етапом було відмивання 0,05 М трис-HCl буфером з твін-20 та 0,05 М трис-HCl буфером двічі. Після додавання первинних антитіл певної специфічності інкубували 1 годину при +37°C. Після додавання відповідних вторинних антитіл інкубували протягом години за тих

же умов. Після кожного із зазначених етапів проводили відмивку 0,05 М трис-НСІ буфером з 0,1% твіном-20 двічі. Як субстрат пероксидазної реакції, у роботі використовували *o*-фенілендіамін / пероксид водню (Sigma, США). Вимірювання проводили при довжині хвилі 492 нм.

2.27. Статистична обробка результатів

Статистичну обробку результатів проводили, використовуючи методи математичної статистики із застосуванням пакетів прикладних програм Statistica 6.0, Microsoft Excel 2010. Для кожного отриманого результату визначали показники середнього арифметичного (M) і стандартної похибки середнього арифметичного (m) [104].

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1 Особливості функціонування організму щурів за кислотного опіку стравоходу

Опіки продовжують залишатися однією з найбільш актуальних і соціально важливих проблем дитячого травматизму. За даними спеціалізованих відділень України, дитячий опіковий травматизм за останні роки знизився, проте приблизно один з 128-133 випадків закінчується фатально [105]. Основною причиною смерті продовжує залишатися опіковий сепсис, що супроводжується поліорганною недостатністю.

Хімічні речовини, які діти іноді вживають, приймаючи їх за харчові продукти, викликають опік стравоходу. Тяжкість місцевих уражень залежить від хімічної природи і концентрації випитої рідини. Прояви, діагностика та лікування опіків стравоходу у дітей мають прямий зв'язок з патоморфологічними змінами, які відбуваються при ураженні стравоходу, їх глибиною і протяжністю. Найбільші труднощі зустрічають при лікуванні опіків стравоходу, коли навіть при правильно проведеному лікуванні не вдається уникнути рубцевого стенозу стравоходу [106].

Питання патогенезу, діагностики, лікування опікової травми та патологічного рубцювання активно обговорюється вченими різних країн, але єдиної думки щодо вирішення проблеми не існує.

Для відтворення хімічного опіку стравоходу (ХОС) було обрано трихлороцетову кислоту. Оскільки частина побутових засобів, які викликають хімічні пошкодження стравоходу дітей, є кислотомісними.

Трихлороцетова кислота є галогенованим аналогом оцетової кислоти. Вона використовується у сільському господарстві, у промисловості, у косметології та медицині. У побуті дана кислота використовується у рідинах для очищення поверхонь від жиру та входить до складу плямовивідників.

Трихлороцетова кислота в крові частково зв'язується білками плазми. З сечею спочатку виділяється вільна ТХО, а потім зв'язана кислота. [107]. Виявлення ТХО в сечі є також доказом отруєння трихлоретиленом [108].

На сьогодні існує цілий ряд експериментальних моделей ХОС, в яких використовували речовини, що здатні за своєю природою впливати на певні біохімічні параметри [109, 110, 111, 112, 113, 114]. Це значно ускладнює інтерпретацію та аналіз таких експериментальних результатів. Тому в наших дослідженнях було розроблено нову модель опіку, яку ми могли б використовувати для широкого спектру досліджень патогенезу опіків, особливо подібну до КОС у дітей віком від 1 до 8 років.

На рисунку 1 продемонстровано макрофотографії стравоходу контрольних щурів та щурів після кислотного опіку.

Нами було показано, що 30% CCl_3COOH проникає в тканину і призводить до значного ураження слизової оболонки стравоходу. Було виявлено набряк, гіперемію, пошкодження поверхневих шарів епітелію, крововиливи в підслизовий оболонці.

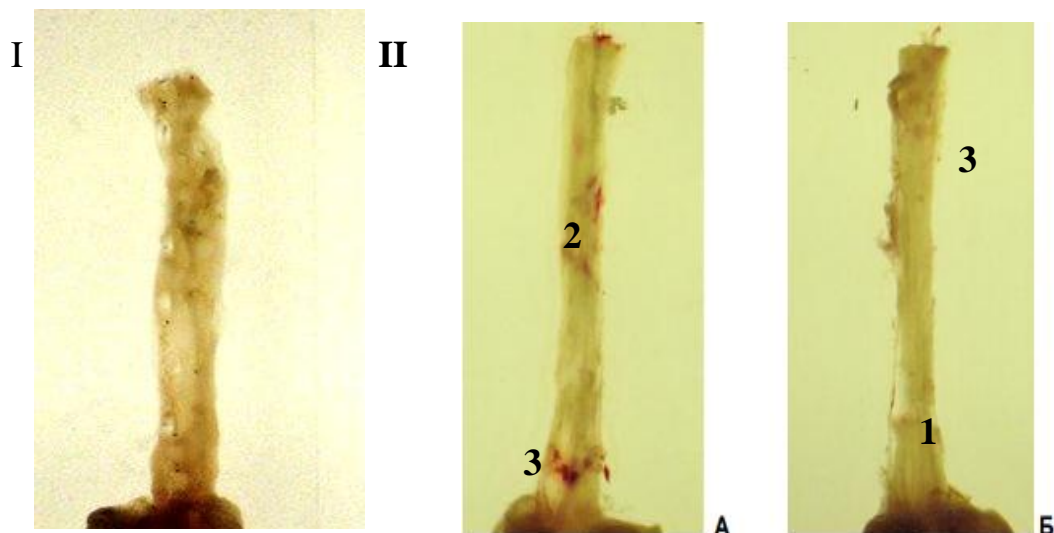


Рис.1. Макрофотографія стравоходу щурів: контроль (I) та за кислотного опіку (II:А-1 доба, Б – 21 доба)

1 – пошкодження поверхневих шарів епітелію;
2 – крововиливи; 3 – набряк.

Гістологічні дослідження (рис.2) за КОС свідчать про коагуляційний некроз тканин стравоходу (фібринозний ерозивний езофагіт).

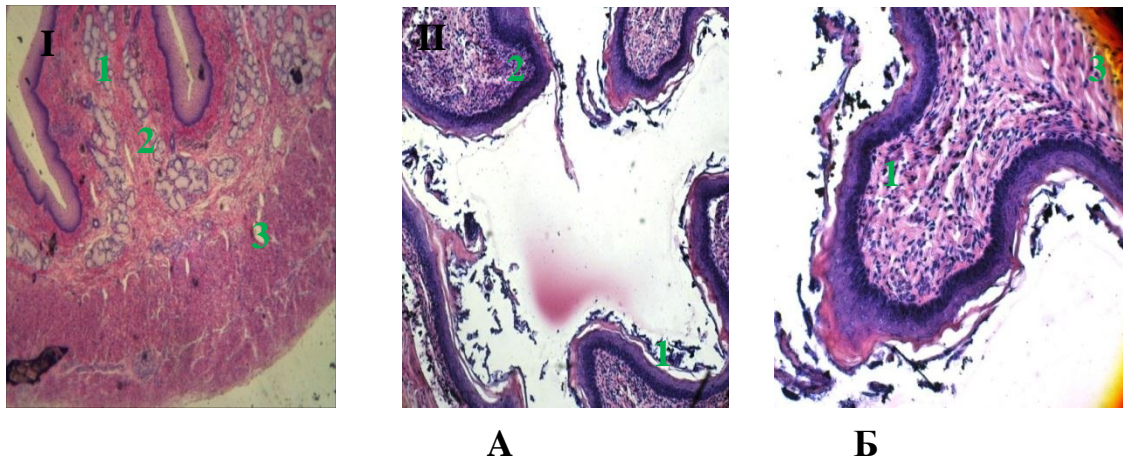


Рис. 2. Мікрофотографія стравоходу щурів: контроль (I) та за кислотного опіку (II: А- 1 доба, Б – 21 доба) Забарвлення гематоксилином і еозином. X 200.

- 1 - епітелій,
- 2. - власна пластинка слизової оболонки,
- 3. - м'язова пластинка слизової оболонки

При цьому пошкоджується слизова оболонка, а саме епітелій, власна пластинка слизової оболонки та м'язова пластинка слизової оболонки.

Порівняння виявлених уражень та досліджень статусу слизової оболонки стравоходу дітей із опіками 2-го ступеня визначили відповідність експериментальної моделі [82].

На 21 добу після опіку ознаки запалення збереглися, поряд з вираженою регенерацією слизової оболонки з'явилися ознаки фіброзу м'язової пластинки. Раневу поверхню (місце опіку) поступово заповнює нова, молода сполучна тканина (за рахунок міграції фібробластів в місце пошкодження). Через три тижні залишаються тільки волокна субстанції сполучної тканини, з яких може утворюватись рубець.

Одним з основних діагностичних критеріїв тяжкості КОС є визначення загально-клінічних показників сироватки крові, що корелює з функціональним

станом організму та ступенем метаболічних порушень за умов досліджуваної патології.

Нами були обрані такі показники крові, як рівень вільного гемоглобіну, еритроцитів, лейкоцитів, моноцитів, еозинофілів, базофілів, нейтрофілів (паличкоядерних та сегментоядерних) для оцінки ступеня метаболічних порушень за КОС [115].

Показано, що вміст гемоглобіну (табл.1) достовірно підвищувався у 1,2 рази на 7 добу після КОС. В наступні терміни дослідження ми спостерігали тенденцію до зниження даного показника. На 21 добу концентрація гемоглобіну була нижче контрольного рівня у 1,1 рази. При цьому вміст еритроцитів був знижений протягом всього експерименту, в середньому у 1,4–1,3 рази.

Таблиця 1

Загальноклінічні показники крові статевонезрілих щурів за умов моделювання кислотного опіку стравоходу ($M \pm m$, $n=10$)

	Контроль	1 доба	7 доба	15 доба	21 доба
Гемоглобін (Hb)(г/л)	148 ±1,32	155±0,03	178±0,01*	151±0,03	133±1,19*
Еритроцити (ER) (*10 ⁶ /мм ³)	7,12±0,11	5,1±0,05*	5,9±0,07*	5,6±0,06*	5,4±0,06*
Лейкоцити (WBC)(*10 ³ /мм ³)	1,3±0,12	5,1±0,05*	3,8±0,02*	6,2±0,07*	7,1±0,09*
Лімфоцити (%)	32,15±1,5	62,6±2,7*	31,5±1,4	59,4±2,6*	59,7±2,6*
Моноцити (МО) (%)	3,5±0,70	6,7±0,93*	13±0,65*	7,1±0,93*	6±0,084*
Еозинофіли (ЕО) (%)	2,1±0,38	1±0,05	0	1±0,05	1±0,05
Базофіли (ВА) (%)	0,25±0,08	0	0	0	0,33±0,09
Паличкоядерні нейтрофіли (%)	2±0,35	1,7±0,42	1,5±0,29	1,5±0,29	4±0,41*
Сегментоядерні нейтрофіли (%)	60,2±1,29	28±1,04*	54±1,20	31±1,11*	29±1,10*

* – $p < 0,05$ порівняно з контролем

Причинами підвищеного вмісту гемоглобіну можуть бути різні фактори. В першу чергу – це сигнал організму про дисфункцію деяких органів та систем. Однією із причин такого підвищення може бути зневоднення. При цьому підвищується густина крові, і масова доля гемоглобіну зростає по відношенню до загального її об'єму [116]. Зниження вмісту еритроцитів при підвищеному рівні гемоглобіну супроводжується порушеннями роботи шлунково-кишкового тракту, які викликані токсичною дією ТХО кислоти. На 21 добу після опіку у щурів вміст еритроцитів та гемоглобіну знизився. Поступово розвивається анемія. Анемія може виникнути як наслідок при прискореному розпаді еритроцитів, так і внаслідок кровотечі з великих кровоносних судин після відторгнення струпа за опікової хвороби [117].

Дослідження показників формули крові показали, що КОС викликав зміни в співвідношенні клітин крові (табл.1). Вміст лейкоцитів перевищував норму протягом усього дослідження. Лейкоцити це загальна назва цілого класу клітин. Класично їх ділять на зернисті (еозинофіли, базофіли та нейтрофіли) та незернисті (моноцити і лімфоцити). Кількість лімфоцитів була підвищена на 1, 15 та 21 доби після опіку. А на 7 добу спостерігали зниження даного показника до контрольного. Вміст моноцитів перевищував контроль протягом всього терміну дослідження. Кількість паличкоядерних нейтрофілів на початкових термінах знаходився в межах норми, а на 21 добу цей показник був вище контрольного у 2,1 раз, тоді як вміст сегментоядерних нейтрофілів був зниженим протягом майже всього дослідження.

Підвищення вмісту лейкоцитів на декілька тисяч одиниць свідчить на наявність у організмі запалення. Однією із причин такого підвищення є опіки з крововтратами [118]. Іншою причиною такого підвищення може бути вплив трихлороцтової кислоти (ТХО), а також вплив шоку, який виникає при цьому. В даному випадку лейкоцитоз не є небезпечним. Загрозу представляє опікова хвороба, на яку організм зреагував підвищенням рівня лейкоцитів.

Лімфоцити є головними клітинними елементами імунної системи. Їх функція полягає в розпізнаванні чужорідного антигену і участі в адекватній імунологічній відповіді організму. При абсолютному лімфоцитозі збільшується кількість і лейкоцитів, і лімфоцитів, в той час як відношення лімфоцитів до інших лейкоцитів може і не змінюватися. Причиною абсолютного лімфоцитозу можуть бути стрес, гостра та хронічна інтоксикація, бактеріальна інфекція за кислотного опіку [119].

Як відомо, моноцити остаточно знищують чужорідні клітини і білки, борються із запальними явищами, поглинають зруйновані тканини. Моноцити очищають і оновлюють кров. Оскільки при кислотному опіку руйнуються тканини і виникає запалення, то збільшення кількості моноцитів може бути компенсаторною відповіддю [118], особливо на 1, 7 та 15 доби. На 21 добу після КОС вміст моноцитів знизився, але він залишився вище контрольного рівня.

Причиною зменшення кількості нейтрофілів після опіку є руйнування тканин і розвиток запального процесу. Такі зміни пов'язують з швидким руйнуванням цих клітин та органічним або функціональним порушенням кровотворення у кістковому мозку або виснаженням організму під час захворювання [119]. В залежності від зрілості нейтрофілів, їх розділяють на мієлоцити, паличкоядерні та сегментоядерні нейтрофіли [118]. При тяжких захворюваннях сегментоядерні нейтрофіли гинуть першими, як більш зрілі. На 21 добу після КОС спостерігали збільшення числа паличкоядерних нейтрофілів на фоні зниження числа сегментоядерних нейтрофілів. Підвищення кількості нейтрофілів є відображенням своєрідного захисту організму від інфекцій та запалення. А нейтрофільоз з паличкоядерним зсувом є характерним для бактеріальних інфекцій, коли процес їх продукції відбувається майже безперервно [119].

Відомо, що опік стравоходу супроводжується тривалими порушеннями обміну вуглеводів, ліпідів та білків, що призводить до патологічних змін у

функціонування різних органів та систем [3]. Тому як діагностичний критерій важкості КОС ми визначали біохімічні параметри сироватки крові. Ми вибрали такі показники, які описують функціональний стан організму та оцінюють ступінь метаболічних розладів при вивченій патології.

У сироватці крові щурів ми визначили концентрацію загального білка та альбуміну (табл.2). Кислотний опік стравоходу викликав зниження вмісту загального білка у сироватці крові протягом усього досліджуваного періоду. Максимальне зниження було відмічено на 1 та 7 доби після опіку, у 1,3 рази відносно контрольного показника.

Таблиця 2.

Вміст загального білка та альбуміну у сироватці крові за умов моделювання кислотного опіку стравоходу статевонезрілих щурів (M±m, n=10)

	Контроль	1 доба	7 доба	15 доба	21 доба
Загальний білок (мг/мл)	1,8±0,11	1,35±0,15*	1,34±0,02*	1,44±0,011*	1,4±0,1*
Альбумін (мг/мл)	36,5±0,01	16,01±1,36*	21,22±2,01*	25,32±1,91*	25,5±1,01*

* – $p < 0,05$ порівняно з контролем

Вміст альбуміну у сироватці крові щурів за КОС також був знижений протягом всього експерименту. Максимальне зниження спостерігали на 1 добу після опіку, у 2,3 рази нижче контрольного показника. На 7 добу концентрація альбуміну поступово починає підвищуватись. Але на 21 добу вона все ж таки залишається у 1,4 раз нижче за контроль.

Отримані результати можуть свідчити про гіпопротеїнемію внаслідок підвищеного розпаду білків за опіку, яка відбувається головним чином за рахунок зменшення кількості альбуміну.

З літературних даних відомо, що втрата білків і рідини відбувається головним чином на місці ураження як результат підвищення проникності

судинної стінки [120]. Опік викликає набряк тканин, який є наслідком збільшення проникності капілярів, що призводить до зниження внутрішньосудинного онкотичного тиску та до гіпопротеїнемії [121]. Дослідження інших авторів вказувало на те, що гіпоальбумінемія має відношення до виживаності опікових хворих. Але при цьому необхідно враховувати наявність або відсутність інфекцій, поліорганної недостатності, а також реакції запалення [122].

Визначення вмісту кінцевих продуктів білкового обміну відіграє важливу роль у клінічній лабораторній діагностиці, які розглядають як систему залишкового азоту. Сечовина є головним компонентом цієї системи, а швидкість її утворення є критичною для діагностики захворювань нирок в клініці [120].

За кислотного опіку стравоходу ми спостерігали підвищення рівня сечовини в сироватці крові щурів (табл. 3), протягом усього терміну досліджень. Найбільшого значення даний показник набував вже на 1 добу після травми, у 2,2 рази вище за контрольні значення, що може вказувати на розвиток опікової хвороби. На наступних термінах експерименту показано поступове зниження концентрації сечовини.

Таблиця 3.

Концентрація сечовини та креатиніну у сироватці крові за умов моделювання кислотного опіку стравоходу статевонезрілих щурів, (M±m, n=10)

	Контроль	1 доба	7 доба	15 доба	21 доба
Сечовина (ммоль/л)	8,9±0,11	19,32±2,01*	16,7±2,01*	14,1±1,23*	13,3±0,53*
Креатинін (мкмоль/л)	88,9±0,1	151,1±1,4*	146,3±1,3*	134,1±0,8*	91,7± 0,12

* – p<0,05 порівняно з контролем

Вміст сечовини в крові може свідчити про порушення функції нирок та

печінки. Креатинін, як і сечовина, є показником роботи нирок, він бере участь у енергетичному обміні тканин. [123].

Креатинін є важливим компонентом залишкового азоту та необхідною складовою функціонування біоенергетичних систем в організмі. З креатину в клітинах організму утворюється важливий макроерг – креатинфосфат, який є джерелом метаболічної енергії. При ферментативному розщепленні креатинфосфату утворюється креатин, який знову підлягає рефосфорилуванню. Результатом неферментативного незворотного дегідрування креатину є креатинін, який виводиться із сечею. Креатинін відображає величину клубочкової фільтрації і за цією величиною можна розраховувати її об'єм та об'єм реабсорбції в нирках. У пацієнтів із захворюваннями нирок з порушенням фільтрації зменшується виділення креатиніну, а вміст його в крові зростає [123].

Отримані дані вмісту креатиніну у сироватці крові тварин після КОС свідчать про зміни концентрації показника, який є маркером токсичного ефекту на організм. Експериментальний опік стравоходу викликав підвищення вмісту креатиніну у сироватці крові протягом всього періоду дослідження. Максимальне підвищення ми спостерігали на 1 добу після опіку, у 1,7 рази вище за контрольний показник, що відповідає літературним даним.

Опікова хвороба характеризується гострою інтоксикацією, порушенням водно-сольового обміну організму, що нерідко призводить до ураження нирок та є результатом порушення їх кровопостачання та наслідком процесу гемолізу еритроцитів [124].

Крім нирок за даної патології виникає порушення роботи печінки. Пошкодження печінки за опікової хвороби є одним із самих розповсюджених ускладнень серед пацієнтів опікових відділень [125].

Дослідження активності АЛТ та АСТ має важливе значення для визначення ступеня ураження печінки. Підвищення їх активності прямо пропорційне ступеню некрозу тканини печінки. [125]. Нами було досліджено

активність зазначених амінотрансфераз у сироватці крові щурів за умови моделювання КОС (рис. 4). Ми спостерігали різке підвищення активності АЛТ на 1 добу за експериментального опіку, у 3 рази в порівнянні з контрольними показниками. Починаючи з 7 доби, активність даного ферменту знижувалась, але лишалась достатньо високою відносно контролю. Так, на 21 добу, активність АЛТ була у 1,6 раз вищою за контрольні показники. Активність АСТ також була вище контрольного рівня протягом усього досліджуваного періоду. На 1 добу після КОС активність даного ферменту була у 1,3 рази вищою за контроль, але починаючи з 7 доби поступово знижуватись. При захворюваннях печінки АЛТ є більш специфічним маркером, чим АСТ [126].

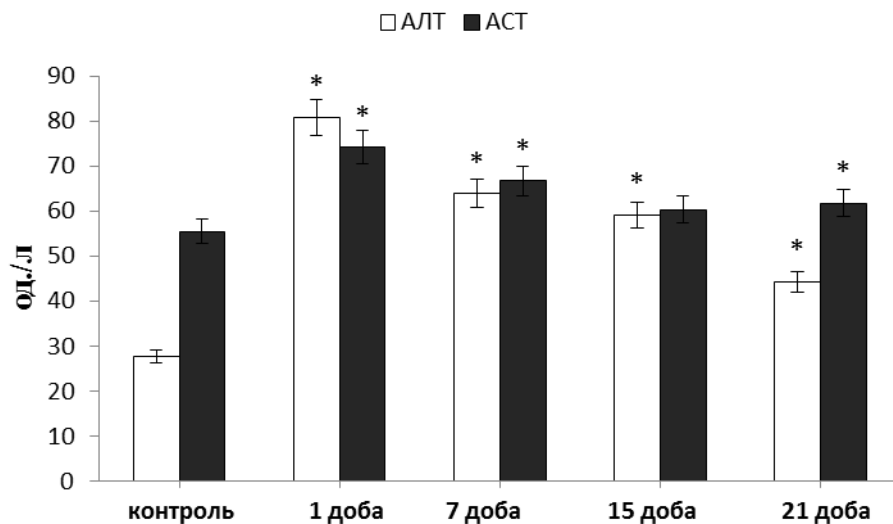


Рис. 3. Аланінамінотрансферазна та аспатратамінотрансферазна активності у сироватці крові щурів за кислотного опіку стравоходу статевонезрілих щурів ($M \pm m$, $n=8$)

* $p < 0,05$ порівняно з контролем

Підвищення активності трансфераз на початкових термінах дослідження може відбуватися в результаті підвищення у крові кількості ферментів, які потрапляють у кровотік з пошкоджених органів і тканин. У наступні терміни

дослідження причинами порушення функції печінки можуть бути порушення кровообігу та вплив токсичних речовин.

Згідно літературних джерел, було показано порушення синтезу білка у дітей з опіковою хворобою, що корелювало з розмірами опіку. Активності АЛТ та АСТ у сироватці крові пацієнтів були підвищені у 2-4 рази відразу після опіку і повернулись до норми на четвертому – шостому тижні [125].

Порушення у роботі деяких органів та процесів, які відбуваються у організмі, викликають зміни електролітичного балансу. Отже, визначення вмісту показників електролітів можуть бути використані для діагностики метаболічних порушень [127].

Калій приймає участь в підтримці електричного мембранного потенціалу клітин, регулює внутрішньоклітинний осмотичний тиск, стимулює активність ферментів гліколізу та приймає участь у метаболізмі білків та глікогену. Зміни концентрації калію у сироватці крові достовірно відображають зрушення його концентрації у тканинах і міжклітинній рідині [127]. За КОС ми спостерігали підвищення вмісту калію (табл.4) у сироватці крові щурів [128]. Так, на 1 добу після опіку вміст даного показника був у 1,5 рази вище за контроль. Починаючи з 7 доби, рівень K^+ починає поступово знижуватись, але лишається вище контрольних показників. На 21 добу він у 1,1 раз перевищує контроль. При пошкодженні тканин іони K^+ вивільняються з клітин в великих кількостях та, потрапляючи в кров, викликають гіперкаліємію.

Вважається, що натрій в організмі забезпечує створення та підтримку осмотичного тиску рідин, затримку води в організмі, приймає участь у процесах всмоктування в кишківнику та реабсорбції в нирках глюкози і амінокислот, в активації деяких ферментів [129].

При визначенні концентрації іонів Na^+ у сироватці крові щурів після моделювання КОС (табл.4) максимальне зниження показника було відмічено на 1 та 7 доби, в середньому у 1,1 рази. На 21 добу концентрація Na^+ підвищилась до контрольного рівня. Таке, зниження концентрації натрію у

сироватці крові в перші дні після травми може бути наслідком підвищення концентрації іонів K^+ в даний термін.

Таблиця 4.

Вміст електролітів у сироватці крові за умов моделювання кислотного опіку стравоходу статевонезрілих щурів ($M \pm m$, $n=10$)

	Контроль	1 доба	7 доба	15 доба	21 доба
K^+ (ммоль/л)	5,5±0,10	8,5±0,16*	8,2±0,15*	6,4±0,13*	6,1±0,13*
Na^+ (ммоль/л)	156±2,60	147±1,89*	144±1,78*	149±1,90*	151±2,12
Ca^{2+} (ммоль/л)	10,6±0,20	5,8±0,10*	10,7±0,20	8,9±0,16*	9,5±0,18
Mg^{2+} (ммоль/л)	2,86±0,05	1,65±0,03*	3,4±0,05*	3,3±0,05*	2,1±0,05*
Cl^- (ммоль/л)	110±2,50	105±1,99	95,6±1,57*	104±1,97*	106±1,98

* – $p < 0,05$ порівняно з контролем

Рівень кальцію у крові - важливий показник, так як він задіяний у багатьох процесах у організмі: він необхідний для утворення кісткової тканини, бере участь в роботі м'язів, нервів і серцево-судинної системи і важливий для обміну речовин в цілому. За КОС ми спостерігали суттєве зниження Ca^{2+} на 1 та 15 доби після опіку (табл.4) , рівень даного катіону був у 1,8 та 1,2 рази, відповідно, нижче за контроль. На 7 та 21 доби вміст даного показника знаходився в межах контрольних значень. Отримані результати можуть свідчити про резорбтивний ефект CCl_3COOH , яка легко проникає в судинне русло, та може викликати ниркову недостатність. Відомо, що знижений рівень кальцію в крові також може бути викликаний порушеннями всмоктуваності речовин, захворюваннями нирок і печінки, ендокринними та іншими розладами [129].

Магній - внутрішньоклітинний катіон організму, біологічно активний елемент з багатьма функціями. Деякі функції магнію залежить від його здатності конкурувати з кальцієм за ділянки зв'язування. Існує взаємозв'язок співвідношення концентрацій магнію і калію, як основних внутрішньоклітинних катіонів (дефіцит магнію призводить до зменшення

вмісту внутрішньоклітинного калію і, отже, гіпертензії). Підтримка магнієвого гомеостазу здійснюється зміною його всмоктування в шлунково-кишковому тракті з виведенням в нирках. За кислотного опіку стравоходу ми спостерігали зниження вмісту Mg^{2+} на 1 та 21 добу після травми у 1,7 та 1,4 рази, відповідно, (табл.4). На 7 та 15 добу вміст даного показника був вищим за контроль у 1,2 рази. Зниження вмісту магнію пов'язують з стресовим станом та хронічною інтоксикацією, які мають місце за опікової хвороби. Підвищення концентрації може бути наслідком зневоднення організму та ниркової недостатності [129].

Поряд з іншими катіонами аніони хлору є одними з найважливіших осмотичних іонів організму [127]. 90% хлору знаходиться у позаклітинній рідині. В організмі він переважно перебуває у іонізованому стані у вигляді солей натрію, калію, кальцію та магнію [129]. Показано достовірне зниження концентрації аніонів Cl^- на 7 добу після КОС, у 1,2 рази (табл.4). У наступні терміни дослідження рівень хлору знаходився в межах контрольних показників.

За КОС найсуттєвіші зміни показників електролітного балансу відбувалися на 1 добу після травми, що може бути пов'язано з розладами кровообігу. Згідно літературних даних, гіперкаліємія обумовлена виходом калію із гемолізних еритроцитів. Значні втрати електролітів відбуваються через опікові рани [130].

Отже, нами було відтворено модель кислотного опіку стравоходу II ступеня тяжкості 30% CCl_3COOH . Отримані дані загальноклінічних та біохімічних показників крові щурів свідчать про метаболічні порушення в роботі органів та систем статевонезрілих щурів. Змодельований стан є близьким до клінічної картини КОС II ступеня тяжкості у дітей віком від 1 до 8 років.

Процеси перекисного окиснення ліпідів належать до основних метаболічних реакцій, які відбуваються в клітині. Тому наступним етапом

нашої роботи було дослідження впливу кислотного опіку стравоходу на стан перекисного окиснення ліпідів та систему антиоксидантного захисту.

3.2 Стан системи перекисного окиснення ліпідів та функціонування системи антиоксидантного захисту у сироватці крові та слизовій оболонці стравоходу

Основним внутрішнім джерелом небезпеки для клітинного гомеостазу є продукти, утворені в результаті метаболізму кисню [131]. При стресі та інших чинниках пошкоджуючого характеру порушення ПОЛ є ранньою ланкою патогенезу [132]. Нами було досліджено стан процесів вільнорадикального окиснення і функціонування системи антиоксидантного захисту в сироватці крові та слизовій оболонці стравоходу щурів після кислотного опіку стравоходу.

Дослідження вмісту дієнових кон'югатів, ТБК-активних продуктів та Шифових основ дозволяє оцінити стан системи ПОЛ [133].

Результати дослідження показали, що за кислотного опіку стравоходу щурів спостерігалось підвищення вмісту продуктів перекисного окиснення ліпідів. Показником утворення первинних продуктів реакцій вільнорадикального окиснення ліпідів є вміст дієнових кон'югатів. Так, за умов КОС вміст дієнових кон'югатів зростав як у слизовій оболонці стравоходу, так і у сироватці крові (рис.4). Максимального значення у сироватці крові даний показник набув на 15 добу після опіку, у 1,6 рази вище за контроль. Тоді як у слизовій стравоходу найвище значення показника спостерігали на 1 добу після опіку, у 2,2 рази вище за контроль.

На 21 добу після опіку спостерігається часткове зниження вмісту дієнових метаболітів до контрольних показників, що може бути наслідком інтенсивного накопичення вторинних та кінцевих продуктів пероксидації.

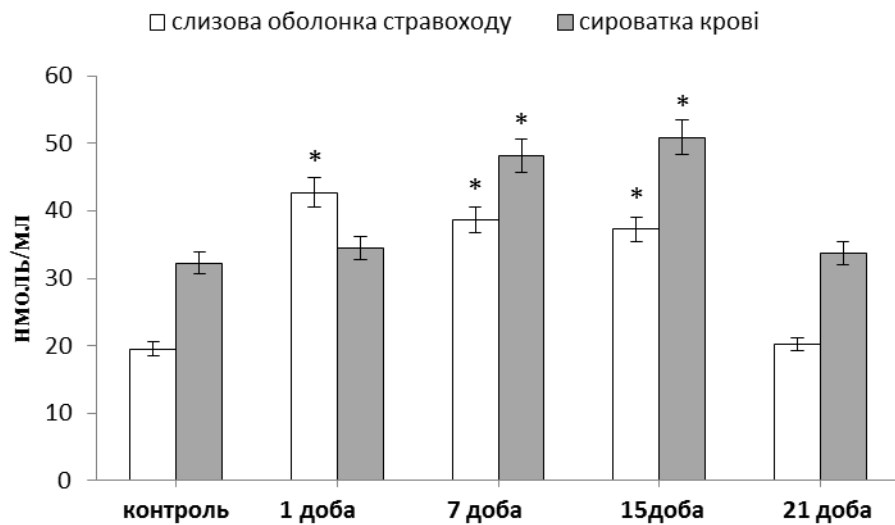


Рис. 4. Вміст дієнових кон'югатів у слизовій оболонці стравоходу та сироватці крові за кислотного опіку стравоходу ($M \pm m$, $n=8$)

* – $p \leq 0,05$ порівняно з контролем.

Вторинними продуктами ПОЛ є альдегіди, зокрема малоновий, які утворюються під час розриву подвійних зв'язків у вуглецевому скелеті окиснюваних молекул.

У результаті досліджень нами було встановлено поступове підвищення рівня ТБК-активних продуктів як у слизовій оболонці стравоходу, так і у сироватці крові. Зокрема, вміст досліджуваного показника у слизовій оболонці стравоходу на 7 день після опіку був вищий за контроль у 2,6 рази, а у сироватці крові на 15 добу після опіку у 2 рази (рис.5). Після цього вміст ТБК-активних продуктів починає поступово знижуватись, але лишається вище за контрольні значення протягом усього досліджуваного періоду. Так, на 21 добу даний показник у 2,3 рази вище за контроль у слизовій стравоходу, а у сироватці крові – у 1,8 рази.

Отримані нами експериментальні дані свідчать про те, що за даної експериментальної патології активація процесів ПОЛ починається вже з першої доби після травми. Протягом подальшого розвитку опікової хвороби

процеси окиснення посилювались, що свідчить про прогресування захворювання.

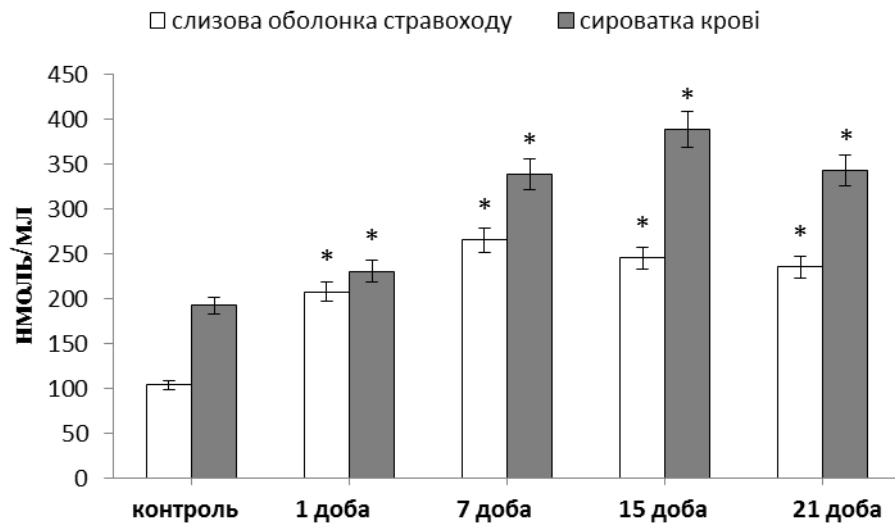


Рис. 5. Вміст ТБК-активних продуктів у слизовій оболонці стравоходу та сироватці крові за кислотного опіку стравоходу щурів. ($M \pm m$, $n=8$)

* – $P \leq 0,05$ порівнянню з контролем

Згідно літературних даних інтенсивності ПОЛ залежить від ступеня тяжкості опікової травми та стану пацієнтів: Так, за термічного опіку шкіри морських свинок вже через 1 годину після травми в сироватці крові достовірно підвищувався рівень МДА та ДК. Через 1 добу після опіку концентрація малонового диальдегіда і дієнових кон'югатів продовжували рости, а через 7 діб після опіку починали знижуватись, але залишалися достовірно вище, ніж у контролі [134]. За хімічного опіку шкіри мурчаків спостерігали достовірне підвищення рівня МДА у сироватці крові через 1 годину після травми. Через 1 добу концентрація малонового диальдегіда знизилася і продовжувала знижуватися на 3 та 5 доби. Вміст ДК через 1 годину підвищився у 2 рази. Той же час, концентрація ДК знизилася і продовжувала знижуватись на 3 і 5 доби, проте рівень ДК на 5 добу достовірно перевищував контрольний [134].

Також в літературі є дані про те, що в організмі пацієнтів при формуванні хімічного опіку спостерігалось підвищення інтенсивності процесів ПОЛ. Про це свідчать достовірно високі рівні ДК і ТБК-продуктів у сироватці крові хворих з даною патологією. Так, на 7 добу після опіку інтенсивність утворення і накопичення продуктів ПОЛ вдвічі вище показників здорових людей. На 14 добу зберігався високий рівень ДК в крові хворих з хімічним опіком стравоходу, і тільки на 21 добу після опіку вміст продуктів ПОЛ знижувався, проте залишався достовірно вище показників у здорових осіб [135].

У результаті окисної полімеризації ліпідів та білків утворюються кінцеві продукти ПОЛ – Шифові основи. Нами виявлено поступове зростання вмісту шифових основ за кислотного опіку стравоходів щурів (рис.6). Кінцеві продукти пероксидації зростали в середньому в 1,2 рази порівняно з контролем лише на 21 добу після опіку, як у сироватці крові, так і у слизовій оболонці стравоходу.

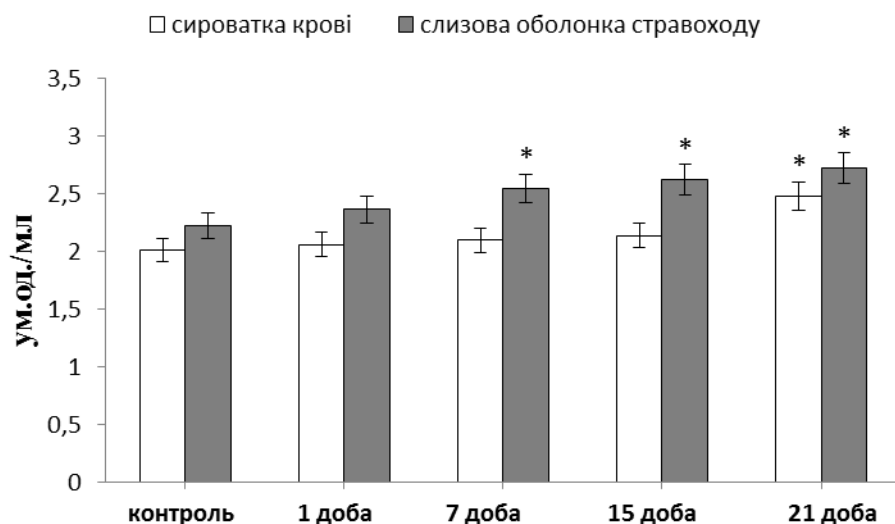


Рис. 6. Вміст шифових основ у сироватці крові та слизовій оболонці стравоходу за кислотного опіку стравоходу щурів. ($M \pm m$, $n=8$)

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

Шифові основи (ліпофлюорисцентні, ліпофусцинові пігменти) характеризують більш довготривалі зміни окисного гомеостазу. Суттєве збільшення цього показника найчастіше є наслідком тривалої активації ПОЛ, що зустрічається при тяжких ураженнях клітин.

Таким чином, отримані нами дані свідчать, що за кислотного опіку стравоходу відбуваються процеси вільнорадикального окислення. При цьому порушуються функції плазматичної мембрани, її складові компоненти (ненасичені жирні кислоти) включаються в процес пероксидації, що приводить до підвищення вмісту дієнових кон'югатів, малонового діальдегіду, шифових основ. Продукти ПОЛ здатні гальмувати проліферативні процеси, що може бути однією з причин зниження регенеративних процесів слизової стравоходу за кислотного опіку стравоходу.

В нормальних умовах процес пероксидації ліпідів знаходиться під строгим контролем систем антиоксидантного захисту, які здатні підтримувати прооксидно-антиоксидантний гомеостаз. Тому, наступним етапом нашого дослідження було дослідити функціонування основних ланок антиоксидантної системи за кислотного опіку стравоходу щурів.

Початкові стадії процесу вільнорадикального окислення контролюються супероксиддисмутазою (СОД) [136], яка здійснює перший метаболічний етап знешкодження супероксидного аніон-радикалу шляхом його дисмутації в пероксид водню, що розкладається каталазою.

У ході досліджень було показано, що на 1 та 7 доби після опіку супероксиддисмутазна активність у сироватці крові знижувалась у 3,3 та 4,3 рази, відповідно (табл. 5). На 15 та 21 доби починається поступове підвищення активності ферменту, але показники залишаються нижче контрольних у 2,4 та 1,4 рази, відповідно. У слизовій оболонці стравоходу відбувалось поступове зниження супероксидазної активності. Максимальне зниження показника спостерігали на 21 добу після опіку, у 1,5 рази нижче за контроль.

Таблиця 5

Супероксиддисмутазна та каталазна активність у сироватці крові та слизовій оболонці стравоходу за кислотного опіку стравоходу статевонезрілих щурів, $M \pm m$, $n=8$

		контроль	1 доба	7 доба	15 доба	21 доба
Супероксид-дисмутаза, ум. од./хв. *мг білка	Сироватка крові	0,26± 0,01	0,08± 0,01*	0,06± 0,01*	0,11± 0,01*	0,19± 0,01*
	Слизова стравоходу	1,57± 0,07	1,54± 0,07	1,52± 0,07	1,42± 0,06*	1,02± 0,05*
Каталаза, мкмоль/хв. * мг білка	Сироватка крові	7,06± 0,32	4,15± 0,19*	3,92± 0,18*	4,44± 0,19*	4,71± 0,21*
	Слизова стравоходу	3,66± 0,17	2,68± 0,12*	2,27± 0,10*	2,97± 0,13*	3,21± 0,14*

*- $p < 0,05$ порівняно з контролем

Визначення каталазної активності дозволило встановити, що у тварин за КОС як у сироватці крові, так і у слизовій стравоходу активність ферменту була нижчою за контрольні показники протягом всього досліджуваного терміну (табл. 5). На 7 добу після опіку активність каталази була найнижчою, як у сироватці крові, так і у слизовій стравоходу, у 1,8 та 1,6 рази, відповідно. З 15 доби спостерігали поступове підвищення показника. У сироватці крові каталазна активність на 21 добу після опіку була у 1,5 рази нижче за контроль, а у слизовій стравоходу – у 1,1 рази.

Активність антиоксидантних ферментів СОД та каталази в тканинах організму тісно пов'язані з рівнем окисно-відновних процесів. Відомо, що донори електронів є активаторами СОД. Накопичення відновлених метаболітів сприяє зростанню активності СОД. При цьому спостерігається знешкодження супероксидного аніон радикалу, який здатний інгібувати каталазу [137], що веде до накопичення пероксиду водню (H_2O_2). Зниження активності СОД може свідчити про пошкодження клітинних мембран, оскільки кислота викликає руйнування тканин та гідроліз білків. Інактивація СОД може бути викликана

підвищеним рівнем H_2O_2 . Утворення надлишку окиснених метаболітів також сприяє механізму інгібування СОД акцепторами електронів [137]. Накопичення супероксидних аніон радикалів, гідроксильних радикалів і H_2O_2 призводить до порушення балансу системи антиоксидантного захисту та до її виснаження.

Виявлені зміни супероксиддисмутазної та каталазної активностей за умов КОС статевонезрілих щурів є наслідком прискорення реакцій вільнорадикального окиснення з утворенням супероксиду – первинного інтермедіату одноелектронного відновлення кисню, а також підвищення внутрішньоклітинного вмісту пероксиду водню.

Підвищення утворення вільних радикалів і пов'язане з цим посилення процесів пероксидації ліпідів супроводжується порушенням властивостей біологічних мембран і функціонування клітин. Одним із наслідків ПОЛ являється окиснення тіолових груп мембранних білків, що призводить до появи дефектів в ліпідному шарі мембран та мітохондрій.

Згідно з отриманими даними, у слизовій оболонці стравоходу після опіку відзначалося істотне зниження вмісту білкових SH-груп в усі терміни дослідження (рис. 7).

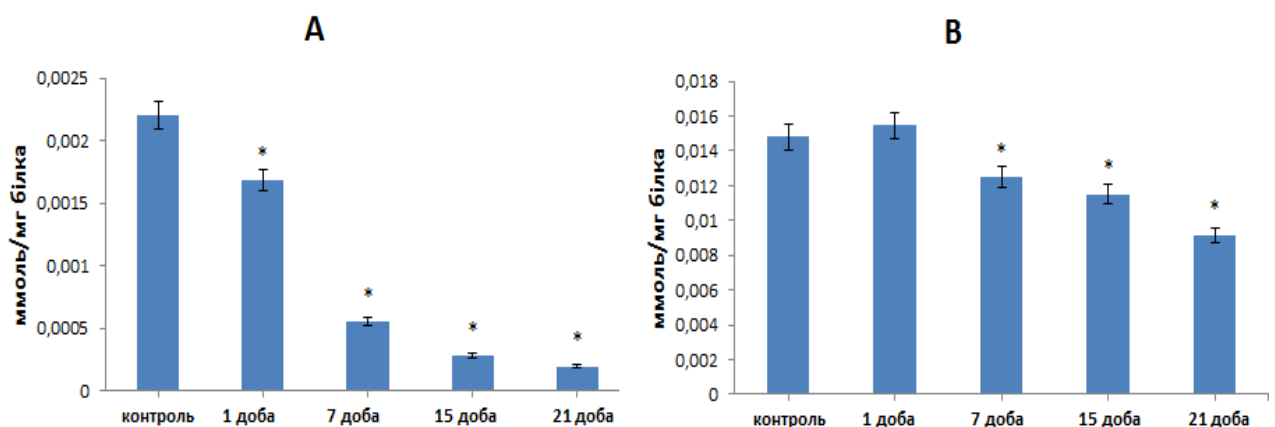


Рис. 7. Вміст SH-груп у слизовій оболонці стравоходу (А) та у сироватці крові (В) за кислотного опіку стравоходу щурів. ($M \pm m$, $n=8$)

* – $p \leq 0,05$ в порівняно з контролем

Максимальне зниження вмісту показника спостерігали на 21 добу, у 11 раз нижче за контроль. У сироватці крові достовірне зниження вмісту SH-груп відзначено на 7 добу після опіку. Найнижче значення показника зареєстроване на 21 добу, у 1,6 раза нижче за контроль.

Таким чином, вміст SH-груп у стравоході за опікової травми зазнав суттєвіших змін, в порівнянні з їх вмістом у крові, відображаючи тяжкі метаболічні порушення в рані. Подібна динаміка пов'язана з глибокими структурно-функціональними порушення АОС організму за кислотного опіку стравоходу. Виражене і тривале зниження сульфгідрильних груп в опіковій рані свідчить про руйнування білків, амінокислот, пуринових і піримідинових основ, РНК, ДНК [138].

Ключова роль в захисті клітин від оксидативного стресу відводиться системі глутатіону. Відомо, що порушення у функціонуванні глутатінової антиоксидантної системи призводять до змін проліферації та апоптозу [34].

У зв'язку з цим актуальним стає вивчення стану антиоксидантної системи глутатіону. Нами було досліджено вміст відновленого та окисненого глутатіону, активності глутатіонредуктази (ГР), глутатіонпероксидази (ГПО) та глутатіонтрансферази (ГТ) у сироватці крові статевонезрілих щурів за кислотного опіку стравоходу. Визначення вказаних показників у слизовій оболонці стравоходу не проводили, оскільки попередні дослідження свідчать про суттєві зміни системи ПОЛ та ферментів АО системи.

Вміст GSH на 7 добу після КОС мав тенденцію до зниження (рис. 8). Максимальне зниження показника спостерігали на 21 добу після опіку, у 1,4 рази нижче за контроль. Такий ефект може бути зумовленим дисбалансом антиоксидантного захисту. При поясненні встановлених ефектів, не можна також виключати прямого окислення чи відновлення глутатіоном SH-груп білків [33]. Виснаження пулу відновленого глутатіону може бути пов'язаним зі зниженням активності глутатіонредуктази, яка відновлює GSSG до GSH.

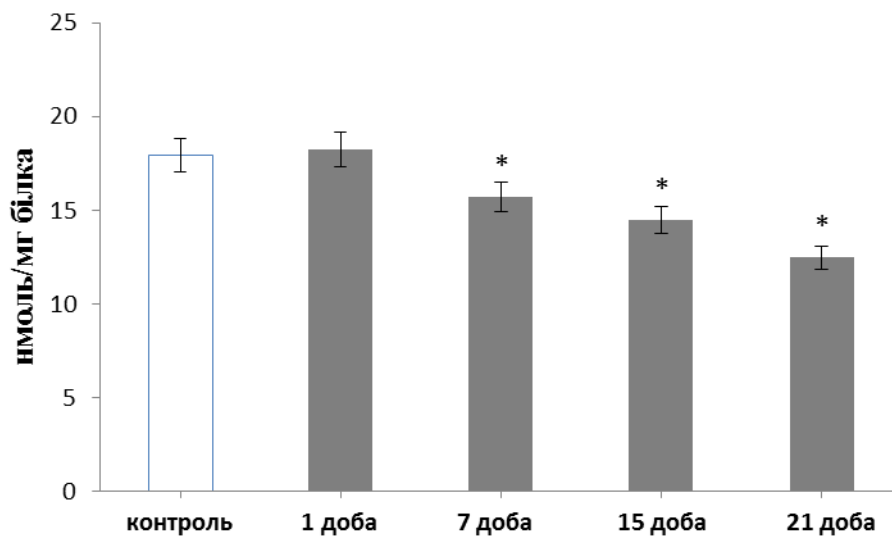


Рис. 8. Вміст відновленого глутатіону (GSH) у сироватці крові за кислотного опіку стравоходу статевонезрілих щурів. (M±m, n=8)

* – $p \leq 0,05$ порівняно з контролем.

Зміни в системі вільнорадикального окислення можуть призводити до виснаження цитозольного та мітохондріального глутатіону, відкриття трансмембранної мітохондріальної пори та виходу проапоптичних факторів і в решті до апоптозу клітин. Отримані результати відповідають літературним даним, де вказано, що за опікової травми відбувається зниження концентрації GSH в органах та внутрішньоклітинних органелах [139].

При дослідженні вмісту окисненого глутатіону GSSG (рис.9) ми спостерігали підвищення його вмісту починаючи з 7 доби. Максимальний вміст даного показника, у 1,5 раз вище за контроль, відмічено на 21 добу після опіку. Таке зниження вмісту відновленого глутатіону на тлі збільшення вмісту окисненого глутатіону у сироватці крові може свідчити про розвиток окисного стресу у щурів, який виникає внаслідок постійної генерації вільних радикалів.

Збереження оптимального для клітини співвідношення відновленого глутатіону до окисненого (GSSG) - GSH / GSSG в клітині має вирішальне

значення для виживання. Дефіцит GSH призводить до окислювального пошкодження клітини.

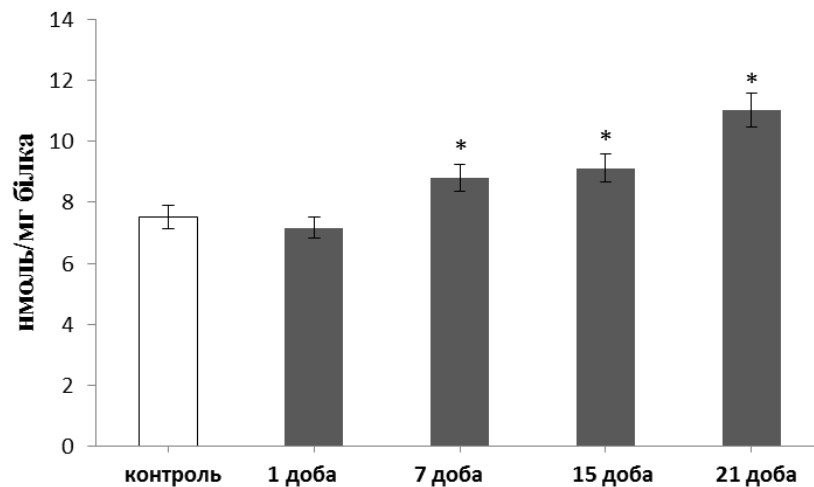


Рис. 9. Вміст окисненого глутатіону (GSSG) у сироватці крові за кислотного опіку стравоходу статевонезрілих щурів. ($M \pm m$, $n=8$)

* – $p \leq 0,05$ порівнянню з контролем

Вміст відновленого глутатіону в клітині залежить від збалансованості таких процесів, як його синтез *de novo* та виведення у екстрацелюлярний простір; регенерація за рахунок відновлення GSSG та використання його для нейтралізації H_2O_2 і вторинних продуктів пероксидації [140]. Як критерій для оцінки двох останніх процесів було вивчено у сироватці крові статевонезрілих щурів за КОС активність глутатіонредуктази та глутатіонпероксидази.

Активність глутатіонредуктази починала поступово знижуватись на 7 добу після опіку (рис.10). Мінімальне значення даного показника ми спостерігали на 21 добу після КОС, у 1,3 рази менше за контроль.

Причиною інгібування глутатіонредуктазної активності сироватки крові може бути зниження вмісту НАДН та НАДФ, спричинене порушенням функціонування мітохондрій, які одночасно є місцем утворення та мішенню дії гідроксильного радикалу – найбільш реакційноздатного продукту перетворення H_2O_2 . За результатами наших досліджень, за КОС

спостерігається підвищення активності каталази на 15 добу після травми, що може свідчити про великий вміст пероксиду водню у сироватці крові (табл. 5).

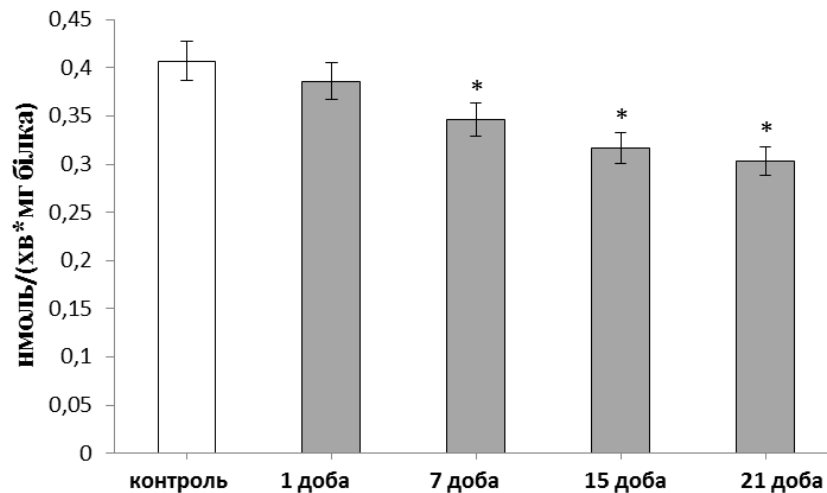


Рис. 10. Глутатіонредуктазна активність у сироватці крові за кислотного опіку стравоходу статевонезрілих щурів ($M \pm m$, $n=8$)

* – $p \leq 0,05$ порівняно з контролем.

Активність глутатіонпероксидази за КОС статистично достовірно знижувалась у сироватці крові вже на 1 добу після травми (рис.11) і залишалась майже незмінною протягом наступних досліджуваних термінів часу. У середньому активність глутатіонпероксидази знижувалась у 1,4 рази нижче контролю. Зниження активності глутатіонпероксидази може стати важливим чинником ініціації процесів ліпопероксидації та накопичення її продуктів, які, в свою чергу, можуть призвести до патологічних наслідків [139].

Потрібно також відмітити, що зміни активності антиоксидантних ферментів залежать від інтенсивності утворення активних форм кисню: у випадку помірного підвищення АФК відбувається, як правило активація ферментативної ланки антиоксидантної системи, а за умов надмірного підвищення вільних радикалів нерідко відбувається пригнічення ферментативної ланки захисту клітин. Вважають, що при стресі завжди

знижується активність антиоксидантних ферментів [141]. Зниження активності антипероксидних ферментів при стресі, вірогідно, характерно не для самого стресу, а для більш пізнього та більш важкого прояву – пошкодження тканин, при якому дійсно відбувається зниження активності глутатіонпероксидази та глутатіонтрансферази [137].

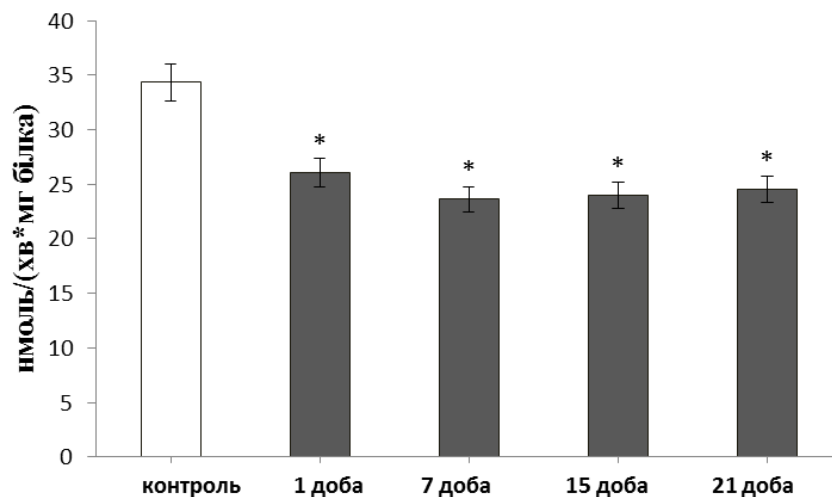


Рис. 11. Глутатіонпероксидазна активність у сироватці крові за кислотного опіку стравоходу статевонезрілих щурів ($M \pm m$, $n=8$)

* – $z \leq 0,05$ порівняно з контролем.

З огляду на представлені літературні дані можна припустити, що інгібування глутатіонпероксидазної активності протягом всіх етапів дослідження відбувалося на фоні суттєвого пошкодження клітин стравоходу.

Відновлення пероксиду водню та органічних гідроперексидів – це головна функція глутатіонпероксидази. Однак, треба зауважити, що метаболізуючи ROOH, глутатіонпероксидаза може попереджувати накопичення вторинних продуктів пероксидації, але вона не здатна знешкодити їх. На відміну від глутатіонпероксидази глутатіонтрансфераза успішно метаболізує шляхом кон'югації з GSH вторинні метаболіти [142].

Згідно з даними, представленими на рис.12, на 7 добу після опіку стравоходу спостерігається тенденція до зниження глутатіонтрансферазної активності, що може бути обумовлено надлишком утворюваних, внаслідок розвитку запального процесу, токсичних метаболітів кисню. Максимальне зниження активності ферменту спостерігали на 21 добу після травми, у 2,2 рази нижче контрольних показників.

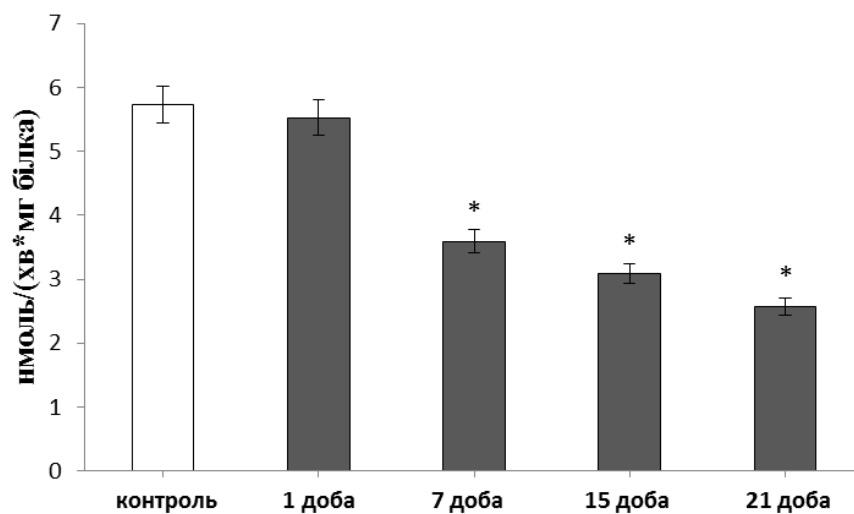


Рис. 12. Глутатіонтрансферазна активність у сироватці крові за кислотного опіку стравоходу статевонезрілих щурів. ($M \pm m$, $n=8$)

* – $p \leq 0,05$ порівняно з контролем.

Відомо, що ГТ високоспецифічна до GSH і зниження пулу відновленого глутатіону може призвести до падіння активності ферменту на пізніх етапах розвитку опікової хвороби [143].

Таким чином, аналіз представленої матеріалу дозволив виявити особливості функціонування глутатіонзалежних ферментів детоксикації в сироватці крові за кислотного опіку стравоходу статевонезрілих щурів. Відбувалось пригнічення активності глутатіонредуктази, глутатіонпероксидази та глутатіонтрансферази у сироватці крові, що може бути однією із причин розвитку хронізації патологічного процесу.

Після опіку рівень аденозинтрифосфату в тканинах поступово знижується, а аденозинмонофосфат, кількість якого збільшується, перетворюється в гіпоксантин, забезпечуючи цим субстрат для ксантиноксидази [144]. Ці складні реакції призводять до надлишку шкідливих вільних радикалів, таким як супероксид та пероксид водню. Окрім генерації вільних радикалів ксантиноксидази при опіковій травмі, активовані адгезією нейтрофіли утворюють додаткові вільні радикали [145]. Вважається, що вільні радикали проявляють антимікробну дію при загоєнні ран. Але, після опіку з'являється занадто велика кількість вільних радикалів, яка шкідлива і пов'язана з запаленням, синдромом системної протизапальної відповіді, імуносупресією, інфекцією та сепсисом, пошкодженням тканин та множинною недостатністю органів [33].

Посилення вільнорадикальних процесів паралельно з порушенням механізмів антиоксидантного захисту пов'язано з зниження рівня супероксиддисмутази, каталази, глутатіона, α -токоферолу та аскорбінової кислоти за опіку [33]. Підвищена регуляція індукцибельної NO-синтази може призвести до периферичної вазодилатації, активізації транскрипційного фактору NF- κ B і сприяти транскрипції та трансляції численних цитокінів [144]. NO також може взаємодіяти з супероксидним радикалом з утворенням пероксинітриду, високореакційного медиатора пошкодження тканин [144].

Таким чином, отримані нами дані свідчать, що за кислотного опіку стравоходу відбуваються процеси вільнорадикального окислення, які сприяють посиленій продукції активних форм кисню, окисленню мембранних ліпідів, зміні функціонування ферментів. При цьому порушуються функції плазматичної мембрани, її складові компоненти (ненасичені жирні кислоти) включаються в процес пероксидації, що приводить до підвищення вмісту дієнових кон'югатів, малонового діальдегіду, шифових основ. Посилення вільнорадикальних процесів паралельно з порушенням механізмів

антиоксидантного захисту пов'язано з зниження рівня супероксиддисмутази, каталази та системиглутатіону за опіку.

Отримані дані свідчать про суттєві метаболічні порушення за кислотного опіку стравоходу, які обумовлені процесами надмірної продукції активних форм кисню та є умовою для активації протеолізу.

3.3. Протеолітична деградація білків за кислотного опіку стравоходу

3.3.1. Показника системи протеолізу за кислотного опіку стравоходу статевонезрілих щурів

Система протеолітичних ферментів аналогічна системі антиоксидантного захисту і характерна поєднанням процесів захисту і відновлення, що визначає стратегію клітини у боротьбі з окислювальним руйнуванням білкових молекул. Первинна захист полягає в роботі ферментів, що утилізують вільні радикали, і антиоксидантів, які зупиняють реакцію поширення їх шкідливого впливу, що знижує ймовірність атаки білків активними вільними радикалами. Оскільки перший етап захисту не оберігає повністю від впливу вільних радикалів і деякі порушення все ж таки виникають, включаються сили другого етапу захисту. Механізми вторинного захисту повністю елімінують пошкоджені молекули або відновлюють їх. Різні протеолітичні ферменти можуть виступати в ролі компонентів вторинної захисту, здійснюючи деградацію окиснених білків і запобігаючи тим самим накопиченню змінених і зруйнованих білків в клітині [146].

Протеолітичні ферменти приймають участь у фізіологічних і патологічних процесах, таких як травлення і гомеостаз, руйнування і відновлення тканин [147]. За допомогою протеїназ здійснюється регуляція вмісту медіаторів запалення та утворення із попередників активних форм ферментів, які приймають участь в реакції запалення [148].

Але дані щодо активності протеолітичних ферментів та їх інгібіторів за опіку стравоходу відсутні в літературі. Отримані результати дозволять оцінити характер процесу регенерації за опіку стравоходу, і, відповідно, розробити ефективні методи цілеспрямованої корекції протеолізу.

Ми визначили загальну активність протеолітичних ферментів у плазмі крові щурів за кислотного опіку стравоходу (рис.13).

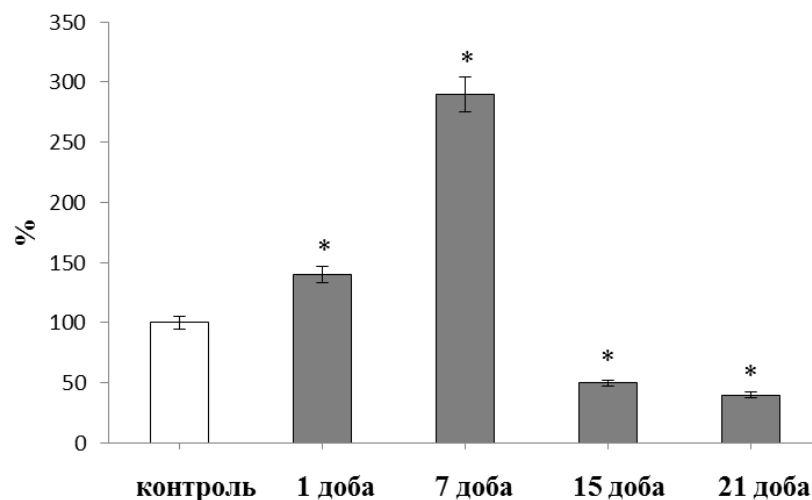


Рис. 13. Загальна протеолітична активність у плазмі крові щурів за кислотного опіку стравоходу ($M \pm m$, $n=8$)

* - $p < 0,05$ порівняно з контролем

Нами було встановлено, що на 1 та 7 доби експерименту після моделювання КОС загальна активність протеолітичних ферментів зростала у 1,4 та 2,9 рази, відповідно [149]. Підвищення протеолітичної активності може мати захисний характер, оскільки при цьому розщеплюються пошкоджені тканини до продуктів, які легко засвоюються або виводяться з організму. Надмірний протеоліз несприятливо позначається на перебігу ранового процесу. Оскільки джерелом протеїназ та їх ендogenous інгібіторів є не тільки печінка, але і клітини крові (моноцити, лімфоцити та сегментоядерні нейтрофіли) [150], одним із джерел протеїназ на 7 добу можуть бути

моноцити, вміст яких в даний термін часу підвищився, в порівнянні з контролем (табл.1). Отримані дані співпадають з даними інших авторів. Так дослідження загальної протеолітичної активності за експериментального термічного опіку щурів показало підвищення показника на 7 добу після травми [151]. Така активація протеолітичних ферментів також може відбуватися під впливом катехоламіну, Ca^{2+} , H^+ та інших факторів [152].

На 15 та 21 доби експерименту зальна протеолітична активність в плазмі крові дослідних щурів була нижче контрольних показників у 1,5 та 2 рази, відповідно. За експериментального термічного опіку щурів загальна протеолітична активність знижувалась починаючи з 14 доби після травми [151].

В процесі деградації білків при патологічних станах приймають участь протеолітичні ферменти, що представлені трьома групами - серинові протеїнази, цистеїнові протеїнази та металопротеїнази. Серинові протеїнази (трипсин, хімотрипсин) широко використовують для лізису компонентів позаклітинного матриксу в зоні коагуляційного некрозу опікової рани [153]. Тому підвищення активності даного ферменту можна розглядати як основну ланку розвитку патологій, що супроводжуються реакцією запалення [153]. Металопротеїнази приймають участь у деградації ЕЦМ, регулюють процесінг біологічно активних речовин, а також контролюють такі процеси, як проліферація, адгезія, міграція, диференціація та апоптоз [154].

Нами було визначено активність серинових протеїназ та металопротеїназ у плазмі крові щурів за КОС (рис. 14). Активність металопротеїназ у плазмі крові щурів підвищувалась поступово, на 1 добу після опіку даний показник був у 1,1 рази вище контрольного, а на 7 добу експерименту - у 2,5 рази. Підвищення активності металопротеїназ після опіку може бути пов'язано з розвитком запальних процесів та надходженням протеїназ із зруйнованих тканин та клітин [155]. На 15 та 21 доби активність металопротеїназ знизилась у 2,3 та 3,4 рази, відповідно, відносно контрольних показників.

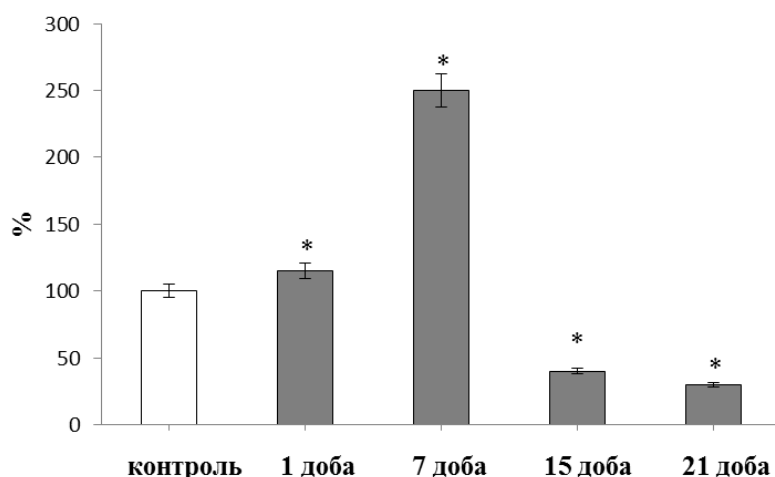


Рис. 14. Активність металопротеїназ у плазмі крові щурів за кислотного опіку стравоходу ($M \pm m$, $n=8$)

* - $p < 0,05$ порівняно з контролем

Подібна тенденція спостерігалась при визначенні активності серинових протеїназ (рис.15). Даний показник підвищувався на 1 та 7 доби після опіку у 1,4 та 2 рази відповідно, відносно контролю. На 15 та 21 доби спостерігали зниження активності ферменту у 1,5 та 2,5 рази, відповідно.

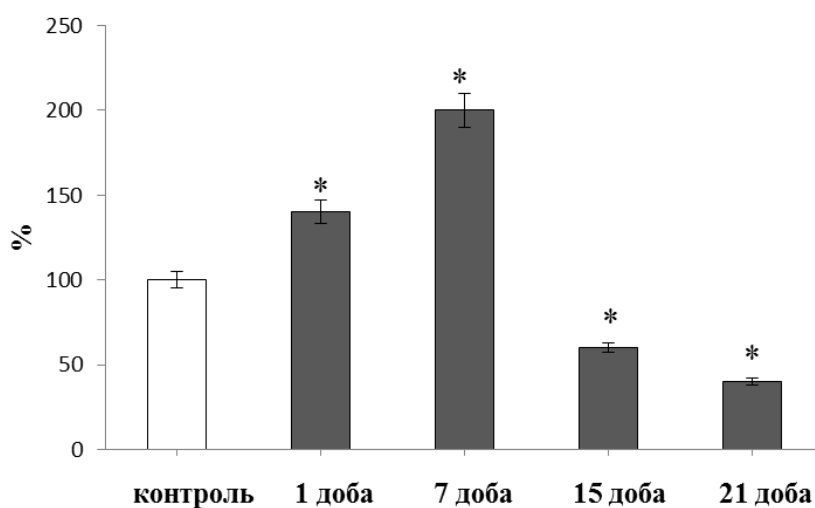


Рис. 15. Активність серинових протеїназ в плазмі крові щурів за кислотного опіку стравоходу ($M \pm m$, $n=8$)

* - $p < 0,05$ порівняно з контролем

Серинові протеїнази - одна з найбільш поширених груп протеолітичних ферментів. Дані ферменти можуть виконувати безліч різних функцій, вони беруть участь в процесах метаболізму, клітинної сигналізації, тощо. Зниження активності ферментів може свідчити про утворення комплексів з інгібіторами та їх елімінацію з кров'яного руслу, а також про міграцію ферментів у місце опіку. Згідно літературних даних, серинові протеїнази накопичуються у зоні запалення [156].

Таким чином, КОС супроводжується зниженням у плазмі крові загальної протеолітичної активності, в тому числі, активності металопротеїназ та серинових протеїназ, на 21 добу після травми. Слід зазначити, що процеси регенерації за опіку стравоходу починаються з 10-15 доби, тому зниження активності основних протеолітичних ферментів, які беруть участь у ремоделюванні ЕЦМ може призвести до надмірного рубцювання опікової рани [157].

Матриксні металопротеїнази (ММП) - представники сімейства протеаз, що беруть участь у протеолітичній деградації різних компонентів позаклітинного матриксу, здійснюють регулюючу і модулюючу функцію в ангиогенезі. Ключовим моментом регуляції ангиогенезу є баланс ангиогенних і ангиостатичних факторів, який визначає перебіг ранового процесу взагалі і опікової рани – зокрема. Присутність ММП є дуже важливим для загоєння ран [154]. У той же час ММП можуть перешкоджати загоєнню хронічних ран. Останні дослідження показали, що хронічні рани містять багато нейтрофілів, які секретують ММП-8 і еластази, що сприяють надмірній білковій деградації і інактивації ранових факторів росту [158, 159].

Нами було визначено вміст ММП-1, ММП-2, ММП-3, ММП-8 та ММП-9 слизової оболонки стравоходу та сироватки крові щурів [160, 161] після моделювання кислотного опіку стравоходу (табл. 6 та 7).

Таблиця 6

Вміст матричних металопротеїназ у слизовій оболонці стравоходу за кислотного опіку стравоходу, (ум.од./мл), (M±m, n=8)

	ММП-1	ММП-2	ММП-3	ММП-8	ММП-9
контроль	0,145±0,006	0,128±0,005	0,113±0,005	0,085±0,003	0,110±0,004
1 доба	0,303±0,012*	0,281±0,011*	0,174±0,007*	0,128±0,005*	0,154±0,006*
7 доба	0,214±0,009*	0,192±0,008*	0,178±0,007*	0,109±0,005*	0,176±0,007*
15 доба	0,250±0,009*	0,288±0,012*	0,183±0,007*	0,111±0,005*	0,134±0,005*
21 доба	0,311±0,013*	0,265±0,011*	0,217±0,009*	0,150±0,006*	0,186±0,007*

*- $p < 0,05$ порівняно з контролем

Таблиця 7

Вміст матричних металопротеїназ у сироватці крові за кислотного опіку стравоходу, (ум.од./мл) (M±m, n=8)

	ММП-1	ММП-2	ММП-3	ММП-8	ММП-9
контроль	0,104±0,004	0,105±0,004	0,079±0,003	0,055±0,002	0,045±0,002
1 доба	0,138±0,006*	0,192±0,008*	0,073±0,003	0,060±0,002	0,071±0,003*
7 доба	0,130±0,005*	0,148±0,006*	0,077±0,003	0,074±0,003*	0,067±0,003*
15 доба	0,120±0,005	0,190±0,008*	0,084±0,003	0,072±0,003*	0,077±0,003*
21 доба	0,110±0,004	0,141±0,006*	0,085±0,003	0,069±0,003*	0,075±0,003*

*- $p < 0,05$ порівняно з контролем

Масимальне підвищення вмісту ММП-1 у сироватці крові спостерігали на 1 добу після опіку, у 1,3 рази вище за контрольні значення. Протягом наступних термінів часу вміст ММП-1 поступово знижувався, але залишався вище контрольних значень. Тоді як у слизовій стравоходу вміст ММП-1 на 1 добу підвищився у 2,1 рази, на 7 добу цей показник дещо знизився, а на 15 та 21 доби вміст ММП-1 знову зростав. Максимальне значення вмісту ММП-1 у слизовій стравоходу ми спостерігали на 21 добу після травми, у 2,2 рази вище відносно контролю. ММП-1 синтезується фібробластами, хондроцитами, макрофагами, кератиноцитами, ендотеліальними клітинами і остеобластами [162]. Відомо, що значну активність ММП-1 проявляє в мікрооточенні ран, де

вона продукується фібробластами, макрофагами та іншими клітинами грануляційної тканини [163].

Вміст ММП-2 підвищувався на 1 та 15 доби після опіку у слизовій стравоходу у 2,2 та 2,3 рази, відповідно, а усироватці крові – у 1,8 порівняно з контрольними значеннями. Вміст ММП-3 у слизовій стравоходу постійно зростав протягом всього досліджуваного періоду, максимальне значення спостерігалось на 21 добу після опіку у 1,9 рази вище за контрольні значення. У сироватці крові вміст ММП-3 суттєво не змінювався, на 21 добу показник виріс у 1,1 рази відносно контролю.

Желатиназа А (ММП-2) розщеплює велику кількість молекул ЕЦМ і, відповідно, інгібує важливі процеси, такі як ангиогенез. Високий вміст ММП-2 може свідчити про роль даного ензиму у процесах ремоделювання матриксу, а також, можливо, резорбції рубців. ММП-2 перш за все експресується в мезенхімальних клітинах (головним чином в фібробластах) в період розвитку і регенерації тканини. Також синтезується нейтрофілами, макрофагами і моноцитами. Вона приймає участь у процесах пригнічення запалення, впливаючи на процесінг цитокінів/хемокінів [164]. ММП-3 каталізує деградацію багатьох компонентів сполучної тканини, включаючи протеоглікани, колаген, ламінін і фібронектин. Вона секретується, як профермент і активується в природних умовах через обмежений протеоліз тканинними і плазматичними ендопептидазами [165]. ММП-3 відіграє важливу роль в природних процесах тканинного ремоделювання і патологічних процесах. Низький вміст ММП-3 при загоєнні ран може свідчити про створення загрози формування надлишкових проліферативних процесів з розвитком стійких фіброзних деформацій [166]. Окрім цього, ряд авторів опублікували дані, які підтверджують участь ММП-2 та ММП-3 у загоєнні післяопікових ран [167, 168].

Дослідження вмісту ММП-8 у слизовій стравоходу виявило підвищення показника у 1,5 рази на 1 добу. На 7 та 15 доби вміст ММП-8 дещо

знижувався, але залишався вище контрольних значень. Максимальне підвищення показника спостерігали на 21 добу, у 1,8 рази вище контролю. У сироватці крові вміст ММП-8 був вище контрольних значень протягом усього дослідженого періоду. Найвище значення даного показника спостерігали на 7 добу, у 1,4 рази вище за контроль. Подібна тенденція спостерігалась при дослідженні вмісту ММП-9. Вміст даної металопротеїнази в слизовій стравоходу зростав, на 1 добу у 1,4 рази та у 1,6 рази на 7 добу після опіку. На 15 добу вміст ММП-9 дещо знизився, але був вище контрольних значень. У слизовій оболонці стравоходу максимальне значення вмісту ММП-9 виявлено на 21 добу, у 1,7 рази вище контрольних значень. Вміст ММП-9 у сироватці крові був вище контрольних значень на 1 добу у 1,6 рази, а на 7 - у 1,5 рази. Найвище значення даний показник мав на 15 та 21 доби, у 1,7 раз вище за контроль.

Отримані результати, щодо підвищення вмісту ММП-8 можуть свідчити про суттєву роль даної протеїнази у модулюванні запальної відповіді за КОС. ММП-8 є ключовим ферментом початкових етапів руйнування ЕЦМ, особливо при патологічних запальних процесах [169]. ММП-8 може розщеплювати такі білки, як фібронектин, хрящовий агрекан і серпіни, а також пептиди типу ангіотензину і субстанції Р. [163]. Синтез і реалізація активності ММП-8 ендотеліальними клітинами, гладком'язовими клітинами і макрофагами в місцях хронічного запалення потребує впливу прозапальних цитокінів [170].

ММП-9 приймає участь у процесах запалення, ремоделювання тканин та репарації, мобілізації матриксзв'язаних факторів росту та процесінгу цитокінів. Ця ММП сприяє ангіогенезу через вивільнення ангіогенних факторів, пов'язаних з позаклітинним матриксом, таких як VEGF. ММП-9 разом з ММП-2 проявляють свою активність в процесі ангіогенезу та ініціюють утворення судин на початковій стадії васкуляризації [163]. ММП-8 та ММП-9 здатні розщеплювати молекули колагену на невеликі фрагменти [161]. Загоєння ран - це складний процес, що вимагає, щоб сигнальні молекули

і їх рецептори, з'являлися в потрібний час і в потрібному місці. Тому металопротеїнази, здатні розрізати і трансформувати всі ці молекули, змінюючи їх активність.

Отже, найбільше підвищення вмісту досліджуваних ММП спостерігали на 21 добу експерименту, що може свідчити про розвиток запального процесу.

Найбільш універсальним механізмом регуляції протеолізу є контроль, який здійснюють інгібітори протеїназ.

Інгібіторна активність плазми крові переважно представлена α_1 -антитрипсином протеїназ (α_1 -АТ) та α_2 -макроглобуліном (α_2 -МГ). α_1 -АТ - глікопротеїн, який належить до серинових протеїназ (серпінів). Він забезпечує 70% всієї антитрипсинової активності сироватки або плазми [172]. α_1 -АТ ефективно пригнічує активність трипсину, хімотрипсину, плазміну, тромбіну, еластази, калікреїну, бактеріальних протеїназ та є маркером гострої фази запалення [173].

α_2 -МГ є універсальним інгібітором, що здатний впливати на активність майже всіх протеолітичних ферментів. Відомі також такі функції α_2 -МГ як інгібування протеїназ, активація внутрішньоклітинних шляхів сигнальної трансдукції, регуляція системи імунітету [174].

Нами було досліджено активність α_2 -МГ та α_1 -АТ у плазмі крові щурів за КОС (рис. 16 та 17).

У тварин за умов КОС активність α_1 -АТ була достовірно високою протягом всього експерименту. Так, на 1, 7, 15 та 21 доби активність даного інгібітору зросла в 1,5; 2,2; 1,6 та 1,3 рази, відповідно, порівняно з контрольними значеннями.

Тоді, як активність α_2 -МГ за кислотного опіку стравоходу мала різнонаправлений характер. Так, на 1 та 15 доби спостерігалось зниження даного показника відносно контролю у 2,8 та 1,2 рази, відповідно.

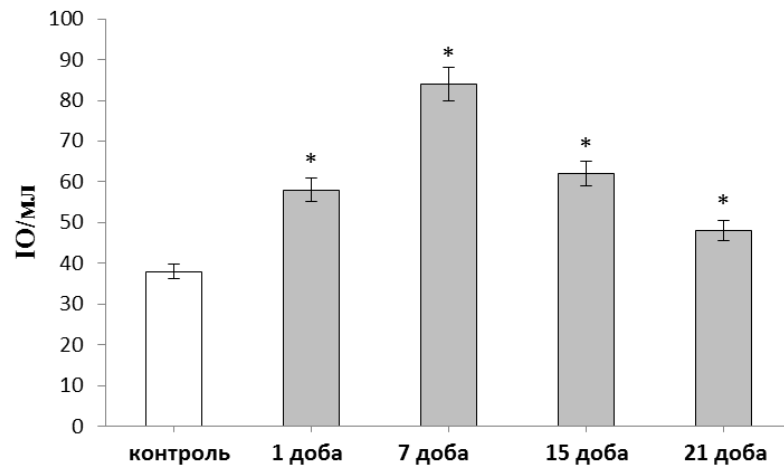


Рис. 16. Активність α_1 -антитрипсину (ІО/мл) у сироватці крові щурів за кислотного опіку стравоходу ($M \pm m$, $n=8$)

*- $p < 0,05$ порівняно з контролем

На 7 та 21 доби показано максимальне підвищення активності даного інгібітора, в середньому у 1,4 рази, порівняно з контрольними значеннями. Підвищення активності α_2 -МГ на 21 добу після опіку може свідчити про подальший розвиток запалення та інфекційних процесів в рані.

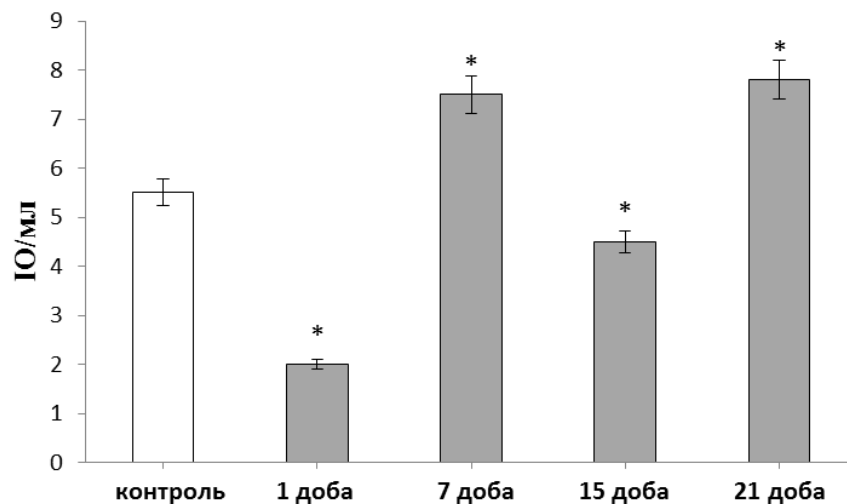


Рис. 17. Активність α_2 -макроглобуліну (ІО/мл) у сироватці крові щурів за кислотного опіку стравоходу ($M \pm m$, $n=8$)

* - $p < 0,05$ порівняно з контролем

α -2-МГ синтезується практично всіма клітинами - гепатоцитами, гемопоетичними клітинами, фібробластами, миоцитами, епітеліальними і нервовими клітинами. Збільшення концентрації α -2-МГ, пов'язаного з протеїназами, сприяє апоптозу пошкоджених клітин, регуляції активності фагоцитів і направлено на локалізацію вогнища некрозу. При цьому подальше пригнічення антиоксидантних механізмів на тлі імуноактивації може призводити до зниження фізіологічної стійкості організму [175].

Вміст ММП регулюється специфічними інгібіторами, одним з них є тканинний інгібітор матриксних металопротеїназ (ТІМП). ТІМП пригнічує активність ММП в молярному співвідношенні 1:1, з утворенням стійких нековалентних комплексів. Порушення балансу в співвідношенні ММП і ТІМП приводить до протеолітичних процесів в тканинах [176]. ТІМП-1 є універсальним інгібітором більшості ММП [176, 177].

Ми визначали вміст ТІМП-1 у слизовій оболонці стравоходу та сироватці крові після моделювання кислотного опіку стравоходу (рис.18). У слизовій стравоходу вміст ТІМП-1 зростав протягом усього експерименту. На 1 та 7 доби після опіку даний показник був вище за контроль у 1,4 та 1,6 рази, відповідно. На 15 добу вміст даного показника дещо знизився, але був вище за контроль у 1,2 рази. Найвище значення нами було відмічено на 21 добу після моделювання опіку стравоходу, у 1,9 рази вище за контрольні значення.

У сироватці крові вміст ТІМП-1 на 1 та 7 доби після опіку був нижче контрольних показників в середньому у 1,2 рази. На 15 та 21 доби даний показник підвищувався до контрольного рівня.

У нормі процеси синтезу і деградації колагену в тканинах врівноважені завдяки збалансованій дії системи матриксних металопротеїназ та їх тканинних інгібіторів. Порушення процесу загоєння післяопікових ран є причиною надмірного синтезу колагену, який спричинений дисбалансом у співвідношенні ММП та ТІМП [176].

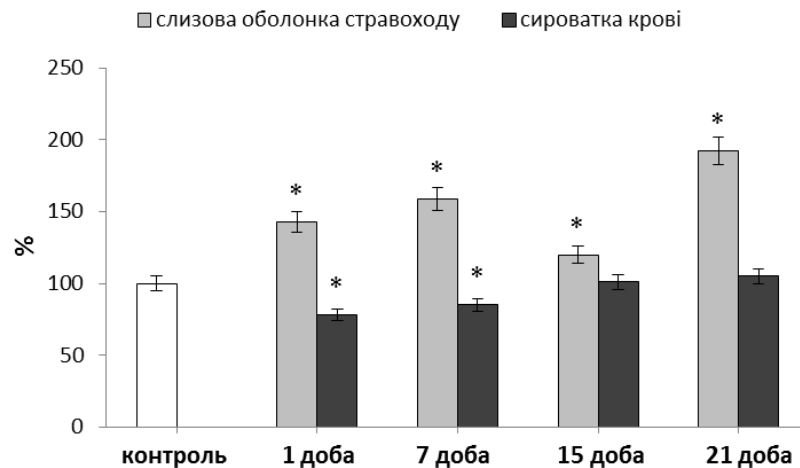


Рис. 18. Відносний вміст ТІМП-1 у слизовій оболонці стравоходу та сироватці крові за кислотного опіку стравоходу ($M \pm m$, $n=8$)

*- $p < 0,05$ порівняно з контролем

При дисбалансі протеїназ та інгібіторів з переважанням протеолітичної активності деградація білків міжклітинної матриксу триває, що свідчить про продовження хронічного запалення. Некерована протеїназна активність є одним з головних патологічних механізмів незаживаючих ран. Надмірна кількість протеїназ згубно впливає на колаген, таким чином, запобігаючи формуванню рубця, а продукти розпаду стимулюють подальше запалення.

З літературних джерел відомо, що ТІМП-1 має функції, які не залежать від його інгібуючих властивостей, пов'язаних з ММП. Він має потенціал еритроїдної дії, антиангіогенний і профібротичний потенціали, тощо. При сепсисі він може активувати нейтрофіли і захищати їх від апоптозу [178]. Тому можна припустити, що ТІМП-1 є загальним маркером гострого запалення. Дані деяких досліджень свідчать, що рівень тканинного інгібітора металопротеїназ, а саме ТІМП-1 з'являється і зростає саме у хронічних ранах [163].

Ефектором фази регенерації тканин є фібробласти. На другу- третю добу після ушкодження, численними факторами зростання запускається міграція

фіброblastів до місця пошкодження і подальша їх проліферація. Паралельно проліферації фіброblastів відбувається новоутворення судин - ангиогенез. Фіброblastи є найбільш важливими клітинами, що беруть участь у ремоделюванні позаклітинного матриксу, а також однією з основних клітин-мішеней фактору росту фіброblastів (FGF) при загоєнні ран [179]. Основний фактор росту фіброblastів (bFGF) володіє вираженою здатністю посилювати утворення сполучної тканини і судинних капілярів, а також приймає участь у регенерації тканин [180].

Нами було визначено вміст bFGF за опіку стравоходу (рис.22). Показано зростання вмісту bFGF протягом експерименту. За КОС відбулося поступове зростання показника з максимальним підвищенням на 21 добу у 1,8 рази порівняно з контролем. Виключенням є 15 доба, в указаний період вміст bFGF знижувався до контрольного, що корелює з рівнем MMP та TIMP в даний термін.

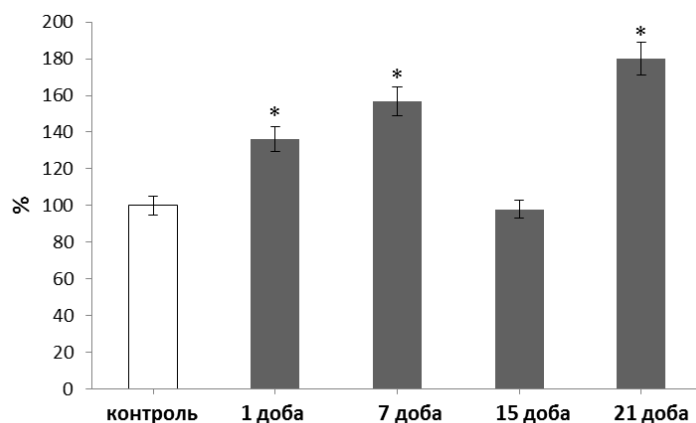


Рис. 19. Відносний вміст bFGF у слизовій оболонці стравоходу за кислотного опіку стравоходу ($M \pm m$, $n=8$)

*- $p < 0,05$ порівняно з контролем

Згідно літературних даних, bFGF синтезується в шкірі навколо судин. Ендотеліоцити та фіброblastи приймають участь у синтезі фактору росту за ушкодження тканин [179]. Також, ангиогенез, опосередкований bFGF,

відбувається шляхом активації c-Jun N-кінцевої кінази/стрес-активованої протеїнкінази. Інгібування bFGF призводить до зниження міграції фібробластів і затримки загоєння ран, в той час як застосування рекомбінантного bFGF прискорює загоєння ран [181].

Отже за кислотного опіку стравоходу відбувалась підвищення загальної протеолітичної активності, активності серинових протеїназ та металопротеїназ у плазмі крові на 7 добу після опіку та наступне зниження активності даних протеїназ нижче контрольного рівня починаючи з 15 доби після опіку. Найбільш суттєві зміни вмісту ММП у слизовій оболонці стравоходу відбувались на 7 та 21 доби після опіку, а у сироватці крові – на 1 та 15 доби. На 7 та 21 доби у сироватці крові відбувалось підвищення активності α -2-МГ, в той час як максимальне значення активності α -1-АТ спостерігали на 7 добу експерименту. Вміст у слизовій оболонці стравоходу TIMP-1 та bFGF, що контролюють роботу ММП, максимального значення набував на 21 добу після опіку. Такі зміни свідчать про дисбаланс системи протеолізу ЕЦМ.

3.3.2. Дослідження вмісту шаперонів та активності протеасом у тканині стравоходу за кислотного опіку стравоходу

Протеоліз білків в цитоплазмі здійснюється складною багатокомпонентною системою, до складу якої входять поліферментний комплекс протеасома, а також шаперони.

Шаперони - універсальні консервативні білки, які зв'язують інші білки і стабілізують їх конформацію. Вони мають АТФ-азну активність і гідролізують АТФ, забезпечуючи енергією процес згорання поліпептидного ланцюга.

До шаперонів відносяться цитозольні Hsp70 та Hsp60. Вони стимулюють і стабілізують різні сигнальні шляхи, впливають на імуномодуляцію, і забезпечують захист клітин, перешкоджаючи накопиченню денатурованих і неправильно згорнутих білків.

Вміст Hsp 60 (рис.20) на 1 та 7 доби був дещо нижче за контроль, але не достовірно. На 15 добу він почав зростати, і на 21 добу перевищив контрольні значення у 1,1 рази.

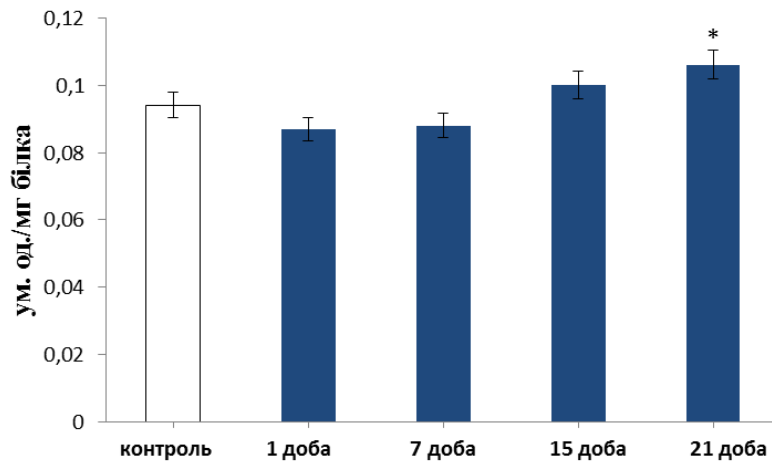


Рис. 20. Вміст шаперону Hsp 60 у тканині стравоходу щурів за кислотного опіку стравоходу ($M \pm m$, $n=8$)

* $p < 0,05$ порівняно з контролем

Вміст Hsp 70 (рис.21) був нижчий за контроль протягом всього досліджуваного періоду.

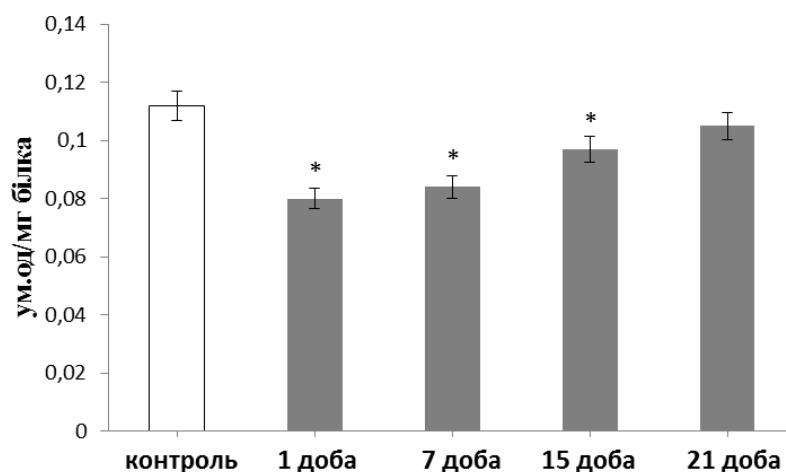


Рис. 21. Відносний вміст шаперону Hsp 70 у тканині стравоходу щурів за кислотного опіку стравоходу ($M \pm m$, $n=8$)

* $p < 0,05$ порівняно з контролем

На 1 добу даний показник був у 1,4 рази нижчий за контроль. На 7 добу почав зростати і максимальне значення вмісту Hsp 70 ми спостерігали на 21 добу після опіку, у 1,1 рази нижче за контроль. В умовах стресу (окисного, теплового, хімічного) спостерігається масоване пошкодження білкових молекул, шаперони мобілізуються на виправлення білків, які втратили правильну тривимірну структуру, і рівень Hsp знижується нижче критичного для ефективного контролю згортання синтезованих *de novo* поліпептидних ланцюгів [80].

Hsp60 - це молекулярний шаперон, який бере участь в фолдінгу і збірці мітохондріальних білків та полегшує протеолітичну деградацію білків, що неправильно згорнулися або денатуровані. В той час як, Hsp70 переважно зв'язується з білками, які не згорнулися або частково згорнулися, і запобігає їх агрегації або неправильному фолдінгу. Welch і Suhan [182] проаналізували зміни синтезу Hsp 70 і загального синтезу клітинних білків після теплового шоку. Вони показали, що максимальна експресія Hsp70 в клітинах спостерігається через 7-8 години після закінчення теплового шоку і підтримується на високому рівні ще 4-5 години. Через 24 години після шоку експресія Hsp70 значно знижується.

Hsp 60 та Hsp 70 є АТФ-залежними білками. Очевидно, що зниження їх вмісту свідчить про зниження вмісту АТФ на початку опікової хвороби. Наслідком викликаних опіком уражень є порушення метаболічних процесів поєднане зі зміною структури білків та ініційоване при цьому порушення окисно-відновних процесів, що посилює глікогеноліз та активує розпад вуглеводів. Опік стравоходу викликає денатурацію білків у місці опіку та сприяє порушенням біохімічних процесів, в яких утворюється АТФ. Але згодом, включаються молекулярно-біохімічні механізми адаптації та запускаються компенсаторні шляхи синтезу АТФ та регуляторних білків (Hsp 60 та Hsp 70).

Отримані дані узгоджуються з літературними даними. Так, при дослідженні вмісту АТФ та глюкозо-6-фосфату рогівки ока за моделювання лужного опіку, автори виявили зниження більше ніж в 2 рази концентрації АТФ та зниження в 1,2 рази вмісту глюкозо-6-фосфату в період до 7 доби. Таке зниження, як зазначають автори, свідчить про різке порушення процесів окисного фосфорилування в мітохондріальних структурах та активації метаболізму глюкози в цитозолі [183].

Інша група дослідників вивчала вплив зміни активності вакуолярної АТФази (V-АТФази) лізосоми серцевого м'яза на пошкодження міокарду у щурів після тяжкого опіку. Автори зазначили, що величина активності V-АТФази лізосоми міокарда у щурів опікової групи була значно нижчою, ніж величина в контрольній групі [184].

Отже, опік стравоходу сприяє зниженню кількості АТФ, що веде до порушення роботи шаперонів та сприяє руйнуванню білків в процесі протеолізу.

Поєднання фолдингу з протеолізом є однією з найважливіших умов адаптації та виживання клітин в екстремальних умовах довкілля. Якщо третинна структура білків не може бути відновлена, вони руйнуються клітиною. Особливим типом протеїнази є протеасома, велика мультисубодинична протеаза, яка має велике значення в механізмах розвитку різних захворювань. Протеасоми приймають участь у деградації білків та впливають на більшість клітинних процесів, в тому числі на проліферацію і репарацію ДНК [77].

Процеси, що виникають за опікової рани, викликають послідовність локальних і системних реакцій, які впливають на виживання клітин і тканин і, отже, загоєння ран і відновлення. Протеасоми є первинними сайтами для деградації білка в клітинах ссавців. Кожна протеасомальна частка містить два типи хімотрипсинових, два трипсиноподібних і два каспазоподібних протеолітичних сайта. Володіючи хімотрипсиноподібною (ХТП) (гідролиз

після гідрофобних та ароматичних амінокислот Leu, Tyr, Phe), трипсиноподібною (ТП) (гідроліз після позитивно заряджених Lys та Arg) і каспазоподібною (КП) активностями (гідроліз після негативно заряджених Asp та Glu), протеасома забезпечує модифікацію білків і впливає, таким чином, на їх функціональну активність [77].

В результаті дослідження активності протеасом за кислотного опіку стравоходу ми виявили ряд змін (табл 10).

Таблиця 8

Хімотрипсиноподібна та каспазоподібна активність протеасом у стравоходах щурів за кислотного опіку стравоходу (ум.од./мг білка *хв),
M±m, n=5

		контроль	1 доба	7 доба	15 доба	21 доба
ХТП активність	20s	3,09±0,14	2,19±0,09*	10,18±0,46*	13,19±0,59*	7,06±0,32*
	26s	6,41±0,29	2,24±0,11*	11,60±0,52*	14,82±0,67*	9,27±0,42*
КП активність	20s	0,53±0,02	1,10±0,05*	2,01±0,09*	2,25±0,11*	3,62±0,16*
	26s	0,92±0,04	2,01±0,09*	4,27±0,19*	3,84±0,17*	6,43±0,29*

*- p<0,05 порівняно з контролем

ХТП загальна активність протеасом (26s) на 1 добу після КОС значно знизилась, у 2,9 рази відносно контролю. На 7 і 15 доби після опіку спостерігалась тенденція до підвищення ХТП активності у 1,8 та 2,3 рази відповідно, в порівнянні з контролем. На 21 добу даний показник починає знижуватися, але лишається вищим за контроль, у 1,4 рази. Подібна тенденція спостерігалась при дослідженні ХТП активності каталітичного центру 20s. На 1 добу даний показник був нижче за контроль у 1,1 рази, на 7 та 15 доби ХТП активність була значно вище за контроль, у 3,3 та 4,3 рази, відповідно. На 21 добу ХТП активність 20s протеасоми дещо знизилась, але була значно вищою за контрольні значення, у 2,3 рази.

КП активність протеасом 26s та 20s мали тенденцію до зростання протягом усього досліджуваного терміну. Так, на 1 добу після КОС спостерігалось підвищення активності у 2,1 рази для 26s протеасоми та у 2,2 рази для 20s відносно контролю. На 7, 15 та 21 доби відбувалось подальше підвищення КП активності. Так, для 26s та 20s протеасоми максимальне значення даного показника відмічено на 21 добу, в середньому у 7 разів вище за контроль.

Різниця між загальною 26s та 20s активністю протеасом обумовлена АТФ-залежним протеолізом убіквітинованих білків в 26s протеасомі. 20s протеасома здатна проявляти свою активність як при убіквітин-залежному так і убіквітин-незалежному протеолізі, гідролізуючи малі пептиди та деякі денатуровані білки. Також 20s каталітичний центр протеасоми володіє широким спектром пептидгідролазної активності. При гідролізі поліпептидного ланцюга спочатку активується ХТП сайт, який розщеплює його на пептидні фрагменти, потім цей ХТП сайт аллостерично інактивується і КП сайт розщеплює пептиди, що утворилися на першій стадії, на більш дрібні фрагменти, після чого активні центри звільнюються і цикл повторюється [78].

Згідно літературних даних, статистично значуще підвищення активності протеасоми в плазмі відзначалося у всіх групах дітей через 12-16 годин після термічного опіку [77]. Підвищення протеасомної активності сприяє утворенню фіброзу в післяопікових ранах. Фіброз це надмірне і стійке утворення рубцевої тканини, що виникає в результаті гіперпроліферативного росту фібробластів, і пов'язано з активацією сигнального шляху TGF- β . Як правило, рівень внутрішньоклітинного сигнального білка (Smad), який активує транскрипцію генів-мішеней при стимуляції TGF- β , регулюється протеасомною активністю [185]. Лікування опікових хворих часто ускладнено через фіброз, тому все більше набуває популярності розробка засобів з використанням інгібіторів протеасоми, як способу запобігання або зменшення рубцювання [183].

Отже, отримані данні свідчать про те, що у стравоходах щурів після кислотного опіку II ступеня зростає активність протеасом. Таке збільшення протеасомної активності обумовлене посиленням процесів внутрішньоклітинного протеолізу в опікових ранах. Потрібно також зазначити, що найбільш суттєві зміни виявлені для КП активності протеасом.

Таке надмірне функціонування системи протеолізу призводить до посиленої деградації білкових молекул. Тому наступним етапом нашого дослідження було визначення як змінюється білковий склад тканин щурів за кислотного опіку стравоходу, оскільки визначення присутності тих чи інших білкових фракцій може бути використано для оцінки стану організму.

3.3.3. Зміни білкового складу сироватки крові та слизової оболонки стравоходу за кислотного опіку стравоходу статевонезрілих щурів

Змінами кількісного і якісного співвідношення білків крові супроводжуються майже всі патологічні стани, а також вроджені дефекти синтезу білків. Такі порушення можуть проявлятися зміною загальної кількості білків (гіпопротеїнемія, гіперпротеїнемія) або співвідношенням окремих, в тому числі і білкових фракцій (диспротеїнемія), на тлі нормальної концентрації загального білка в крові. Методом електрофорезу визначають не лише білковий склад крові, а і стан гуморальної ланки імунітету, гостре або хронічне запалення, нефротичні процеси, внутрішньосудинний гемоліз [186].

Електрофорез як біохімічний метод - дуже потужне пристосування для оцінки широкого спектру життєвих процесів. Білки сироватки крові можна розділити на основні фракції: альбумінові та глобулінові.

Так, при гострому запаленні, яке характеризується локалізованою біохімічною відповіддю (активація комплементу) і реакцією на клітинному рівні (мобілізація фагоцитів, збільшення синтезу протеїнів), відбувається збільшення вмісту фракцій α -1, α -2 глобулінів та фібриногену. При хронічному запаленні спостерігається збільшення фракції α -2 глобулінів і

незначне збільшення β -глобулінів. При цьому відмічається зниження альбумінової фракції на тлі збільшення фракції γ -глобулінів. Захворювання печінки можуть супроводжуватися зниженням фракцій альбуміну та α -глобуліну, оскільки за такими захворюваннями порушується функція синтезу білку. При захворюваннях нирок, за яких характерна втрата великої кількості альбуміну у зв'язку з порушенням фільтраційної здатності нирок, спостерігається збільшення у крові рівнів високомолекулярних протеїнів (макроглобулін, IgM, ліпопротеїни). При цьому виявляється істотне зниження вмісту фракцій альбуміну та збільшення вмісту фракцій α -1 та α -2-глобулінів. Таким чином, "протеїновий профіль" відображає основні патологічні процеси при захворюваннях.

У зв'язку з цим є актуальним дослідження складу білків сироватки крові та тканини стравоходу за КОС, оскільки отримані дані дозволять розширити уявлення про метаболічні процеси в організмі, викликані надмірною активацією протеолізу.

Проведені дослідження електрофоретичного аналізу білків показали кількісні зміни вмісту фракцій, як у сироватці крові, так і у слизовій оболонці стравоходу [187].

У сироватці крові виявлено наявність білкових фракцій з молекулярною масою від 15 до 168 кДа (табл. 9).

Так, нами було показано зростання вмісту фракції з молекулярною масою (М.м.) \sim 168 кДа у сироватці крові на 1, 7 та 21 доби моделювання КОС у 1,2; 1,7 та 1,2 рази, відповідно, а також зниження її вмісту на 15 добу у 1,1 рази. Крім того, встановлено збільшення вмісту фракції з М.м. \sim 150 кДа на 7, 15 та 21 доби експерименту у 1,3; 1,6 та 2,1 рази, відповідно, порівняно з контрольними значеннями. Дані білкові фракції сироватки крові можуть відповідати фракції імуноглобулінів. З літературних джерел відомо, що вміст імуноглобулінів збільшується за опікової хвороби в перші тижні після

травми [188]. Згідно інших досліджень, опікова хвороба викликає довготривале зниження вмісту імуноглобулінів [189].

Таблиця 9.

Вміст білкових фракцій у сироватці крові щурів за кислотного опіку стравоходу, (мкг/мг білка) ($M \pm m$, $n=5$)

Білкові фракції М.м.(кДа)	контроль	1 доба	7 доба	15 доба	21 доба
~168	86,8 ± 2,5	101,6±0,8*	143,0±6,9*	80,8±3,8*	106,0±4,2*
~150	156,7±3,7	152,7±5,9	203,9±7,9*	247,0±8,1*	323,0±12,9*
~130	449,2±28,9	548,9±20,3*	468,4±16,4	231,6±7,1*	115,9±3,2*
~113	60,8±2,8	66,0±3,4	58,5±2,3	69,4±2,8*	30,6±1,4*
~103	185,2±11,7	61,2±2,5*	42,8±1,7*	25,7±1,02*	46,6±1,9*
~89	126,0±9,1	96,9±1,4*	84,0±0,2*	98,0±0,4*	46,0±1,8*
~67	325,3±16,7	287,4±11,5*	189,3±7,6*	216,0±16,9*	270,0±10,8*
~55	221,0±9,7	122,6±4,9*	130,1±5,2*	97,8±3,9*	118,2±4,7*
~40	145,0±0,9	53,7±2,1 *	48,3±1,9*	37,2±0,69*	34,1±0,96*
~25	79,8±3,1	40,4±1,7*	39,1±2,6*	20,3±0,4*	26,2±0,05*
~15	74,5±1,9	53,2±2,1*	18,1±0,72 *	18,5±0,74 *	21,2±0,85 *

* $p < 0,05$ порівняно з контролем

Вміст білкової фракції сироватки крові з М.м. ~ 130 кДа зростав у 1,2 рази лише на 1 добу експерименту, на 15 та 21 доби даний показник знижувався у 2 та 4 рази, відповідно, порівняно з контрольними значеннями. Дана фракція може відповідати гострофазному білку церулоплазміну. Концентрація церулоплазміну в крові підвищується під час запалення, інфекцій та довготривалих травматичних станів [190].

Підвищення вмісту фракції з М.м. ~ 113 кДа на 1 та 15 доби після моделювання КОС у 1,1 та 1,2 рази, відповідно, може свідчити про гостру фазу запалення, оскільки дана фракція може відповідати С-реактивному білку [190]. Підвищений рівень цієї фракції може вказувати на розвиток запального процесу.

Встановлено різке зниження вмісту фракції з М.м ~ 103 кДа за КОС, вже на 1 добу, у 3 рази порівняно з контрольними значеннями. Також знижувався вміст фракції з М. м. ~ 89 кДа за КОС на 1 добу у 1,3 рази і у 2,7 рази на 21 добу після опіку. Вищевказані фракції можуть відповідати білкам гострої фази гаптоглобіну (~ 103 кДа) та плазміногену (89 кДа). Рівень гаптоглобіну в крові є маркером гемолізу еритроцитів. Так, при руйнуванні еритроцитів та вивільненні гемоглобіну відбувається зниження кількості гаптоглобіну. Зниження вмісту плазміногену пов'язане з використанням його в процесі вторинного фібринолізу, який розвивається у відповідь на внутрішньосудинне згортання крові [190], яке має місце за КОС.

Дослідження вмісту альбумінової фракції (~67 кДа) виявило зниження її вмісту на 1; 7 та 15 доби експерименту у 1,1; 1,7 та 1,5 рази, відповідно, що може вказувати на дисфункцію печінки, нирок або інших органів [188].

Також виявлено зниження вмісту преальбумінової фракції з М.м ~55 кДа протягом всього експерименту, в середньому у 1,9 рази, порівняно з контрольними значеннями. Преальбумін або транстиретин у клінічній практиці визначається при захворюваннях печінки, опіках та запальних процесах. Крім того, визначення рівня преальбуміну є найбільш чутливим критерієм для оцінки білково-енергетичної недостатності, що супроводжує критичні стани [188].

Дослідження вмісту інших фракцій сироватки крові виявило також зниження їх вмісту впродовж всього експерименту. Так, знижувався вміст фракції з М.м. ~ 40 кДа у 3-4 рази. Вміст фракцій М.м.~ 25 кДа знижувався у 2- 4 рази. А вміст фракції з М.м ~15 кДа - у 1,4- 4 рази, відносно контрольних значень. Фракція з М.м. ~ 40 кДа може відповідати α -1-кислому глікопротеїну, а фракція з М.м.~ 25 кДа – α -1-мікроглобуліну. Обидва білка синтезуються в печінці і зниження вмісту даних фракцій може бути обумовлено порушеннями роботи даного органу. Фракція з М.м ~15 кДа може відповідати вмісту лізоциму, який є фактором неспецифічної резистентності, антибактеріальним

ферментом. Його вміст знижується за тяжких опіків та травм при хронізації запального процесу за рахунок недостатності фагоцитозу [152].

Отже, дослідження електрофореграми сироватки крові щурів з КОС виявило зменшення вмісту альбумінової фракції на тлі підвищення вмісту глобулінової фракції.

За КОС процеси деградації білків відбуваються і у тканині стравоходу щурів. Білковий склад тканини стравоходу мало досліджений. Згідно літературних даних, слизова оболонка стравоходу людини містить багато глікопротеїнів. Серед структурних білків плоского епітелію виділяють кератин (кератин 4, кератин 6, кератин 13 і кератин 32) та кальцій зв'язуючі білки корнулін і S100A14, функція яких полягає в забезпеченні структурної цілісності клітин. Кератин 13 та муцин 21 в основному експресуються в епітелії слизової оболонки. Муцинові епітеліальні клітини стравоходу збагачені ферментом алкогольдегідрогеназою-7 [191].

У слизовій оболонці стравоходу щурів електрофоретичне дослідження білків виявило наявність фракцій з молекулярною масою від 126 кДа до 34 кДа (табл. 10).

Таблиця 10

Вміст білкових фракцій у слизовій оболонці стравоходу щурів за кислотного опіку стравоходу, (мкг/мг білка) ($M \pm m$, $n=5$)

Білкові фракції М.м.(кДа)	Контроль	1 доба	7 доба	15 доба	21 доба
~126	4,79±0,1	2,13±0,1*	5,00±0,1	2,37±0,1*	5,39±0,1*
~110	3,45±0,1	1,93±0,1*	4,87±0,1*	3,57±0,1	3,50±0,1
~87	8,97±0,2	2,01±0,1*	7,20±0,2*	8,39±0,2*	8,56±0,2
~74	5,87±0,1	6,13±0,2	17,8±0,5*	2,79±0,1*	2,52±0,1*
~55	4,54±0,1	2,67±0,1*	8,44±0,3*	8,13±0,2*	4,51±0,1
~52	2,91±0,1	1,85±0,1*	4,93±0,1*	7,75±0,2*	6,47±0,2*
~34	3,70±0,1	3,23±0,1*	16,9±0,5*	5,35±0,1*	8,18±0,2*

*- $p < 0,05$ порівняно з контролем

Було показано зниження вмісту фракцій слизової оболонки стравоходу з М.м. ~126 кДа на 1 та 15 доби у 2,3 та 2 рази, відповідно, відносно контролю. На 7 та 21 доби вміст даної фракції підвищувався в середньому у 1,1 рази. Дана фракція ~126 кДа може відповідати центросомним білкам, які відіграють вирішальну роль в основних клітинних функціях, таких як ділення клітин та внутрішньоклітинний транспорт. Зміни вмісту даної фракції, напевно, пов'язані з пошкодженням або загоєнням стравоходу в певні терміни часу після опіку. Слід зазначити, що до центросомних білків належать цетрин, глобулін, тубулін, р53, шаперони та інші.

Вміст фракції з М.м. ~110 кДа знижувався на 1 добу після опіку у 1,8 рази відносно контрольних значень. На 7 добу вміст даної фракції був вищим за контроль у 1,4 рази, на 15 та 21 доби - знизився до контрольних показників. Подібна тенденція спостерігалась для фракції з М.м. ~87 кДа. На 1 добу після КОС відбувалось суттєве зниження вмісту фракції у 4,5 рази, на 7 добу вміст фракції нижче контрольного значення у 1,3 рази, а на 15 та 21 доби даний показник піднявся до рівня контрольних значень. Показано підвищення вмісту фракції з М.м. ~ 74 кДа на 7 добу у 3 рази за кислотного опіку. На 15 та 21 доби експерименту вміст зазначеної фракції різко знижувався і був у 2,1 та 2,4 рази нижче від контрольних показників. Отримана фракція з М.м. ~110 кДа може відповідати білку теплового шоку Hsp 110, фракція з М.м. ~87 кДа – Hsp 90, а фракція з М.м. ~ 74 кДа – Hsp 70. Особливо важливу роль відіграють шаперони при пошкодженнях тканин, коли порушується структура білків. Згідно літературних даних, роль молекулярних шаперонів вивчалася за різних патологій [79]. Більш високу експресію Hsp 110 вважають поганим прогностичним фактором у випадках пацієнтів з меланомою, плоскоклітинною карциномою, раком шлунку або стравоходу. Члени сімейства Hsp 90 відомі своєю антиапоптичною дією та відіграють критичну роль в протеолітичній деградації. Вміст Hsp 70 може корелювати із ступенем опіку [80].

Згідно аналізу електрофореграм слизової оболони стравоходу за КОС відбувались зміни вмісту фракції з М.м. ~55 та 52 кДа. Встановлено підвищення вмісту фракції з М.м. ~55 на 7 та 15 доби у 1,9 та 1,8 рази відповідно, тоді як на 1 добу цей показник був нижче контрольного у 1,7 рази. Показано також підвищення вмісту білкової фракції з М.м. ~ 52 кДа на 7, 15 та 21 доби у 1,7; 2,7 та 2,2 рази, відповідно. На 1 добу вміст даної фракції також був нижче контрольного показника у 1,6 рази. Зазначені фракції можуть відповідати кератинам. Розрізняють два типи кератинів: I тип (кислі з М.м. ~40-55 кДа) та II тип (нейтральні та лужні з М.м. ~56-70 кДа). Кератин-4 (57 кДа) експресується в епітелії слизової оболонки стравоходу разом з кератином-13 (48 кДа). Зниження експресії кератину-4 пов'язують з карциномою голови та шиї. Таку тенденцію використовують для диференціації плоскоклітинного раку стравоходу. Кератин-6 (59 кДа) бере участь у загоєнні ран, а саме в активації кератиноцитів після поранення, але він не відіграє ключової ролі в проліферації кератиноцитів або міграції. Кератин-17 (48 кДа) приймає участь у гоєнні ран. Виступає в ролі промотора епітеліальної проліферації та регулятора імунної відповіді в шкірі. З літературних джерел відомо, що кератин-5 (58 кДа) та кератин-14 (50 кДа) приймають безпосередню участь у реепітелізації ран. Тому, підвищення вмісту даних фракцій може свідчити про епітелізацію опікової рани [191].

Вміст фракції з М.м. ~ 34 кДа підвищувався на 7, 15 та 21 доби експерименту у 4,6; 1,5 та 2,2 рази, відповідно, відносно контролю. Вказана фракція може відповідати факторам росту фібробластів. Фактор росту ендотелію судин (VEGF) є білком з М.м. 34-42 кДа. VEGF є важливим сигнальним білком, який приймає участь у ангиогенезі. Він стимулює міграцію моноцитів/макрофагів, нейронів та інших клітин [192].

3.3.4. Молекули середньої маси у тканинах щурів за кислотного опіку стравоходу

У результаті активації протеолізу в пошкоджених тканинах, а також в плазмі, при виході в кров протеолітичних ферментів, відбувається накопичення продуктів деградації білків з молекулярною масою 0,3-5 кДа. У літературі клас середньомолекулярних продуктів протеолізу називають молекулами середньої маси (МСМ). Хімічний склад МСМ дуже неоднорідний і об'єднує гетерогенну групу речовин. Він включає пептиди, глікопептиди, нуклеопептиди, ендорфіни, аміноцукри, поліаміни, багатоатомні спирти, деякі гуморальні регулятори - інсулін, глюкагон, деякі вітаміни, нуклеотиди, олігосахариди, похідні глюкуронових кислот і інші.

Показник рівня МСМ є біохімічним маркером, який відображає рівень патологічного білкового метаболізму. МСМ поділяються на дві великі групи - речовини середньої молекулярної маси та олігопептиди [194]. Перша група це небілкові похідні різної природи, що накопичуються в організмі в концентраціях, що перевищують норму. Друга група - олігопептиди - представлена речовинами пептидної природи, які виконують регуляторні і нерегуляторні функції.

Загальновідомо, що рівень МСМ варіює залежно від метаболічного стану організму і, в якійсь мірі, служить прогностичним критерієм порушення обмінних процесів. Особливістю МСМ є їх висока біологічна активність. Накопичення їх є не тільки маркером ендоінтоксикації, надалі вони посилюють перебіг патологічного процесу, набуваючи роль вторинних токсинів, що впливають на життєдіяльність всіх систем і органів [151].

Нами було визначено вміст МСМ в сироватці крові щурів [195] за умов експериментального моделювання КОС (рис.22). На 1 та 7 доби експерименту вміст даного показника підвищувався відносно контрольних значень у 1,2 та 1,1 рази, а на 15 і 21 доби ми спостерігали зниження показника у 1,3 та у 1,2 рази, відповідно.

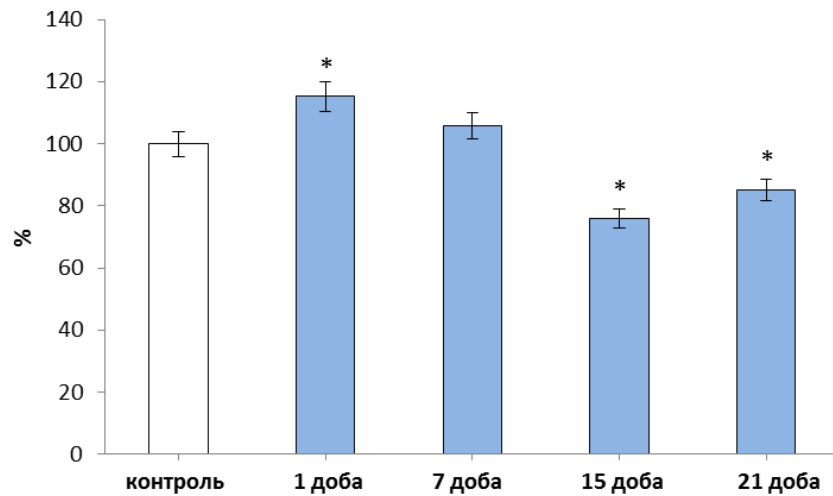


Рис. 22. Відносний вміст МСМ у сироватці крові щурів за кислотного опіку стравоходу ($M \pm m$, $n=8$)

* $p < 0,05$ порівняно з контролем

Підвищення вмісту МСМ на 1 добу може бути спричинено дією кислоти на тканину стравоходу або дією протеолітичних ферментів, що сприяє виходу з клітини великої кількості неспецифічних токсичних продуктів.

На 7 добу експерименту ми спостерігали зниження вмісту МСМ, що може свідчити про виведення токсичних продуктів через судинне русло із організму. Зниження вмісту МСМ на 15 та 21 доби може бути пов'язано з епітелізацією зони опікової рани.

Вміст МСМ у слизовій оболонці стравоходу (рис.23) на 1 добу експерименту був зниженим у 1,3 раза, порівняно з контролем. На 7 добу спостерігалась тенденція до підвищення вмісту показника, хоча значення ще лишились нижче контрольного рівня. Максимальне підвищення спостерігали на 21 добу після опіку, у 1,2 раза вище за контроль [196].

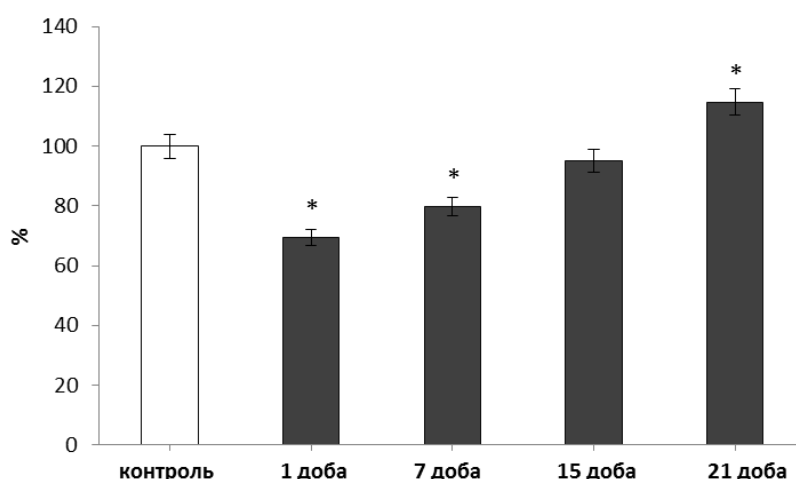


Рис. 23. Відносний вміст МСМ у слизовій оболонці стравоходу щурів кислотного опіку стравоходу ($M \pm m$, $n=8$)

* $p < 0,05$ порівняно з контролем

Високий вміст МСМ більш характерний для резорбційно-тканинної, ретенційної та мікробної інтоксикації. При ензимній інтоксикації рівень МСМ може бути практично в межах норми за рахунок високої активності протеїназ. Надмірне накопичення МСМ відбувається внаслідок деструкції тканин, порушення детоксикаційної функції органів і тканин [194].

В результаті численних досліджень було встановлено, що підвищення рівня МСМ в крові спостерігається при різних патологічних станах різної етіології та ступеню тяжкості: при шоккових станах, сепсисі, опіковій хворобі, травмах, ішемії органів і тканин, порушеннях процесів згортання крові та інших [197].

За умов експериментального моделювання КОС нами було визначено вміст олігопептидів у сироватці крові та слизовій оболонці стравоходу щурів (табл. 11).

У сироватці крові на 1 добу експерименту відбувалось підвищення досліджуваного показника у 1,3 рази відносно контролю. В наступні терміни дослідження відзначали тенденцію до зниження концентрації олігопептидів,

хоча показники були вірогідно вищі за контроль. На 21 добу даний показник був нижчим за контроль у 1,2 рази.

Таблиця 11.

Вміст олігопептидів у сироватці крові та слизовій оболонці стравоходу за кислотного опіку стравоходу (мг/мл) (M±m, n=10)

	Контроль	1 доба	7 доба	15 доба	21 доба
Сироватка крові	0,24±0,01	0,30±0,03*	0,29±0,01*	0,26±0,03*	0,20±0,01*
Слизова оболонка стравоходу	0,16±0,01	0,12±0,06	0,21±0,03*	0,26±0,03*	0,16±0,01

*p<0,05 порівняно з контролем

У слизовій оболонці стравоходу тенденція змін вмісту олігопептидів дещо відрізнялась від сироватки крові. На 1 добу після опіку вміст олігопептидів був нижчим за контроль у 1,3 рази. На 7 та 15 доби спостерігалось підвищення вмісту показника у 1,3 та 1,6 рази, відповідно. На 21 добу вміст олігопептидів знизився до контрольного рівня.

Вміст олігопептидів у сироватці крові та слизовій стравоходів позитивно корелює з загальним вмістом МСМ на 1 та 7 добу після опіку. Відповідної кореляції не спостерігається на 15 добу для сироватки крові та на 21 добу для слизової оболонки стравоходу. На цих термінах часу відмічено підвищення активності деяких ММП (табл. 6, 7), можливо в цей час відбувається утворення МСМ з перевагою речовин середньої молекулярної маси - небілкових похідних різної природи.

Отримані дані свідчать про підвищення активності протеолітичних процесів та накопичення продуктів деградації, що сприяє гіпоксії, розвитку інтоксикації організму та розладів гемодинаміки та веде до порушення функціонування органів і тканин. МСМ є основними токсичними субстратами, які можуть впливати на життєдіяльність всіх органів і систем, а також здатні

з'єднуватися з рецепторами будь-якої клітини і блокувати їх, неадекватно впливаючи на її метаболізм і функції.

Отже, метод електрофорезу дозволяє розділити білки на основні фракції, що дає змогу оцінити якісний білковий склад тканин за КОС, оскільки будь-яка хвороба супроводжується змінами білкового складу організму. Нами було показано, що за кислотного опіку стравоходу відбуваються кількісні зміни вмісту білкових фракцій в сироватці крові та слизовій стравоходу.

3.4. Показники гуморальної ланки імунітету за кислотного опіку стравоходу

Система комплименту належить до однієї з систем протеолізу. Вона активується під дією продуктів, які формуються за імунної відповіді. Активаторами класичного шляху комплемента є комплекси антиген-антитіло, які, зв'язуючись з сериновою протеїназою C1q, активують її [65]. В основі патогенезу опікової хвороби лежать складні механізми адаптації і дезадаптації, які впливають на всі рівні регуляції і гомеостазу. Одним з провідних компонентів цих процесів є порушення в системі імунітету.

Опікову хворобу відносять до комбінованих імунодефіцитних станів з переважним ураженням Т-системи імунітету, схильним до затяжного і хронічного перебігу. Одночасно у опікових хворих, в результаті зростання вмісту в організмі мікробних і змінених антигенів власних тканин, формується мікробна і аутосенсібілізація [182].

У роботі ми визначали вміст імуноглобулінів класу G у сироватці крові, оскільки вони мають важливе значення в протидії інфекційному захисті, забезпечуючи пасивний імунітет в ранньому віці [197]. Аналіз проведених досліджень показав, що за КОС відбувалось зниження рівня IgG у 1,5 рази, який є найбільш специфічний ефектором гуморальної ланки, на 1 добу КОС, що відповідає стадії шоку (рис. 22).

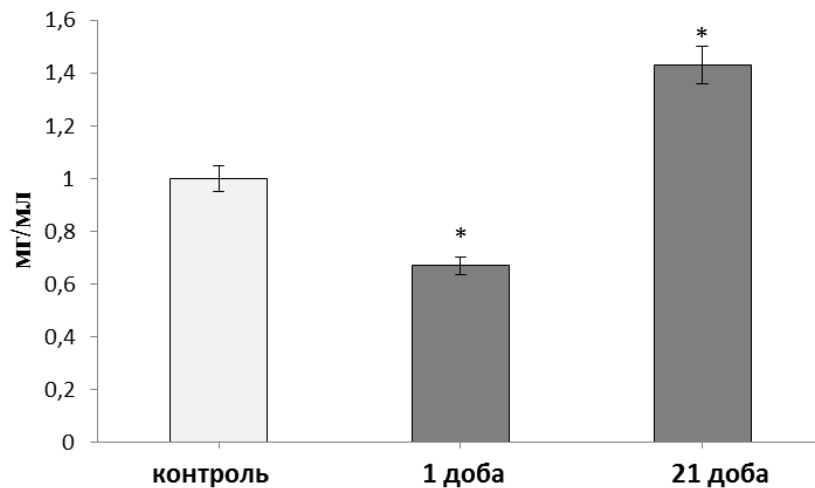


Рис.22. Вміст імуноглобулінів класу G у сироватці крові щурів за кислотного опіку стравоходу ($M \pm m$, $n=6$)

*- $p < 0,05$ порівняно з контролем

Зазначені зміни можуть свідчити про те, що в умовах хімічного опіку відбувається зрив адаптаційних реакцій, а також відбувається утворення циркулюючих імунних комплексів, до складу яких входять імуноглобуліни даного класу. Разом з тим, зниження вмісту IgG у крові може бути зумовлено також і зміною кількості В-лімфоцитів та загальних Т-лімфоцитів у периферійній крові [198].

У патогенезі опікової хвороби одне з провідних місць належить інфекції. При цьому, інфекційний процес, що почався в опіковій рані, має тенденцію до генералізації і часто призводить до такого важкого ускладнення, як сепсис.

У своїх дослідженнях Собауті відмітив, що у дітей після опіку вміст IgG, IgM, IgA, IgG, IgG2, IgG3 і IgG4 був нижче норми. Не спостерігалось суттєвої кореляції між розміром опіку і значеннями вмісту імуноглобуліну. Хоча більш серйозний опік пов'язаний з більшими зниженнями рівнів сироваткових IgA, IgM, IgG і його підкласів [199].

Згідно літературних даних, зниження вмісту IgG відбувається при лімфопроліферативних захворюваннях, захворюваннях із втратою білка (наприклад, при ентеро- і нефропатіях), при лікуванні імунодепресантами, при атопічних дерматитах та інших алергічних захворюваннях [199].

У пацієнтів з значними опіками рівень імуноглобулінів зменшується через підвищену швидкість їх зникнення, особливо IgG. Це може бути пов'язано з декількома факторами, включаючи підвищений катаболізм, враховуючи гіперметаболічний стан опікового пацієнта і втрату сироваткових імуноглобулінів через ексудати рани. Ця умова разом з втратою захисного бар'єру робить опікових хворих дуже сприйнятливими до інфекцій. Фактично, це є найчастішою причиною смерті серед цих пацієнтів [200].

Тому такі зміни можливо виникли через зниженням вмісту загального вмісту білка та альбуміну на 1-шу добу після травми за кислотного опіку стравоходу, як показано раніше. Також КОС супроводжувався збільшенням числа лейкоцитів та зменшенням кількості нейтрофілів в даний термін часу. Не можна нехтувати впливом і самої кислоти, оскільки відомо, що органічні кислоти в крові частково зв'язується з білками плазми, що також може вплинути на вміст даного показника.

На 21 добу після опіку вміст IgG у сироватці крові перевищував контроль у 1,4 рази. Згідно літературних даних, у дітей із хімічними опіками відзначається зниження вмісту IgG в стадії шоку. В стадії токсемії і септикотоксемії вміст IgG зберігає тенденцію до збільшення [199].

Дослідження показників імунітету у постшоковому періоді у хворих гострими хірургічними інфекційними захворюваннями продемонструвало зростаючу гіперімуноглобулінемію G аж до 30 діб, а лікування інфекційних ускладнень супроводжувалося повільним зростанням вмісту лімфоцитів і IgG та тривалою гіперімуноглобулінемією M [190]. Тому підвищення у крові рівня імуноглобуліну G може свідчити про розвиток гострого хронічного інфекційного процесу в організмі.

Іноді підвищення рівня імуноглобулінів призводить до утворення циркулюючих імунних комплексів (ЦІК). У розвитку імунокомплексного процесу важливе значення мають розміри імунних комплексів. Згідно літературних даних, найбільш патогенними є комплекси середнього і малого розміру, що здатні активувати систему комплементу.

Будучи за своєю природою результатом компенсаторної реакції антитілопродукування, спрямованої на елімінацію антигенів, ЦІК, що здатні зв'язувати компоненти комплементу, стають при цьому фактором пошкодження клітинних мембран. Преципітація комплексу антиген-антитіло-комплемент в тканинах-мішенях викликає в них ушкодження різного ступеня тяжкості - від локального підвищення судинної проникності до некротично-геморагічних уражень. У зв'язку з цим визначення рівня ЦІК в сироватці крові служить одним з діагностичних прийомів визначення тяжкості і активності імунопатологічного процесу [201, 202].

При дослідженні вмісту високомолекулярних, середньомолекулярних та низькомолекулярних ЦІК на 1 добу після опіку спостерігалась тенденція до збільшення їх рівня [203] порівняно з показниками інтактного контролю в середньому у 1,3 - 1,4 рази (табл. 12).

Таблиця 12

Вміст циркулюючих імунних комплексів у сироватці крові щурів за кислотного опіку стравоходу (ум.од./мг білка) ($M \pm m$, $n=8$)

	Контроль	КОС	
		1 доба	21 доба
Високомолекулярні ЦІК	0,10±0,001	0,13±0,015*	0,11±0,015
Середньомолекулярні ЦІК	0,14±0,001	0,18±0,02*	0,16±0,02*
Низькомолекулярні ЦІК	0,12±0,001	0,17±0,014*	0,15±0,014*

* $p < 0,05$ порівняно з контролем

При дослідженні рівня високомолекулярних та середньомолекулярних ЦІК у тварин на 21 добу після опіку вміст даного показника дещо знизився, але залишився вище контрольних значень [204]. Найбільш достовірне підвищення вмісту відмічено для низькомолекулярних ЦІК у тварин, які зазнали КОС, даний показник був вище контролю у 1,3 рази. Згідно літературних даних, тривала циркуляція в організмі імунних комплексів, навіть незначне підвищення їх рівня призводить до утворення накопичень останніх в тканинах, підвищеної агрегації і адгезії тромбоцитів, що, в свою чергу, спричиняє порушення мікроциркуляції крові та пошкодження і некроз тканин [202].

Причиною підвищення рівня циркулюючих імунних комплексів в крові є надлишок антигенів - бактерій, вірусів, грибків, паразитів. При гострих інфекціях по організму за короткий час поширюється велика кількість збудників, у відповідь активно виробляються антитіла, і утворюються ЦІК. Фагоцити, печінка і селезінка не встигають переробляти і виводити збудників з організму, тому їх рівень в крові збільшується. При персистуючих інфекціях відбуваються аналогічні процеси, але антигени надходять тривалий час [202].

Високий рівень ЦІК у сироватці крові спостерігається при запальних процесах та сепсисі. Значення циркулюючих імунних комплексів в патогенезі запальних захворювань полягає в їх здатності активувати клітинні і гуморальні фактори імунної системи, що сприяє формуванню захисних або патологічних процесів. [205].

Циркулюючі імунні комплекси пов'язані з дуже великою кількістю станів і можуть утворюватися як з екзогенними, так і з ендогенними антигенами. У нормальних фізіологічних умовах імунні комплекси активують класичний шлях, вивільняючи С3b комплекс. Це призводить до зв'язування імунного комплексу з комплементарними рецепторами і рецепторами Fc і видалення імунного комплексу ретикулоендотеліальною системою. Якщо утворення імунних комплексів перевищує видільну здатність ретикулоендотеліальної

системи або дефіцит комплементу, тоді може бути порушений кліренс, і імунні комплекси можуть бути депоновані в кінцеві органи, такі як нирка. Коли імунні комплекси осідають в кінцевих органах, може відбутися руйнування тканини [202]. Проаналізувавши дані клінічних спостережень, не можна розцінювати зміни імунологічних параметрів як свідок нормалізації чи одужання. Це може бути пояснено високою лабільністю більшості вивчених показників і обумовлено незрілістю фізіологічних систем організму [206].

У багатьох наукових роботах доведено, що на опікову травму, організм відповідає неспецифічною запальною реакцією, яка проявляється викидом цитокінів [207]. Вираженість цієї реакції залежить від площі та глибини ураження, характеру інфекційного агента та активності імунної відповіді постраждалого організму.

За опікової рани знижується активність транспорту кисню до тканин. Тяжка і тривала гіпоксія тканин активує ендотеліальні клітини, котрі звільняють медіатори запалення та мітогенні молекули. Медіатори запалення індукують адгезію нейтрофільних гранулоцитів і непрямим шляхом ініціюють проліферацію гладком'язових клітин. Під час процесу адгезії лейкоцити активуються і звільняють вільні радикали та протеази, які пошкоджують біологічні молекули. Проліферуючі гладком'язові клітини змінюють свій фенотип і втрачають здатність до фізіологічного скорочення. Венозний стаз призводить до церебральної ішемії та цитотоксичного набряку, що виникає в результаті метаболічного ацидозу [207]. При тяжкому запаленні цитокіни потрапляють в кров, що призводить до гострої відповіді на рівні всього організму.

У розвитку запального процесу важливу функцію виконують прозапальні інтерлейкіни (IL), IL-1 β , IL-12, IF-гамма, IL-6, TNF- α . Ці цитокіни беруть участь у реалізації як специфічного, так і неспецифічного імунітету [208]

Нами були досліджені прозапальні інтерлейкіни до яких відносяться IL-1 β , IL-12, IF-гамма, IL-6, TNF- α (табл. 13). Було встановлено достовірне

підвищення прозапальних цитокінів (ЦК) переважно на 7 добу експерименту, що є відображенням активності і тяжкості патологічного процесу [208]. В подальші терміни дослідження рівень прозапальних ЦК мав різнонаправлений характер.

Рівень IL-1 β при моделюванні КОС був вище контрольного рівня протягом усього терміну дослідження. Найбільше підвищення спостерігали на 1 добу, у 1,35 раза. На 21 добу рівень IL-1 β наближався до контрольних значень.

Таблиця 13.

Вміст прозапальних цитокінів у сироватці крові щурів за кислотного опіку стравоходу (ум.од./мг білка) ($M \pm m$, n=8)

	контроль	1 доба	7 доба	15 доба	21 доба
IL-1 β	0,88 \pm 0,001	1,19 \pm 0,07*	1,03 \pm 0,15*	1,00 \pm 0,10*	0,92 \pm 0,06
IL-12	0,9 \pm 0,01	1,30 \pm 0,08*	1,22 \pm 0,13*	1,10 \pm 0,01*	1,15 \pm 0,02*
IF- γ	0,77 \pm 0,04	0,97 \pm 0,05*	0,91 \pm 0,07*	0,85 \pm 0,01*	0,85 \pm 0,09*
IL-6	0,63 \pm 0,03	0,88 \pm 0,03*	0,73 \pm 0,04*	0,75 \pm 0,04*	0,84 \pm 0,03*
TNF- α	0,67 \pm 0,02	0,84 \pm 0,01*	0,79 \pm 0,04*	0,74 \pm 0,02*	0,75 \pm 0,03*

*- $p < 0,05$ порівняно з контролем

Досліджуючи рівень IL-12 за умов моделювання опіку виявили максимальне підвищення у 1,4 рази також на 7 добу після травми. На 15 та 21 доби даний показник дещо знижувався, але залишався достовірно вище контролю в середньому у 1,3 рази.

Вміст IF- γ та TNF- α за КОС на 1 добу був вище контрольного показника у 1,3 рази. На 15 та 21 доби даний показник був у 1,1 рази вище за контроль.

Досліджуючи рівень IL-6 за КОС, ми спостерігали різнонаправлені зміни. Максимальний рівень IL-6, у 1,4 рази вище за контроль, показано на 1 добу після травми.

Таким чином, нами були досліджені прозапальні інтерлейкіни, які здатні стимулювати проліферацію Т- і В-лімфоцитів, продукцію антитіл, посилюють синтез адгезивних молекул, активують синтез білків гострої фази, беруть участь у реалізації як специфічного, так і неспецифічного імунітету [208].

IL-1 β , є одним з ключових цитокінів, який характеризує рановий процес. Дослідження IL-1 β у сироватці крові показало збільшення цитокіну в порівнянні з інтактним контролем. Отримані дані узгоджуються з літературними, та свідчать про перебіг ранового процесу у щурів з опіком, який характеризується тривалим підвищенням вмісту IL-1 β [208]. Також відомо, що невід'ємною складовою частиною біологічної дії IL-1 є його стимулюючий вплив на метаболізм сполучної тканини. Він стимулює проліферацію фібробластів і збільшує продукцію ними простагландинів, ростових факторів і ряду цитокінів. Під впливом IL-1 клітини сполучної тканини збільшують синтез колагену, а також інших ферментів. Однак, підсумком репарації можуть бути гіпертрофічні або келоїдні рубці, формування яких, пов'язане з підвищеним утворенням гранульованої тканини, посилюється під впливом високих концентрацій IL-1 [208].

IF- γ і фактор некрозу пухлини (TNF- α), мають виражену імуномодулюючу дію, є індукторами клітинної ланки імунітету і відносяться до основних прозапальних цитокінів. У розвитку запального процесу важливу функцію виконує TNF- α , який стимулює проліферацію Т- і В-лімфоцитів, продукцію антитіл, підсилює синтез адгезивних молекул, активує синтез білків гострої фази, бере участь в реалізації як специфічного, так і неспецифічного імунітету. Було встановлено, що за умов хімічного опіку відбувалось підвищення рівня IF- γ на 7 добу експерименту. Можливо одним з механізмів підвищення концентрації IF- γ у сироватці крові є відновлення кількості і функціональної активності Т-лімфоцитів, в тому числі CD4 +, що беруть участь в продукції цього цитокіну. Втім, не можна виключити роль інших

чинників: зміни рівня ендогенної інтоксикації, функціональної активності ендотеліоцитів та ін.

Основними продуцентами ІЛ-12 є моноцити, макрофаги, нейтрофіли, активовані лімфоцити. Індукторами синтезу цитокіну служать мікробні компоненти і продукти. Було показано, що ІЛ-12 є ключовим цитокіном для посилення імунної відповіді та ініціації протиінфекційного захисту. Основними клітинами-мішенями ІЛ-12 є природні кілери і Т-лімфоцити. Цитокін активує диференціювання Т-лімфоцитів, підвищує їх цитотоксичну активність. Деякі дослідники включають в критерії несприятливого результату при сепсисі і підвищення концентрації ІЛ-6 [208]. В ході наших досліджень було показано підвищення рівню ІЛ-6, за умов КОС. Встановлено, що одним з факторів підвищення ІЛ-6 при опіковій травмі є зниження концентрації ІЛ-4, тому рівень ІЛ-4 також розглядається, як прогностичний фактор виникнення ускладнень [209].

Тож нами були досліджені протизапальні інтерлейкіни до яких відносяться ІЛ-4, ІЛ-10, що регулюють специфічні імунні реакції і обмежують розвиток запалення. (табл. 14).

Таблиця 14.

Вміст протизапальних цитокінів у сироватці крові щурів за кислотного опіку стравоходу (ум.од./мг білка) (M±m, n=8)

	контроль	1 доба	7 доба	15 доба	21 доба
ІЛ-4	0,89±0,01	0,78±0,04*	0,87±0,06	0,77±0,02*	0,80±0,03*
ІЛ-10	0,78±0,06	0,64±0,03*	0,97±0,02*	0,69±0,08	0,70±0,02

*- $p < 0,05$ порівняно з контролем

Було встановлено достовірне зниження цитокіну ІЛ-4 за умов КОС станом на 1, 15 та 21 доби, в середньому, у 1,1 - 1,2 рази відносно контролю. Дослідження ІЛ-10 у сироватці крові статевонезрілих щурів показало

різнонаправлені зміни. Ми спостерігали підвищення рівня показника на 7 добу у 1,2 рази, та зниження на 1, 15 та 21 доби, в 1,2 та 1,1 рази.

Протизапальні інтерлейкіни, синтезовані ТН2 і ТН3 клітинами, є антагоністами прозапальних цитокінів і володіють здатністю пригнічувати їх біологічну активність, зокрема, вони пригнічують проліферацію і відповідь Т-лімфоцитів на антигени, гальмують продукцію ІЛ-1, TNF- α , оксиду азоту і простагландинів, зменшуючи, таким чином, запальні прояви [208]. Зниження концентрації ІЛ-4 деякі дослідники включають в критерії несприятливого результату при сепсисі.

Рівень деяких цитокінів у крові при опіковій травмі розглядається як патофізіологічна ланка ураження органів та розвитку поліорганної недостатності, сепсису [207]. Групою китайських дослідників була встановлена прогностична роль підвищення концентрації ІЛ-10, в період токсемії [208]. Саме високий рівень ІЛ-10 пов'язують з високим ризиком септичних ускладнень після опіків [210]. За КОС збільшення ІЛ-10 у сироватці крові статевонезрілих щурів показано переважно на 7 добу.

Таким чином, опік стравоходу супроводжувався змінами в гуморальній ланці імунної системи, що проявлялось підвищення вмісту ІgG, змінами молекулярного складу імунних комплексів, за рахунок підвищення концентрації найбільш токсигенних – середньо- та низькомолекулярних ЦК. Отримані дані визначення цитокінового профілю свідчать, що за КОС залишався ризик утворення гранульованої тканини, наслідком чого може бути формування рубців, ризик розвитку поліорганної недостатності, порушення репаративної регенерації та уповільнення загоєння опікової рани.

Отже, за кислотного опіку стравоходу II ступеня тяжкості відбувається протеолітична деградація білків. На 7 добу після опіку ми спостерігали підвищення активності серинових та металопротеїназ, а також активності α_2 – макроглобуліну у крові. На 21 добу відбувалось підвищення вмісту майже всіх досліджених ММП, ТІМП, фактору росту фібробластів та протеасомної

активності у тканинах стравоходу. В даний період ми спостерігали накопичення молекул середньої маси. Такі зміни свідчать про дисбаланс в системі протеолізу. Дослідження показників гуморальної ланки імунітету встановило, що на 1 та 7 доби за КОС відбувається запальний процес в організмі експериментальних тварин, а показники 21 доби можуть свідчити про розвиток хронічного інфекційного процесу.

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Хімічні опіки стравоходу є досить частою патологією на сьогоднішній день. Найчастіше вони зустрічаються у дітей в віці від 1 до 5 років внаслідок випадкового вживання хімічних речовин. Частота опіків стравоходу у дітей пояснюється, з одного боку, звичкою дітей (особливо раннього віку) все брати до рота, з іншого боку - недбалістю дорослих при зберіганні їдких хімічних речовин, що застосовуються у побуті, та лікарських препаратів. Частота хімічних опіків також корелює з розвитком виробництва легкої промисловості та використанням доступних хімічних у побуті. Хімічні опіки є важливою соціальною і медичною проблемою через ускладнення, які виникають за даної патології. Наслідками опікових уражень є формування рубців, хронічне запалення та розвиток інфекційних процесів в рані [152].

Для відтворення кислотного опіку стравоходу нами було обрано розчин трихлороцетової кислоти (CCl_3COOH), оскільки частина побутових рідин, які викликають хімічні ушкодження стравоходу у дітей, є кислотовмісними (засоби для знежирення поверхонь, плямовивідники, оцтова есенція). Гістологічні дослідження показали, що при опікових ушкодженнях, які відповідають II ступеню опіку відбувається поступове відновлення слизової оболонки, але зберігається лімфоцитарна інфільтрація підслизового шару, при цьому відзначаються ознаки фіброзу у м'язевому шарі.

Для визначення ступеня метаболічних порушень за умов досліджуваної патології нами було проведено визначення загальноклінічних та біохімічних показників сироватки крові.

Кислотний опік стравоходу супроводжувався підвищенням вмісту лейкоцитів (за рахунок моноцитів) на тлі зменшення числа еритроцитів, у яких під впливом кислотних радикалів розривається оболонка і вільний гемоглобін виходить в плазму. Кількість нейтрофілів, як паличкоядерних, так і сегментоядерних була зниженою протягом усього дослідження, що може свідчити про міграцію їх у зону опіку. Також зазначені зміни відбуваються при

розвитку запалення та інфекційних процесів в організмі. Опікова хвороба характеризується гострою інтоксикацією та порушенням водно-сольового обміну організму, яке може виникати внаслідок розладів кровообігу за опіку. Кислотний опік стравоходу викликав гіпопротеїнемію, як наслідок підвищеного розпаду білків, яка відбувалась, головним чином, за рахунок зменшення кількості альбуміну. Підвищення протягом всього терміну досліджень рівня сечовини, креатиніну, АЛТ та АСТ може свідчити про суттєві порушення функціонування нирок та печінки. Згідно літературних даних, рівні аспартатамінотрансферази і аланінамінотрансферази підвищуються відразу ж після опікових травм і є найбільш чутливими показниками пошкодження гепатоцитів [33].

Згідно отриманих результатів гістологічних, загальноклінічних та біохімічних досліджень, можна прийти до висновку, що змодельований кислотний опік стравоходу відповідає клінічній картині кислотного опіку стравоходу II ступеня тяжкості у дітей.

За опіку основним внутрішнім джерелом небезпеки для клітинного гомеостазу є продукти, утворені в результаті метаболізму кисню. Визначення вмісту продуктів перекисного окиснення ліпідів та активності антиоксидантної системи є діагностичним критерієм тяжкості опікової хвороби та свідчить про метаболічні порушення на клітинному рівні. Отримані результати щодо підвищеного вмісту дієнових кон'югатів, шифових основ та ТБК-активних свідчать як про посилене утворення активних форм кисню, так і можуть бути обумовлені дією самого чинника, який викликає порушення клітинних мембран. Стадії процесу вільнорадикального окиснення контролюються супероксиддисмутазою та каталазою. Зниження активності вказаних ферментів, як у сироватці крові, так і у слизовій оболонці стравоходу, можуть свідчити про інактивацію ферментів антиоксидантного захисту. Така інактивація виникає через надмірну продукцію АФК. Згідно даних літератури, після опіку утворюється величезна кількість шкідливих вільних радикалів, які

пов'язані із запаленням, синдромом системної запальної відповіді, імуносупресією, інфекцією та сепсисом, пошкодженням тканин і множинною недостатністю органів [33].

Про посилене білкове окиснення свідчить виражене і тривале зниження сульфгідрильних груп в опіковій рані. Зниження вмісту відновленого глутатіону та підвищення вмісту окисненого, зниження активності глутатіонредуктази, глутатіонтрансферази та глутатіонпероксидази може бути наслідком розвитку окисного стресу, який виникає через постійну генерацію вільних радикалів. Інгібування ферментів глутатіонової системи може відбуватись через надмірно велику концентрацію АФК, що утворюється за опікової хвороби.

Отримані нами дані свідчать про порушення функціонування органів та систем організму за кислотного опіку стравоходу. Спостерігається лейкоцитоз, гіпопротеїнемія та виснаження антиоксидантної системи, що сприяє посиленій активації протеолізу.

Компоненти системи протеолізу ми досліджували у екстрацелюлярному матриксі, цитоплазмі та за допомогою гуморальної ланки імунітету.

Отримані результати загальної протеолітичної активності, активності серинових протеїназ та металопротеїназ, що є компонентами системи протеолізу ЕЦМ, за кислотного опіку стравоходу свідчать про послену активацію протеолізу до 7 доби експерименту. Зниження активності зазначених ферментів у наступні терміни часу може бути наслідком утворення комплексів протеїназ з інгібіторами та свідчить про елімінацію їх з кров'яного русла. Регуляція активності протеїназ здійснюється інгібіторами, серед яких α_1 -антитрипсин та α_2 -макроглобулін. Підвищення активності α_1 -антитрипсину та α_2 -макроглобуліну на 7 добу експерименту на тлі максимального підвищення активності ферментів ЕЦМ може свідчити про дисбаланс в системі протеолізу.

Одним з ключових етапів загоєння ран є деградація ЕЦМ, безпосередню участь у цьому процесі приймають ММП. Ми досліджували вміст ММП-1, ММП-2, ММП-3, ММП-8 та ММП-9 у слизовій оболонці стравоходу та у сироватці крові за КОС. У слизовій оболонці стравоходу максимальне підвищення ММП було відмічено на 21 добу після опіку, в указаний термін часу максимального значення набувала активність α_2 -МГ та TIMP-1, які є інгібіторами ММП. В даний період показано і підвищення вмісту bFGF, який вносить вагому роль у загоєнні післяопікових ран.

Такі зміни можуть свідчити про подальший розвиток запалення та інфекційних процесів у рані. Також, довготривалий процес запалення може бути причиною розвитку фіброзу тканин.

Таким чином, дослідження компонентів системи протеолізу ЕЦМ, які відповідають за регенерацію тканин, свідчать про неконтрольовану протеїназну активність, яка може бути однією з головних причин ран, що не загоюються.

Дослідження протеолізу у цитоплазмі ми здійснювали, визначаючи показники вмісту шаперонів (Hsp60 та Hsp70) та активності протеасоми (26s та 20s). Отримані дані щодо вмісту Hsp70 та Hsp60 можуть свідчити про зниження рівня АТФ у тканинах за опікової хвороби, що узгоджується з літературними даними. В умовах стресу шаперони мобілізуються на виправлення білків, які втратили правильну тривимірну структуру, і рівень Hsp знижується нижче критичного для ефективного контролю згортання синтезованих *de novo* поліпептидних ланцюгів [80].

Підвищення ХТП та КП активностей 26s та 20s у тканині стравоходу на 21 добу після опіку може свідчити про надмірну активацію протеолізу у цитоплазмі та може бути передумовою розвитку фіброзу у післяопікових ранах. Згідно літературних даних, у лікуванні опікових хворих з фіброзом використовуються інгібітори протеасоми, як засіб запобігання або зменшення рубцювання тканин.

Таке функціонування системи протеолізу у ЕЦМ та цитоплазмі призводить до деградації білкових молекул.

Зростання вмісту глобулінової фракції у сироватці крові, до складу якої входить Ig G та С-реактивний білок, зменшення вмісту альбумінової фракції є підтвердженням втрати білків та розвитку запалення за опіку. Підтвердженням розвитку запалення є і зміни вмісту фракцій, які можуть відповідати білкам гострої фази.). Підтвердженням гемолізу еритроцитів було зниження вмісту фракції , що може відповідати гаптоглобіну. А зниження вмісту фракції, що може відповідати плазміногену, є підтвердженням згущення крові за КОС, оскільки плазміноген використовується в процесі вторинного фібринолізу, який розвивається у відповідь на внутрішньосудинне згортання крові.

Для тканини стравоходу варто відзначити підвищення вмісту фракцій білків, які можуть відповідати кератинам та фактору росту ендотелію, що може свідчити про підвищену епітелізацію в місці опіку.

Молекули середньої маси є низькомолекулярними пептидами, що утворюються внаслідок протеолізу. Підвищення вмісту МСМ у сироватці крові на 1 добу після опіку може бути спричинено пошкоджуючою дією кислоти. Подальше зниження вмісту пептидів може свідчити про міграцію МСМ у місце опіку, де вони є матеріалом для епітелізації опікової рани.

Підвищення вмісту МСМ на 21 добу після опіку можуть свідчити про подальшу деструкцію тканин стравоходу протеолітичними ферментами в указаний період або про порушення детоксикаційної функції тканини.

Однією із систем протеолізу є система компліменту. Її активація починається під дією продуктів, які формуються за імунної відповіді. Активаторами класичного шляху комплементу є комплекси антиген-антитело, які, зв'язуючись з сериною протеїназою C1q, активують її [58]. Ми визначали вміст циркулюючих імунних комплексів, які складаються із антигена, антитіла та зв'язаних з ними компонентів комплементу C3, C4, C1q.

Пошкоджуюча дія ЦК залежить від антитіл, які входять до їх складу. Зниження рівня Ig G на 1 добу після опіку може свідчити про підвищений катаболізм, враховуючи гіперметаболічний стан за опікової хвороби і втрату сироваткових імуноглобулінів через ексудати рани.

Згідно літературних даних, зниження вмісту IgG може відбуватися при захворюваннях із втратою білка, а також при надмірному протеолізі [58]. Також зниження рівня даного показника в зазначений період може бути обумовлено утворенням ЦК, до складу яких він входить. Підвищення рівня Ig G на 21 добу після КОС може свідчити про розвиток інфекційних та запальних процесів в організмі.

При дослідженні вмісту ЦК суттєві зміни у молекулярному складі імунних комплексів, що проявлялось у першу чергу підвищенням концентрації найбільш токсигенних – середньомолекулярних та низькомолекулярних ЦК, можуть свідчити про розвиток запального процесу. Причиною підвищення рівня циркулюючих імунних комплексів в крові є надлишок антигенів, які швидко поширюються при запальних процесах та ослабленому імунітеті, у відповідь активно виробляються антитіла, і утворюються ЦК.

Активация запального процесу проявляється змінами цитокінового профілю. Ми визначали рівень IL-1 β , IL-6, IL-12, IF- γ , TNF- α , IL-4 та IL-10. Підвищення вмісту прозапальних цитокінів та зниження вмісту протизапальних цитокінів свідчить про дисфункцію цитокінового профілю та є умовою для уповільнення загоєння опікової рани.

Отже, за КОС спостерігається протеолітична деградація білків, яка є причиною дисфункції багатьох систем та органів. Так, виявлені зміни в порушенні балансу між протеїназами та їх інгібіторами, у роботі системи антиоксидантного захисту та імунної системи. Найбільш суттєві зміни протеолітичної активності у слизовій оболонці стравоходу відбувалися на 7 та 21 доби, а у сироватці крові на 1 та 15 доби. Отримані результати можуть бути основою для створення науково обґрунтованих способів корекції виявлених

метаболических нарушений, особенно путем фармакологической коррекции у определенных стадиях ранового процесса после кислотного ожога пищевода.

ВИСНОВКИ

Результати, представлені в дисертаційній роботі, поглиблюють існуючі погляди щодо перебігу протеолітичних процесів, які відіграють ключову роль за появи внутрішніх опіків, та показують перспективний напрямок досліджень - пошук та ідентифікація специфічних молекул білкової природи, що здатні бути тригерами різноманітних біохімічних процесів за досліджуваного патологічного стану організму.

1. Показано, що за кислотного опіку стравоходу відбувалось підвищення вмісту дієнових кон'югатів, ТБК-активних сполук та шифових основ на тлі зниження активності супероксиддисмутази, каталази, вмісту глутатіону та всіх глутатіон-залежних ферментів, що обумовлено процесами надмірної продукції активних форм кисню, що зумовлює активацію протеолізу.

2. Встановлено, що на 7 добу експерименту за кислотного опіку стравоходу відбувалось підвищення інгібіторної активності α_2 -макроглобуліну у крові в 1,4 рази та активності серинових та металопротеїназ в плазмі крові в 2 та 2,5 рази, відповідно.

3. Показано підвищення вмісту тканинного інгібітора металопротеїназ-1 у 1,9 рази, фактору росту фібробластів у 1,8 рази, молекул середньої маси у 1,2 рази та всіх досліджуваних матриксних металопротеїназ у 2 рази у слизовій оболонці стравоходу на 21 добу, що може свідчити про дисбаланс у системі протеолізу.

4. Встановлено, що за кислотного опіку стравоходу відбувається протеолітична деградація білків, при цьому відбуваються кількісні зміни вмісту білкових фракцій як у сироватці крові так і у слизовій оболонці стравоходу. Для сироватки крові встановлено зменшення вмісту альбумінової фракції на 7 добу у 1,9 рази, а на 21 добу у 1,7 рази при зростанні вмісту глобулінової фракції у 1,5 та 1,8 рази, відповідно, відносно контролю.

5. Показано зниження вмісту шаперонів та підвищення активності протеасом у тканинах стравоходу щурів, що свідчить про посилення

протеолізу. На 21 добу після травми хімотрипсинподібна активність 26s протеасом у 1,4 рази вище за контроль, а каспазоподібна – у 7 разів.

6. Встановлено, що опік стравоходу супроводжувався підвищенням концентрації IgG та вмісту середньо- і низькомолекулярних ЦІК у сироватці крові. Так на 21 добу після травми концентрація IgG у 1,4 рази, вміст середньо- і низькомолекулярних ЦІК у 1,1 та 1,3 рази, відповідно, вище контрольних показників.

7. Оцінка цитокінового профілю, як маркеру метаболічних порушень, у сироватці крові показала підвищення рівня прозапальних цитокінів у сироватці крові на 1 добу після опіку на тлі дефіциту протизапальних цитокінів. Такі зміни цитокінового профілю корелюють з активацією протеолізу та свідчить про уповільнення загоєння опікової рани.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Fishman D.S. Caustic esophageal injury in children. [[Internet]. 2018 [cited 2018 Jul 19] Available from: www.uptodate.com/contents/caustic-esophageal-injury-in-children.
2. Rafeey M, Ghojzadeh M, Sheikhi S, Vahedi L. Caustic Ingestion in Children: a Systematic Review and Meta-Analysis. *J Caring Sci*. 2016 Sep; 5(3): 251–265.
3. Лужников ЕА, редактор. Медицинская токсикология. Москва: ГЭОТАР-Медиа; 2012. 923 с.
4. Zhao J, Chang AC, Li C, Shedden KA, Thomas DG, Misek DE, et al. Comparative proteomics analysis of Barrett metaplasia and esophageal adenocarcinoma using two-dimensional liquid mass mapping. *Mol Cell Proteomics*. 2007 Jun; 6(6): 987–99.
5. Breton J, Gage MC, Hay AW, Keen JN, Wild CP, Donnellan C. Proteomic screening of a cell line model of esophageal carcinogenesis identifies cathepsin D and aldo-keto reductase 1C2 and 1B10 dysregulation in Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma. *J.J Proteome Res*. 2008 May; 7(5): 1953–62.
6. Calabrese C, Marzano V, Urbani A, Lazzarini G, Valerii MC, Liguori G. Distinct proteomic profiles characterise non-erosive from erosive reflux disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2011; 34(8): 982–93.
7. Колесов СА, Шабунина ЕИ, Канькова НЮ, Башурова ИА. Особенности низкомолекулярного субпротеома сыворотки крови детей с гастроэзофагеальной рефлюксной болезнью. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 2014; 11: 448–51.
8. Маркушева ЛИ, Самсонов ВА, Фомина ЕЕ. Антитела к фибробластам кожи человека у больных различными дерматозами. *Вестник дерматологии и венерологии*. 1998; 2: 31 -3.
9. Доценко ВЛ, Спирина АЯ, Макинский АИ, Нешкова ЕА, Ёршикова ЮЕ, Яровая ГА. Эластаза лейкоцитов в плазме крови больных туберкулезом и её роль в нарушении регуляции процессов свертывания крови. *Вопросы медицинской химии*. 2000; 46(2): 176-83.

10. Кондакова ИВ, Шашова ЕЕ, Спирина ЛВ, Колегова ЕС, Юнусова НВ. Внутриклеточные протеолитические системы: новый класс маркеров для ранней диагностики и прогноза течения злокачественных опухолей. Злокачественные опухоли. 2017; 7(3): 47–51.
11. Агапова ЮР, Гулин АВ, Малышева ЕВ. Аутоиммунный генезис баланса системы протеолиза при бронхолегочной патологии. Вестник ТГУ. 2012; 17(3): 925-9.
12. Іліка ВВ. Кількісні характеристики обмеженого протеолізу в ендотеліоцитах кровоносних судин плаценти при поєднанні запалення посліду та залізодефіцитної анемії вагітних. Український журнал медицини, біології та спорту. 2018; 3(1): 36-9.
13. Портнова ММ, Дергачева НН, Туманова ОВ, Медведева АИ. Особенности ожогов глаз при воздействии на них щелочного агента. Вестник Совета молодых учёных и специалистов Челябинской области. 2017;3(4): 93-5.
14. Ормантаев КС, Турсунов КТ, Мырзахмет СА, Сагымбаева АА. Рациональный выбор тактики консервативного и хирургического лечения химических ожогов пищевода у детей. Российский вестник детской хирургии, анестезиологии и реаниматологии. 2016; 6(3): 35-9.
15. Kochhar R, Sethy PK, Kochhar S, Nagi B, Gupta NM. Corrosive induced carcinoma of esophagus: report of three patients and review of literature. J Gastroenterol Hepatol. 2006 Apr; 21(4): 777-80.
16. Noh S.Y., Kim HJ, Lee HJ, Park SH, Lee JS, Kim AY, et al. Corrosive-Induced Carcinoma of Esophagus: Esophagographic and CT Findings. AJR Am J Roentgenol. 2017 Jun; 208(6) :1237-43.
17. Дудченко НА, Даниленко ОИ. Функциональное состояние органов гепатобилиарной системы поджелудочной железы и почек у больных микробной экземой. Вестник дерматологии и венерологии. 1998; 2: 42-4.

18. Сидельникова ВИ, Черницкий АЕ, Рецкий МИ. Эндогенная интоксикация и воспаление: наследственность реакций и информативность маркеров. Сельскохозяйственная биология. 2015; 50(2): 152-61.
19. Доржиев БД. Химические ожоги пищевода у детей: особенности диагностики и лечения по материалам детского хирургического отделения ГКБСМП г. Улан-Удэ. Acta Biomedica Scientifica. 2009; 2: 37-9.
20. Воскресенская МЛ, Плеханов АН. Возможности местного лечения химических ожогов пищевода в ранние сроки. Вестник бурятского государственного университета. 2015; 2: 199-204.
21. Шамсиев АМ, Атакулов ДО, Базаров ББ, Суванкулов УТ. Лечение ожогов пищевода и их осложнений у детей. Российский вестник детской хирургии, анестезиологии и реаниматологии. 2011; 1: 60-4.
22. Рукевич СГ, Паршиков ВВ, Батанов ГБ, Россохин ВФ. Особенности диагностики и лечения химических ожогов пищевода у детей. Медицинский альманах. 2014; 5(35): 190-4.
23. Шайбеков ДР. Причины развития острых химических ожогов пищевода у детей, их диагностика и лечение. Вестник КРСУ. 2016; 16(11): 161-3.
24. Смирнов АК, Кожевников ВА, Тен ЮВ. Химические ожоги пищевода у детей. Проблемы клинической медицины. 2014; 3:73-8.
25. Разумовский АЮ, Гераськин АВ, Обыденнова РВ, Куликова НВ. Лечение химических ожогов пищевода у детей. Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова. 2012; 1: 43-8.
26. Петров СВ. Общая хирургия. Москва : ГЭОТАР-Медиа. 2010. 768 с.
27. Полотнянко ЛИ, Полотнянко АН. Коагулология. Москва: Владос. 2013. 188 с.
28. Берченко МА. Наиболее распространенные причины смерти в первые часы при отравлении уксусной кислотой. Вестник Казахского Национального медицинского университета. 2015; 4: 386-8.

29. Chibishev A, Simonovska N, Shikole A. Post-corrosive injuries of upper gastrointestinal tract. *Prilozi*. 2010; 31(1): 297-316.
30. Соколова НА, Витковский ЮА, Говорин АВ. Сердечные аритмии и кардиогемодинамические нарушения у больных с острым отравлением уксусной кислотой. *Сибирский медицинский журнал*. 2013. 122(7): 53-6.
31. Михальчик ЕВ, Иванова АВ, Ануров МВ, Титкова СМ, Пеньков ЛЮ, Хараева ЗФ, и др. Ранозаживляющее действие препарата на основе папайи в экспериментальной модели термической травмы. *Бюлл экспер биол мед*. 2004; 137(6): 638-40.
32. Oliveira GV, Shimoda K, Enkhbaatar P, Jodoin J, Burke AS, Chinkes DL, et al. Skin nitric oxide and its metabolites are increased in non burned skin after thermal injuries. *Shock*, 2004; 22(3): 278-82.
33. Nielson CB, Duethman NC, Howard JM, Moncure M, Wood JG. Burns: pathophysiology of systemic complications and current management. *Journal of Burn Care & Research*. 2017 Jan; 38(1): e469–e481.
34. Михальчик ЕВ, Титкова СМ, Ануров МВ, Пеньков ЛЮ, Коркина ЛГ. Антиоксидантные ферменты кожи при экспериментальных ожогах. *Биомедицинская химия*. 2006; 52(6): 576-86.
35. Al-Kaisy AA, Salih Sahib A. Role of the antioxidant effect of vitamin E with vitamin C and topical povidone-iodine ointment in the treatment of burns. *Ann Burns Fire Disasters*. 2005; 18(1): 19–30.
36. Orgill DP. Excision and skin grafting of thermal burns. *N. Engl. J. Med* 2009; 360(9): 893–901.
37. Илюкевич ГВ, Почепень ОН, Светлицкая ОИ, Юрага ТМ. Реамберин как антиоксидантный метаболический корректор окислительного стресса у больных с тяжелой термической травмой. *Вестник интенсивной терапии*. 2007; 3: 66-9.
38. Trupkovic T, Giessler G. Burn trauma. Part 1: pathophysiology, preclinical care and emergency room management. *Anaesthesist*. 2008; 57(9): 898–907.

39. Жукова АГ, Сазонтова ТГ, Заржецкий ЮВ, Волков АВ, Мороз ВВ. Тканеспецифичность ответа системы про- и антиоксидантов после реанимации. *Общая реаниматология*. 2005; 1(3): 46-53.
40. Журавлева АИ, Зубкова СН. Антиоксиданты. Свободно-радикальная патология. Москва: МВА. 2008. 269 с.
41. Григоренко АП, Козий МН, Куприн СЮ. Метаболические нарушения и их коррекция у больных с тяжелой ожоговой травмой. *Вестник интенсивной терапии*. 2007; 4: 51–3.
42. Шулаева НМ, Куспиц ЕВ, Щуковский ВВ, Фисун АМ. Обоснование применения антиоксидантной терапии при лечении синдрома эндогенной интоксикации у больных с тяжелой термической травмой. *Скорая медицинская помощь*. 2010; 3: 78–81.
43. Долгих ВТ, Гольдзон МА, Гирш АО. Гемодинамические и метаболические нарушения у крыс при тяжелой термической травме и их коррекция. *Вестник уральской медицинской академической науки*. 2012; 39(2): 39–40.
44. Butler KL, Goverman J, Ma H, Fischman A, Yu YM, Bilodeau M, et al. Stem cells and burns: review and therapeutic implications. *J Burn Care Res*. 2010; 31(6): 874–81.
45. Полутова НВ, Чеснокова НП, Островский НВ. Состояние процессов липопероксидации и антирадикальной защиты клеток крови в динамике развития ожоговой болезни. *Вестник службы крови России*. 2008; 2: 31–4.
46. Roeder RA, Schulman CI. An overview of war-related thermal injuries. *J Craniofac Surg*. 2010; 21(4): 971–5.
47. Полутова НВ, Чеснокова НП, Островский НВ, Невважай ТА. О патогенетической взаимосвязи нарушений метаболического статуса, клеточного состава и реологических свойств крови при поверхностной термической травме, их диагностическое и прогностическое значение. *Саратовский научно-медицинский журнал*. 2011; 7(4): 795-800.

48. Lippi G, Ippolito L, Cervellin G. Disseminated intravascular coagulation in burn injury. *Semin Thromb Hemost.* 2010; 36(4): 429–36.
49. Моррисон ВВ, Божедомов АЮ, Захарова НБ, Подгорнова АВ. Диагностическое значение маркеров повреждения эндотелия сосудов при термической травме. *Саратовский научно-медицинский журнал.* 2011; 7(3): 629-32.
50. Зиновьев, ЕВ, Нестеров ЮВ, Лагвилава ТО. Экспериментальная оценка влияния реамберина и цитофлавина на течение и исходы острого периода ожоговой болезни. *Экспериментальная и клиническая фармакология.* 2013; 76(4): 39–44.
51. Назаров ИП, Артемьев СА. Состояние эндокринного гомеостаза и его коррекция стресс-протекторами у детей с тяжелой ожоговой травмой. *Анестезиология и реаниматология.* 2007; 1: 52–4.
52. Мозеров СА, Митрошин АН, Мясин АН, Чекушкин АА, Соколов ИА. Оценка функциональных сдвигов тиреоидного статуса при ожоговом шоке. *Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки.* 2009; (2): 21-31.
53. Pérez-Guisado J, de Haro-Padilla JM, Rioja LF, Derosier LC, de la Torre JJ. Serum albumin levels in burn people are associated to the total body surface burned and the length of hospital stay but not to the initiation of the oral/enteral nutrition. *Int J Burns Trauma.* 2013 Jul 8; 3(3):159-63.
54. Брус ТВ, Хайцев НВ, Кравцова АА. Дисфункция печени в патогенезе ожоговой болезни и ее коррекция сукцинатсодержащими препаратами. *Педиатр.* 2016; 7(4): 132-41.
55. Веça А, Egipto P, Carvalho D, Correia F, Oliveira B, Rodrigues A, Amarante J, Medina JL. Nitrogen balance assessment in burn patients. *Acta Med Port.* 2010 Sep-Oct; 23(5):8 83-90.

56. Su GL, Huang WX, Chen J, Xue DJ, Zhou JJ. Effects of different fluid resuscitation program on renal function in rats during the shock stage of severe burn. *Zhonghua Shao Shang Za Zhi*. 2016 Nov 20; 32(11): 681-7.
57. Ефременко ЮР. Протеолитические ферменты – высокочувствительный критерий эффективности и безопасности лечения. *Биомедицинская химия*. 2008; 54(3): 179 - 83.
58. Ежова ГП, Бабаев АА, Новиков ВВ. Биоинформационные аспекты протеомики и деградации белка. Нижний Новгород. 2007. 86 с.
59. Rawlings ND, Barrett AJ, Thomas PD, Huang X, Bateman A, Finn RD. The MEROPS database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors in 2017 and a comparison with peptidases in the PANTHER database, *Nucleic Acids Research*. 2018 Jan; 46(D1): D624–32.
60. Jabłońska-Trypuć A, Matejczyk M, Rosochacki S. Matrix metalloproteinases (MMPs), the main extracellular matrix (ECM) enzymes in collagen degradation, as a target for anticancer drugs. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 2016; 31(s1):177-83.
61. Firestein GS, Budd RC, Gabriel SE, McInnes IB, O’Dell JR. *Textbook of Rheumatology*. 2017. Chapter 8, Proteinases and Matrix Degradation; p. 106-25.
62. Stoller JK, Aboussouan LS. α 1-antitrypsin deficiency. *Lancet*. 2005;365:2225–36.
63. Giannandrea M, Parks WC. Diverse functions of matrix metalloproteinases during fibrosis. *Disease Models and Mechanisms*. 2014; 7: 193-203.
64. Tsuchiya T, Osaki T, Minamino N, Sasaki K. Peptidomics for studying limited proteolysis. *J Proteome Res*. 2015 Nov 6; 14(11): 4921-31.
65. Яровая ГА. Биорегулирующие функции и патогенетическая роль протеолиза III. Физиологическая роль и биохимические механизмы протеолитической деградации белков. *Лабораторная медицина*. 2002; 5:39-45.

66. Shahcorresponding D, Mital K. The Role of Trypsin:Chymotrypsin in Tissue Repair. *Adv Ther.* 2018; 35(1): 31–42.
67. Звягинцева ТВ, Халин ИВ. Метаболитотропная терапия хронических ран. Харьков. 2011. 182с.
68. Han SK. Innovations and advances in wound healing. Heidelberg: Springer; 2016. Basics of wound healing; p.1–37.
69. Rayment EA, Upton Z. Finding the culprit: a review of the influences of proteases on the chronic wound environment. *Int J Low Extrem Wounds.* 2009 Mar; 8(1): 19-27.
70. Sabino F, Hermes O, Egli FE, Kockmann T, Schlage P, Croizat P, et al. *In vivo* assessment of protease dynamics in cutaneous wound healing by degradomics analysis of porcine wound exudates. *Molecular and Cellular Proteomics.* 2015 Feb 1; 14(2): 354-70.
71. Gonzalez AC, Costa TF, Andrade ZA, Medrado AR. Wound healing - A literature review. *An Bras Dermatol.* 2016 Sep-Oct; 91(5): 614-20.
72. Frykberg RG, Banks J. Challenges in the Treatment of Chronic Wounds. *Adv Wound Care (New Rochelle).* 2015 Sep 1;4(9):560-82.
73. McCarty SM, Perciva SL. Proteases and Delayed Wound Healing. *Adv Wound Care (New Rochelle).* 2013 Oct; 2(8): 438–47.
74. Яровая ГА. Биорегулирующие функции и патогенетическая роль протеолиза. V. Физиологическая роль и биохимические механизмы реакций ограниченного протеолиза. *Лабораторная медицина.* 2005; 7: 81-9.
75. Bell RA, Al-Khalaf M, Megeney LA. The beneficial role of proteolysis in skeletal muscle growth and stress adaptation. *Skeletal Muscle [Internet]* 2016; [cited 2018 Feb 19]; 6:16. Available from: <https://skeletalmusclejournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13395-016-0086-6>.
76. Lecker SH, Mitch WE. Proteolysis by the ubiquitin-proteasome system and kidney disease. *JASN.* 2011 May; 22(5): 821-4.

77. Budenholzer L, Cheng CL, Li Y, Hochstrasser M. Proteasome Structure and Assembly. *J Mol Biol.* 2017 Nov 10; 429(22): 3500-24.
78. Бунеева ОА, Медведев АЕ. Убиквитин-независимая деградация белков в протеасомах. *Биомедицинская химия.* 2018; 64(2): 134-48.
79. Мельников ЭЭ, Ротанова ТВ. Молекулярные шапероны. *Биоорганическая химия.* 2010; 36(1): 5-14.
80. Соколик ВВ. Роль шаперонов в реализации конформационных болезней неврологического профиля. *Український вісник психоневрології.* 2007; 15(1(50, додаток)): 114-5.
81. Raetska Ya, Ischuk T, Koval T, Dzhus O, Savchuk O. Experimental modeling of an acid esophagus of 2nd degree in immature rats. *Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kyiv, Problems of Physiological Functions Regulation.* 2015; 19(2): 15-8.
82. Ванцян ЭН, Тощакон РА. Лечение ожогов и рубцовых сужений пищевода. М: Медицина, 1971. 260 с.
83. Кишкун А. А. Клиническая лабораторная диагностика. М: ГЭОТАР-Медиа. 2010. 971 с.
84. Карпищенко АИ, редактор. Медицинские лабораторные технологии: Руководство по клинической лабораторной диагностике. М: ГЭОТАР-Медиа. 2013, т2. 792 с.
85. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976. 7: 248–54.
86. Лилли Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия. М: Мир. 1969. 647 с.
87. Карпищенко АИ, редактор. Медицинские лабораторные технологии и диагностика: Справочник. – Санкт–Петербург: Интермедика. 2002. 408 с.
88. Збірник методичних рекомендацій з використання тест наборів фірми виробника «Human». [Internet]. [cited 2018 Feb 6]. Available from:

www.human.de/en/productNew/Clinical_Chemistry/Reagents_and_Consumables/Multipurpose_Reagents.php

89. Орехович В.И. Современные методы в биохимии. М.: Медицина. 1977. 371 с.
90. Чевари С, Чаба И, Секей Й. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологических материалах. Лабораторное дело. 1985; 11: 678-81.
91. Королюк МА, Иванова ЛИ, Майорова ИГ, Токарев ВЕ. Метод определения активности каталазы. Лаб. Дело. 1988; 1: 16-9.
92. Чиркин АА, редактор. Современные проблемы биохимии. Методы исследований. Минск: Виш шк. 2013. 491 с.
93. Hissin PJ, Hilf R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. Anal Biochem. 1976 Jul;74(1):214-26.
94. Разыграев АВ. Метод определения глутатионпероксидазной активности с использованием пероксида водорода и 5,5'-дитиобис(2-нитробензойной кислоты). Клинико-лабораторный консилиум. 2004; 4: 19-22.
95. Власова СН, Шабунина ЕИ, Перслегина ИА. Активность глутатион-зависимых ферментов эритроцитов при хронических заболеваниях печени у детей. Лаб. дело. 1990; 8: 19– 22.
96. Габриэлян НИ, Левицкий ЭР, Дмитриев ФФ. Скрининговый метод определения средних молекул в биологических гидкостях. Москва: Медицина. 1985. 35 с.
97. Малахова МЯ. Методы биохимической регистрации эндогенной интоксикации. Эфферентная терапия. 1995; 1(2): 61–4.
98. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970; 227: 680–5.
99. Kirk CJ, Powell SR, Miller EJ. Assessment of cytokine-modulated proteasome activity. Methods in Molecular Biology. 2014; 1172: 147– 62.

100. Передерий ВГ, Земсков АМ, Бычкова НГ. Иммунный статус, принципы его оценки и коррекции иммунологических нарушений. Киев: Здоров'я. 1995. 211 с.
101. Нартикова ВФ, Пасхина ТС. Унифицированный метод определения активности $\alpha 1$ - антитрипсина и $\alpha 2$ - макроглобулина в сыворотке (плазме) крови человека. Вопросы мед. химии. 1979; 4: 494–9.
102. Hummel BC. A modified spectrophotometric determination of chymotrypsin, trypsin, and thrombin. Canadian Journal of Biochemistry and Physiology. 1959; 37(12): 1393–9.
103. Crowther J. R. The ELISA Guidebook. Humana Press Inc. 2001. 446 p.
104. Cohen J. Statistical power analysis for the behavioral sciences. Routledge: Elsevier Inc. 2nd edition, 1988. 400 p.
105. Коваленко ОМ, Козинець ГП, Сочієнкова ЛС, Коваленко АО, Стаскевич СВ, Маркін ЄЛ, та ін.. Епідеміологія дитячих опіків у м. Києві. Paediatric surgery. Ukraine. 2018; 2(59): 21-4.
106. Orozco-Perez J, Aguirre-Jauregui O, Salazar-Montes AM, Sobrevilla-Navarro AA, Lucano-Landeros MS, Armendáriz-Borunda J. Pirfenidone Prevents Rat Esophageal Stricture Formation. Journal of Surgical Research. 2014; 194(2): 558–64.
107. Souček B, Pavelková E. Pracovní lékařství. Vylučování kyseliny trichloroethoxy. Roč. 1953; 5(2): 62-8.
108. Pan Y, Wei X, Hao W, Trichloroethylene and Its Oxidative Metabolites Enhance the Activated State and Th1 Cytokine Gene Expression in Jurkat Cells. Int J Environ Res Public Health. 2015 Aug 28; 12(9):10575-86.
109. Хатмуллин ИФ, Нигматуллин РТ. Реактивные изменения эпителия пищевода при экспериментальном химическом ожоге на фоне применения инъекционных форм биоматериалов аллаплант. Регенеративная хирургия. [Интернет]. 2005. [цитировано 2018 Янв 27]. Доступно: http://reg-surgery.ru/2_2005/articles_ru/downloads/006.pdf.

110. Воробьев ВМ, Полухин ДТ, Лепилов АВ, Смирнов А.К. Ранозаживляющие действие новых лекарственных составов, предназначенных для лечения ожогов пищевода, в эксперименте. Экспериментальная и клиническая фармакология. –2010; 2: 31 – 4.
111. Тыхенова МЛ, Цыремпилов СВ, Доржиев БД, Плеханов АН. Экспериментальная модель химического ожога пищевода и желудка современными прижигающими агентами. Acta Biomedica Scientifica. 2012; 4(86): 193-7.
112. Никольский ВИ, Климашевич АВ, Федорова МГ, Купрюшин АС, Купрюшина НВ, Шабров АВ. Определение оптимальный сроков стенирования пищевода на модели химического ожога в эксперименте. Медицинские науки. Теоретическая медицина. 2014; 2(30): 15–22.
113. Kantarcioglu M, Caliskan B, Demirci H, Karacalioglu O. The Efficacy of Mesenchymal Stem Cell Transplantation in Caustic Esophagus Injury: An Experimental Study. Stem Cells International [Internet]. 2014. [cited 2018 Feb 21] Available from: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/939674>.
114. Elmasa O, Cevikb M, Demirc T, Ketanid M. Effect of oral tamoxifen on the healing of corrosive oesophageal burns in an experimental rat model. Interactive CardioVascular and Thoracic Surgery. 2014; 3: 1–6.
115. Коваль ТВ, Рослова НМ, Раецька ЯБ. Біохімічні та загальноклінічні показники крові статевонезрілих щурів за умов моделювання кислотного опіку стравоходу II ступеня. Вісник Львівського університету. Серія: Біологічна. 2016; 73:298-302.
116. Альбицкий ВЮ. Руководство по амбулаторно-поликлинической педиатрии. Москва: ГЭОТАР-Медиа. 2009. 583с.
117. Борисов ВС, Смирнов СВ. Ожоговая анемия, причины возникновения и трудности лечения на современном этапе. Неотложная медицинская помощь. 2013; 3: 28-34.

118. Гобельовська ЛП, редактор. Патолофізіологія системи крові. Частина II. Нарушення в системі лейкоцитів. Харків: «Типографія Мадрид». 2016. 128 с.
119. Ажикова АК, Журавлева ГФ. Исследование гематологических показателей крыс в норме и в условиях термического воздействия. Современные проблемы науки и образования [Интернет] 2016. [цитировано 2018 Фев 22]; 2. Доступно: www.science-education.ru/pdf/2016/2/24350.pdf
120. Атаман ОВ. Патологічна фізіологія в запитаннях та відповідях. Київ: Нова Книга. 2010. 512 с.
121. Edwards M, Cooper JS. Hyperbaric, Thermal Burns. StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): [cited 2018 Mar 10] StatPearls Publishing; 2018-.2017 Dec 18. Available from: www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470524/
122. Aguayo-Becerra OA, Torres-Garibay C, Macías-Amezcuca MD, Fuentes-Orozco C, Chávez-Tostado MG, Andalón-Dueñas E, et al. Serum albumin level as a risk factor for mortality in burn patients. Clinics (Sao Paulo). 2013 Jul; 68(7): 940–5.
123. Громько ЕВ. Оценка состояния организма методами биохимии . Экологический Вестник Северного Кавказа. 2005; 1(2): 80–94.
124. Черкасов ВГ, Дзевульська ІВ, Маліков ОВ Структурно-функціональні порушення нирки при термічних опіках Науковий вісник Національного медичного університету імені ОО Богомольця. 2013; 3:144-8.
125. Брус ТВ, Хайцев НВ, Кравцова АА. Дисфункция печени в патогенезе ожоговой болезни и ее коррекция сукцинатсодержащими препаратами. Педиатр. 2016; 7(4):132-41.
126. Давыдова АВ. Биохимический анализ крови в дифференциальной диагностике заболеваний печени. Иркутск : ИГМУ. 2013. 64 с.
127. Григоренко АП, Куликовский ВФ, Хощенко ЮА, Куприн ЮА. Состояние гомеостаза и возможности коррекции его нарушений у больных с тяжелой

- ожоговой травмой. Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация. 2010;22:112–6.
128. Koval TV, Ishchuk TV, Raetska YaB, Savchuk OM. Experimental model of an acid esophagus burn and its main clinical biochemical parameters. 2nd Prague European Days of Internal Medicine, December 1–2, 2016; Prague, Czech Republic 2016. p.73.
129. Попутников ДМ, Меленчук ЕВ, Висмонт ФИ. Нарушения водно-электролитного обмена (патофизиологические аспекты). Минск БГМУ [Интернет]. 2011 [цитировано 2018 Mar 10]. Доступно: www.bsmu.by/downloads/kafedri/k_pat_fiz/19.pdf
130. Рязанцев ЕВ. Водно-электролитные нарушения при комбинированной (ожог и кровопотеря) травме в эксперименте. Вестник Мордовского университета. 2006; 16(2): 117-24.
131. Зинь А. прооксидантно-антиоксидантний гомеостаз і мембранний транспорт у живих організмах. Вісник Львівського університету. Серія біологічна. 2012;60: 21–39.
132. Некрасов ЭВ. Методы анализа перекисного окисления липидов в медико-биологических исследованиях. Бюллетень физиологии и патологии дыхания. 2012; 46:98-108.
133. Бегляров РО. Оценка состояния перекисного окисления липидов и антиоксидантной системы у детей с нефротической формой гломерулонефрита. Казанский медицинский журнал. 2017; 98 (3): 370-5.
134. Поликарпова АВ, Перский ЕЭ. Сравнительное изучение динамики перекисного окисления липидов и антиоксидантной системы при ожогах различной природы. Вісник Харківського національного університету імені В.Н.Каразіна. Серія: біологія. 2009; 878(10):40-7.
135. Савченкова ЛВ, Филатов ДА. Прооксидантно-антиоксидантний гомеостаз у больных с химическим ожогом пищевода на фоне фармакотерапии

- тиотриазолином. Український журнал екстремальної медицини імені ГО Можасва. 2009; 10(2): 129-33.
136. Оксенюк ОС, Калмыкова ЮА, Смирнова ОБ, Пасечник ДГ. Роль окислительного стресса в развитии хронической болезни почек и способы его оценки. Журнал фундаментальной медицины и биологии. 2016; 1: 15-24.
137. He L, He T, Farrar S, Ji L, Liu T, Ma X. Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species. *Cell Physiol Biochem*. 2017;44(2):532-53.
138. Звягинцева ТВ, Кривошапка АВ, Желнин ЕВ. Роль метаболитов оксида азота в механизмах развития экспериментального ожога. Экспериментальна і клінічна медицина. 2011; 2(51): 5–9.
139. Fei ZW, Young VR, Lu XM, Rhodes AB, Tompkins RG, Fischman AJ, et al. Burn injury differentially alters whole-blood and organ glutathione synthesis rates: An experimental model. *Burns and Trauma*. 2013;1(2): 87–94.
140. Билан ДС, Шохина АГ, Лукьянов СА, Белоусов ВВ. Основные редокс пары клетки. *Биоорганическая химия*. 2015;41(4): 385–402.
141. Radak Z, Zhao Z, Koltai E, Ohno H, Atalay M. Oxygen consumption and usage during physical exercise: the balance between oxidative stress and ROS-dependent adaptive signaling. *Antioxid Redox Signal*. 2013;18(10):1208–46.
142. Калинина ЕВ, Чернов НН, Новичкова МД. Роль глутатиона, глутатионтрансферазы и глутаредоксина в регуляции редокс-зависимых процессов. феразы и глутаредоксин *Успехи биологической химии*. 2014; 54:299–348.
143. Борзова ИВ, Арутюнов ВА, Козина ЛС, Рыжак ГА. Коррекция нарушений оксидативного метаболизма в коже мышечей различного возраста с помощью пептидно-биоантиоксидантного комплекса. *Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация*, 2012; 22(141): 14-8.

144. Parihar A, Parihar MS, Milner S, Bhat S. Oxidative stress and anti-oxidative mobilization in burn injury. *Burns*. 2008;34:6–17.
145. Douaiher J, Succar J, Lancerotto L, Gurish MF, Orgill DP, Hamilton MJ, et al. Development of mast cells and importance of their tryptase and chymase serine proteases in inflammation and wound healing. *Adv Immunol*. 2014;122:211–52.
146. Pickering AM, Koop AL, Teoh CY, Ermak G, Grune T, Davies KJ. The immunoproteasome, the 20s proteasome and the PA28 $\alpha\beta$ proteasome regulator are oxidative-stress-adaptive proteolytic complexes. *Biochem J*. 2010 Dec 15; 432(3):585-94.
147. Oikonomopoulou K, Diamandis EP, Hollenberg MD, Chandran V. Proteinases and their receptors in inflammatory arthritis: an overview. *Nat Rev Rheumatol*. 2018 Mar;14(3):170-80.
148. Nakamura Y, Yokoyama K, Igaki K, Tsuchimori N. Role of Malt1 protease activity in pathogenesis of inflammatory disorders mediated by Fc γ R signaling. *Int Immunopharmacol*. 2018 Mar;56:193-6.
149. Ishchuk TV, Koval TV, Savchuk OM, Raetska YaB, Ostapchenko LI. Dynamics changes of proteolytic balance in blood plasma under experimental chemical burns of esophageal development in rats. *International Journal of Health Sciences and Research*. 2016; 6(12):259-64.
150. Штурич ИП, Шиленок ВН, Кирпиченок ЛН. Активность протеолитических процессов в разные стадии перитонита. *Вестник Витебского государственного медицинского университета*. 2005; 4(4):26-30.
151. Aleksandrova AV. Assessment of influence of synthetic matrix metalloproteinases inhibitor doxycycline on the total proteolytic activity of blood in experimental thermal burns in rats. *Експериментальна і клінічна медицина*. 2018; 1(78): 4–8.

152. Фисталь ЭЯ, Козинец ГГ, Самойленко ГЕ. Комбустиология. Донецк: ДонНМУ им. Горького. 2005. 271 с.
153. Iuonut A, Dindelegan G, Ciuce C. Proteases and Delayed Wound Healing. *Adv Wound Care*. 2013; 8:438–47.
154. Петренко ОМ, Тихомиров ОА. Роль матриксних металопротеїназ у фізіологічних процесах загоєння ран. *Медична та клінічна хімія*. 2013; 4:100–6.
155. Рыжакова О.С, Гуреева ТА, Агеев АН, Мошетьова ЛК, Яровая ГА, Алексеев ИБ, и др.. Коллагенолитическая и трипсиноподобная активности слёзной жидкости больных с ожоговой травмой глаза. *Офтальмологические ведомости*. 2012; 5(1): 75-84.
156. Staszczak M. Ubiquitin-proteasome pathway as a target for therapeutic strategies. *Postepy Biochem*. 2017; 63(4):287-303.
157. Климашевич АВ, Никольский ВИ, Богонина ОВ, Акимов АА, Шабров АВ. Способ прогнозирования рубцовых стриктур пищевода после химических ожогов. *Фундаментальные исследования*. 2013; 2: 79-82.
158. Amato B, Coretti G, Compagna R, Amato M, Buffone G, Gigliotti D, et al. Role of matrix metalloproteinases in non-healing venous ulcers. *International Wound Journal* 2015; 12(6): 641-5.
159. Jeong S, Schultz GS, Gibson DJ. Testing the influence of surfactant-based wound dressings on proteinase activity. *International Wound Journal* 2017; 14(5): 786-90/
160. Тунчик ЮО, Коваль ТВ, Раєцька ЯБ. Функціонування матриксних металопротеїназ в сироватці крові щурів за умов розвитку кислотного опіку стравоходу. XV Міжнародна наукова конференція студентів, аспірантів та молодих вчених «Шевченківська весна», 18-21 квітня 2017р. Київ, 2017. С.78-79.
161. Тунчик ЮО, Коваль ТВ, Іщук ТВ. Визначення активності матриксних металопротеїназ у слизовій оболонці стравоходу щурів за умов розвитку

- кислотного опіку. XII Міжнародна конференція молодих науковців «Біологія: від молекули до біосфери», 29 листопада – 1 грудня 2017 р.- Харків, 2017. С.15-16.
162. Маркелова ЕВ, Здор ВВ, Романчук АЛ, Бирко ОН. Матриксные металлопротеиназы: их взаимосвязь с системой цитокинов, диагностический и прогностический потенциал. Иммунопатология, аллергология, инфектология. 2016; 2: 11-22.
163. Ярмолинская МИ, Молотков АС, Денисова ВМ. Матриксные металлопротеиназы и ингибиторы: классификация, механизм действия. Журнал акушерства и женских болезней. 2012; 61(1): 113-25.
164. Rodriguezac D, Morrisonac CJ, Overallabc CM. Matrix metalloproteinases: What do they not do? New substrates and biological roles identified by murine models and proteomics. *BBA Mol Cell Res* 2010; 1803: 39-54.
165. Барт ИИ, Иванов ИС, Лазаренко ВА, Иванов ВП. Особенности ассоциации соотношения коллагенов в апоневрозе передней брюшной стенки и полиморфизма генов матриксных металлопротеиназ. *Фундаментальные исследования*. 2013; 2: 28-34.
166. Cui N, Hu M, Khalil RA. Biochemical and biological attributes of matrix metalloproteinases. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2017;147:1-73.
167. Caley MP, Martins VL, OToole EA. Metalloproteinases and Wound Healing. *Adv Wound Care (New Rochelle)* 2015; 4: 225-34.
168. Rohl J, Murray RZ. Matrix metalloproteinases during wound healing-a double edged sword. *Wound Pract Res* 2013; 21: 174-82.
169. TsaousiA, Witte E, Witte K, Röwert-Huber HJ, Volk HD, Sterry W, et al. MMP 8 is increased in lesions and blood of acne inversa patients: a potential link to skin destruction and metabolic alterations. *Med Inflamm [Internet]*. 2016 Oct 23 [cited 2018 Jan 17]. Available from: www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5097814/pdf/MI2016-4097574.pdf

170. Vanlaere I, Libert C. Matrix metalloproteinases as drug targets in infections caused by gram-negative bacteria and in septic shock. *Clin Microbiol Rev* 2009; 22: 224-39.
171. Hästbacka J, Freden F, Hult M, Bergquist M, Wilkman E, Vuola J, et al. Matrix metalloproteinases -8 and -9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in burn patients. A prospective observational study. *PLoS One* [Internet]. 2015 May 6 [cited 2018 Jan 17]; 10(5). Available from: www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4422709/pdf/pone.0125918.pdf
172. Габалевская ЛВ, редактор. Биологическая химия. СПбГМУ. 2005. 276 с.
173. Correale M, Brunetti ND, De Gennaro L, Di Biase M. Acute phase proteins in atherosclerosis (acute coronary syndrome). *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem*. 2008; 6(4): 272-7.
174. Suriyaprom K, Harnroongroj T, Namjuntra P, Chantaranipapong Y, Tungtrongchitr R. Effects of tobacco smoking on alpha-2-macroglobulin and some biochemical parameters in Thai males. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2007 Sep;38(5):918-26.
175. Ломако ВВ, Самохина ЛМ, Сомова ЕВ. Активность α -2-макроглобулина при патологии (депрессия, алкоголизм, гипотония). *Український журнал медицини, біології та спорту*. Український журнал медицини, біології та спорту. 2016; 1(1): 178-81.
176. Dasu MR, Spies M, Barrow RE, Herndon DN. Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in severely burned children. *Wound Repair Regen*. 2003;11:177-80.
177. Dietmar U, Franziska U, Frank U. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in patients with different types of scars and keloids. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2010;63:1015-21.
178. Арифов СС, Марупов АМ, Уразаева ЖК, Стопницкий АА. Вопросы диагностики и лечения химических ожогов глотки и пищевода. *Вестник экстренной медицины*. 2009; 2: 58-60.

179. Nunes QM, Li Y, Sun C, Kinnunen TK, Fernig DG. Fibroblast growth factors as tissue repair and regeneration therapeutics. Peer J [Internet]. 2016 Jan 12[cited 2018 Mar15]; 4. Available from: <https://peerj.com/articles/1535/>
180. Hayashida K, Akita S. Quality of pediatric second-degree burn wound scars following the application of basic fibroblast growth factor: results of a randomized, controlled pilot study. *Qstomy Wound Manag* 2012; 58: 32-6.
181. Tang QL, Han SS, Feng J, Di JQ, Qin WX, Fu J, Jiang QY. Moist exposed burn ointment promotes cutaneous excisional wound healing in rats involving VEGF and bFGF. *Mol Med Rep*. 2014 Apr; 9(4):1277-82.
182. Roh BH, Kim DH, Cho MK, Park YL, Whang KU. Expression of Heat Shock Protein 70 in Human Skin Cells as a Photoprotective Function after UV Exposure. *Ann Dermatol*. 2008 Dec; 20(4):184-9.
183. Чаланова РИ, Коломийчук СГ, Байдан ЕИ, Мбарки М. Содержание АТФ и глюкозо-6- фосфата роговицы при моделированном щелочном ожоге и возможность его коррекции цитофлавином. *Офтальмологический журнал*. 2013; 5(454):78-82.
184. Yan XP, Zhang DX, Yan TT, Zhang Q, Jia JZ, Huang YS. Effects of change in the activity of vacuolar adenosine triphosphatase of myocardial lysosome on myocardial damage in rats after severe burn and its mechanism. *Chinese Journal of Burns*. 2017;33(5):295-300.
185. Xu P, Liu J, Derynck R Post-translational regulation of TGF- β receptor and Smad signaling. *FEBS Lett*. 2012; 586(14):1871–84.
186. Скворцова РГ, Трубникова ТИ. Современные методы электрофореза белков в клинической лабораторной диагностике. Иркутск: РИО ИГИУВа. 2011. 65 с.
187. Коваль ТВ, Ішук ТВ, Раєцька ЯБ. Зміни білкового складу сироватки крові та гомогенату стравоходу за розвитку кислотного опіку стравоходу статевонезрілих щурів. *Вісник Київського національного університету*

- імені Тараса Шевченка, Серія: Проблеми регуляції фізіологічних функцій. 2017; 22(1):36-9.
188. Lehnhardt M, Jafari H, Druecke D. A qualitative and quantitative analysis of protein loss in human burn wounds. *Burns*. 2005; 31:159–67.
189. Rodrick ML. The Effects of Traumatic or Burn Injury on the Humoral Immune Response. *Sepsis*. 1999; 3:235–8.
190. Куценко ЛА, Кайдашев ИП. Место церулоплазмينا среди белков острой фазы как маркера системного воспаления. *Лабораторна діагностика*. 2011; 3(57): 59-68.
191. Uhlén M, Fagerberg L, Hallström BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, et al. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science* [Internet]. 2015 Jan 23[cited 2017 Dec 15]; 347(6220). Available from: <http://science.sciencemag.org/content/347/6220/1260419.long>
192. Bruen K, Campbell C, Schooler W. Real-Time Monitoring of Keratin 5 Expression during Burn Reepithelialization. *Journal of Surgical Research*. 2004; 120: 12–20.
193. Wang F, Xu R, Xu Q, Cao Y, Lin L, Dang W. Effect of laser therapy on plasma expression of VEGF and bFGF in infants with cutaneous hemangioma. *Oncol Lett*. 2017 Mar;13(3):1861-5.
194. Карякина ЕВ, Белова СВ. Молекулы средней массы как интегральный показатель метаболических нарушений. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2004; 3: 3–8.
195. КовальТВ, ІшукТВ, Раєцька ЯБ, Савчук ОМ, Остапченко ЛІ. Вміст молекул середньої маси та олігопептидів у крові та тканинах щурів за умов розвитку кислотного опіку стравоходу. *Науковий вісник Чернівецького університету, Серія: Біологія (Біологічні системи)*. 2015;7(2):143-8.
196. Коваль ТВ, Ішук ТВ, Раєцька ЯБ. Вміст молекул середньої маси у тканинах щурів за умов розвитку кислотного опіку стравоходу. XIV

- Міжнародна наукова конференція студентів, аспірантів та молодих вчених «Шевченківська весна», 6-8 квітня 2016р. Київ, 2016. С.104-5.
197. Іщук ТВ, Коваль ТВ, Раєцька ЯБ. Особливості імунної відповіді за умов експериментальної моделі кислотного опіку стравоходу у статевонезрілих щурів. XII Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології», 19-21 квітня 2016р. Львів, 2016. С. 36-7.
198. Nettagul R, Visitsunthorn N, Vichyanond P. A case of IgG subclass deficiency with the initial presentation of transient hypogammaglobulinemia of infancy and a review of IgG subclass deficiencies. *J Med Assoc Thai.* 2003 Jul;86(7):686-92.
199. Sobouti B1, Fallah S, Ghavami Y, Moradi M. Serum immunoglobulin levels in pediatric burn patients. *Burns.* 2013 May;39(3):473-6.
200. Lyons JM, Davis C, Rieman MT, Kopcha R, Phan H, Greenhalgh D, et al. Prophylactic intravenous immune globulin and polymixin B decrease the incidence of septic episodes and hospital length of stay in severely burned children. *J Burn Care Res.* 2006 Nov-Dec; 27(6):813-8.
201. Трубникова ПВ. Концентрация циркулирующих иммунных комплексов как индикатор состояния репродуктивного тракта коз. Международная научно-практическая конференция Состояние, перспективы, стратегия развития и научного обеспечения овцеводства и козоводства РФ. Ставрополь:ГНУ СНИИЖК. 2007. С. 145-7.
202. Алиева ТР. Определение концентрации циркулирующих иммунных комплексов, уровней иммуноглобулинов классов Е и G и гистамина в крови и лимфе при анафилактическом шоке и феномене Артюса в эксперименте. *Казанский медицинский журнал.* 2018;99(1): 59-63.
203. Koval T, Ischuk T, Raetska Ya. Characteristics of immune response under experimental models of acid burns of the esophagus. *Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kyiv, Biology.* 2016; 72(2):52-5.

204. Поважняк Г, Коваль Т, Іщук Т, Раєцька Я. Рівень циркулюючих імунних комплексів у крові щурів за умов експериментального відтворення моделі кислотного опіку стравоходу. XIII Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології», 25-27 квітня 2017р. Львів, 2017. С.45-6.
205. Medrano-Campillo P, Sarmiento-Soto H, Álvarez-Sánchez N. Evaluation of the immunomodulatory effect of melatonin on the T-cell response in peripheral blood from systemic lupus erythematosus patients. *J Pineal Res.* 2015; 58(2):219-26.
206. Shen P, Roch T, Lampropoulou V, O'Connor RA, Stervbo U, Hilgenberg E, et al. IL-35-producing B cells are critical regulators of immunity during autoimmune and infectious diseases. *Nature.* 2014;507: 366-70.
207. Paunel-Gorgulu, A, Kirichevska T, Logters T, Windolf J, Flohe S. Molecular mechanisms underlying delayed apoptosis in neutrophils from multiple trauma patients with and without sepsis. *Molecular Medicine (Cambridge, Mass.).* 2012; 18(3): 325–35.
208. Zhou H, Tu J, Huangetal Y. Changes in serum contents of interleukin-6 and interleukin-10 and their relation with occurrence of sepsis and prognosis of severely burned patients. *Zhonghua Shao Shang Za Zhi.* 2012; 28(2): 111-5.
209. Raetska YaB, Chornenka NM, 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. *Biomedical Research and Therapy.* 2017;4(9):1591-606.
210. Серебренникова СН, Семинский ИЖ, Семенов НВ, Гузовская ЕВ. Интерлейкин-1, интерлейкин-10 в регуляции воспалительного процесса. *Сибирский медицинский журнал (Иркутск).* 2012; 115(8): 5-7.

Додаток 1

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

За темою дисертації опубліковано 13 наукових праць, що відображають основний зміст дисертаційної роботи: 5 статей у вітчизняних фахових періодичних виданнях, затверджених МОН України, та 2 публікації у виданнях, включених до міжнародних наукометричних баз. А також 6 тез доповідей у матеріалах наукових конференцій та з'їздів.

1. Raetska Ya, Ischuk T, **Koval T**, Dzhus O, Savchuk O. Experimental modeling of an acid esophagus of 2nd degree in immature rats. Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kyiv, Problems of Physiological Functions Regulation. 2015;19(2):15-8.

2. **Коваль ТВ**, Іщук ТВ, Раєцька ЯБ, Савчук ОМ, Остапченко ЛІ. Вміст молекул середньої маси та олігопептидів у крові та тканинах щурів за умов розвитку кислотного опіку стравоходу. Науковий вісник Чернівецького університету, Серія: Біологія (Біологічні системи). 2015;7(2):143-8.

3. **Коваль ТВ**. Рослова НМ, Раєцька ЯБ. Біохімічні та загальноклінічні показники крові статевонезрілих щурів за умов моделювання кислотного опіку стравоходу II ступеня. Вісник Львівського університету. Серія: Біологічна. 2016; 73:298-302.

4. **Koval T**, Ischuk T, Raetska Ya. Characteristics of immune response under experimental models of acid burns of the esophagus. Bulletin of Taras Shevchenko National University of Kyiv, Biology. 2016; 72(2):52-5.

5. Ishchuk TV, **Koval TV**, Savchuk OM, Raetska YaB, Ostapchenko LI. Dynamics changes of proteolytic balance in blood plasma under experimental chemical burns of esophageal development in rats. International Journal of Health Sciences and Research. 2016; 6(12):259-64.

6. **Коваль ТВ**, Іщук ТВ, Раєцька ЯБ. Зміни білкового складу сироватки крові та гомогенату стравоходу за розвитку кислотного опіку стравоходу

статевонезрілих щурів. Вісник Київського національного університету імені Тараса Шевченка, Серія: Проблеми регуляції фізіологічних функцій. 2017; 22(1):36-9.

7. Raetska YaB, Chornenka NM, **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. *Biomedical Research and Therapy*. 2017;4(9):1591-1606.

8. **Коваль ТВ**, Іщук ТВ, Раєцька ЯБ. Вміст молекул середньої маси у тканинах щурів за умов розвитку кислотного опіку стравоходу. XIV Міжнародна наукова конференція студентів, аспірантів та молодих вчених «Шевченківська весна», 6-8 квітня 2016р.: матер. конфер. – Київ, 2016. – С.104-105.

9. Іщук ТВ, **Коваль ТВ**, Раєцька ЯБ. Особливості імунної відповіді за умов експериментальної моделі кислотного опіку стравоходу у статевонезрілих щурів. XII Міжнародна наукова конференція студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології», 19-21 квітня 2016р.: матер. конфер. – Львів, 2016. – С. 36-37.

10. **Koval TV**, Ishchuk TV, Raetska YaB, Savchuk OM. Experimental model of an acid esophagus burn and its main clinical biochemical parameters. 2nd Prague European Days of Internal Medicine, December 1–2, 2016: матер.конфер. - Prague, Czech Republic 2016. - P.73.

11. Тунчик ЮО, **Коваль ТВ**, Раєцька ЯБ. Функціонування матриксних металопротеїназ в сироватці крові щурів за умов розвитку кислотного опіку стравоходу. XV Міжнародна наукова конференція студентів, аспірантів та молодих вчених «Шевченківська весна», 18-21 квітня 2017р.: матер. конфер. – Київ, 2017. – С.78-79.

12. Поважняк Г, **Коваль Т**, Іщук Т, Раєцька Я. Рівень циркулюючих імунних комплексів у крові щурів за умов експериментального відтворення моделі кислотного опіку стравоходу/ XIII Міжнародна наукова конференція

студентів та аспірантів «Молодь і поступ біології», 25-27 квітня 2017р.: матер. конфер. – Львів, 2017. - С.45-46.

13. Тунчик ЮО, **Коваль ТВ**, Іщук ТВ. Визначення активності матриксних металопротеїназ у слизовій оболонці стравоходу щурів за умов розвитку кислотного опіку. XII Міжнародна конференція молодих науковців «Біологія: від молекули до біосфери», 29 листопада – 1 грудня 2017 р.: матер. конфер. - Харків, 2017. - С.15-16.

Апробація результатів дисертації. Основні результати дисертації доповідались на вітчизняних та міжнародних конференціях: XII Міжнародній науковій конференції “Молодь та поступ в біології” (Львів, 2016), XIV Міжнародній науковій конференції студентів, аспірантів та молодих вчених “Шевченківська весна” (Київ, 2016), 2nd Prague European Days of Internal Medicine (Prague, 2016), XV Міжнародній науковій конференції студентів, аспірантів та молодих вчених “Шевченківська весна” (Київ, 2017), XIII Міжнародній науковій конференції “Молодь та поступ в біології” (Львів, 2017), XIII Міжнародній конференції молодих науковців “Біологія: від молекули до біосфери” (Харків, 2017).